ROGÉRIO LOESCH ZACARIOTTI

Avaliação reprodutiva e congelação de sêmen em serpentes

São Paulo

2008

ROGÉRIO LOESCH ZACARIOTTI

Avaliação reprodutiva e congelação de sêmen em serpentes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

São Paulo
2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2058 Zacariotti, Rogério Loesch
FMVZ Avaliação reprodutiva e congelação de sêmen em serpentes / Rogério Loesch Zacariotti. – São Paulo : R. L. Zacariotti, 2008.
98 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. Conservação. 2. Répteis. 3. Sêmen. 4. Espermatozóide. 5. Folículos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Reprodução assistida em serpentes", protocolado sob o nº1035/2006, utilizando 106 (cento e seis) serpentes, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Assisted reproduction in snakes", protocol number 1035/2006, utilizing 106 (one hundred and six) snakes, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 11 de janeiro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fone / Fax: +55 11 3091-7671
+55 11 3091-7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZACARIOTTI, Rogério Loesch

Título: Avaliação reprodutiva e congelação de sêmen em serpentes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição:_____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos grandes amores da minha vida:
Mirella e Isabella, vocês iluminam
o meu coração e me ensinam o que
é amar incondicionalmente.

Aos meus pais Pedro e Eliana,
que me amam de maneira
incondicional.

Aos meus queridos familiares
Ricardo, Cristina, Alberto,
Daniela e Pedro Paulo.

A minha segunda família Paulo,
Nanci, Fúlvio e Alzira.

“Planos são apenas boas intenções, a não ser que sejam imediatamente transformados em trabalho duro.” (*Peter F. Drucker)*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, pela orientação, amizade, paciência, confiança e parceria.

À Dr[a]. Barbara Durrant, pela co-orientação, amizade, carinho e por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Fisiologia Reprodutiva do *CRES.*

A Don Boyer, curador do Departamento de Herpetologia do Zoológico de San Diego, pelo apoio incondicional neste trabalho e por ter me apresentado pessoalmente minha primeira Tuatara.

A John Kinkaid do Departamento de Herpetologia do Zoológico de San Diego, pelo auxílio nas colheitas de sêmen e por ter gentilmente cedido as fotos da dança-combate entre dois machos de cascavel.

A J.P. Montagne e Jeff Lemm, do Laboratório de Ecologia Animal Aplicada do *CRES*, por muito me ensinarem sobre a área de estudo e as espécies que nela vivem.

A Fred Bercovitch do Laboratório de Biologia Comportamental do CRES, pelo apoio logístico na realização dos trabalhos de campo.

A todos os funcionários e estagiários do CRES, Zoológico de San Diego e Wild Animal Park que auxiliaram direta ou indiretamente neste trabalho.

Aos amigos do coração que deixei em outro país: *Bird* Tom, Betty*, Bear* Tom, Nicole, Dianne, Ali Cheng, Alice e Irene.

A Dr[a]. Mayra do Departamento de Reprodução Animal pelas importantes contribuições dadas durante o Exame de Qualificação desta tese.

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal, Patrícia, Mariana, Sílvia, Eduardo, Marcílio, Lílian, Manuela, Marco Antônio, Priscila e Rodrigo.

Ao Marcílio em especial, pela amizade, altruísmo e ajuda nas análises estatísticas e discussões deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, pela amizade e auxílio.

À Harumi pela amizade, paciência, auxílio e extrema competência que executa seu trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na revisão desta tese, e pela competência e agilidade que executam seu trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Ecologia e Evolução Instituto Butantan Dr. Otávio Marques, Dr. Ricardo Sawaya e Drª. Selma Almeida-Santos, pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, Rafael, Rodrigo, Donizete, Fernanda, Lívia, Thaís, Letícia, Karina, Fausto, Murilo, Marília, Ana, Cristian, pelos momentos felizes que proporcionam.

Ao Dr. Rodrigo Del Rio do Valle, pela amizade e compreensão nos momentos que precisei me afastar do trabalho.

Aos amigos de São Joaquim da Barra, Cláudia, Thaís, Renata, Alex, Fernanda Maria, Thalita, Taís, Bruna, Mário, Lígia, Fernanda T., Élsio, Michele, Flavinho, Paulo, Adelmo, Joel e Degnaldo, pelo convívio e momentos felizes que vivemos.

Ao Dr. Euardo Bondan, Drª. Anete Lallo e Profª. Fátima Martins, da Universidade Cruzeiro do Sul, pelo apoio e amizade.

À Heller Foundation e a Menard Family Foundation pela bolsa concedida nos Estados Unidos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPQ) pela bolsa concedida no Brasil.

Enfim a todos que contribuíram para que esse trabalho acontecesse.

RESUMO

ZACARIOTTI, R. L. **Avaliação reprodutiva e congelação de sêmen em serpentes.** [Reproductive evaluation and semen cryopreservation in snakes]. 2008. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Os répteis compõem hoje uma classe com mais de 8.000 espécies e em razão das restrições na importação desses animais, o risco na introdução de doenças exóticas, o crescente número de espécies ameaçadas no mundo, entre outros, a reprodução e a manutenção em cativeiro desses animais é muito importante. No Sul da Califórnia, que é considerado um *Hotspot* para a biodiversidade, a *Zoological Society of San Diego* mantém uma reserva ecológica com aproximadamente 400 hectares e formada por vegetação tipo *Chaparral*, *Coastal Sage Scrub* e áreas cobertas por cactos (*Opuntia* sp.*).* Durante o período de junho de 2005 a julho de 2006 foram capturadas 96 cascavéis das espécies *Crotalus ruber ruber, C. oreganus helleri* e *C. mitchellii phyrrus*, durante os trabalhos de campo pela procura visual limitada por tempo. Foram realizadas avaliações morfológicas e reprodutivas em todas essas serpentes capturadas. Nos machos realizou-se a colheita e avaliação de sêmen, incluindo duas colorações específicas para avaliar integridade de membrana espermática e do acrossoma. Nas fêmeas foi realizada a avaliação ultra-sonográfica dos ovários, com mensuração e contagem de folículos, além do diagnóstico de gestação. Para a *C. ruber ruber*, a serpente mais abundante neste estudo, foram observadas fêmeas prenhes no verão e vitelogênicas na primavera, outono e inverno. Apenas as fêmeas desta espécie com condição corporal boa ou muito boa apresentaram-se vitelogênicas ou prenhes. Nos machos dentre as características seminais avaliadas, não foi observada a diferença estatisticamente significante ao longo das estações do ano. Em paralelo a este estudo, também foram testados protocolos para a congelação de sêmen de serpentes, com a obtenção de resultados promissores, discutidos em capítulo específico. As informações obtidas neste estudo visam contribuir para a compreensão da biologia reprodutiva e conservação das serpentes, em cativeiro ou vida-livre.

Palavras-chave: Conservação. Répteis. Sêmen. Espermatozóide. Folículos.

ABSTRACT

ZACARIOTTI, R. L. **Avaliação reprodutiva e congelação de sêmen em serpentes.** [Reproductive evaluation and semen cryopreservation in snakes]. 2008. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

There are more than 8,000 reptile species in world. Today´s restrictions to importation of these species around world, the risk of introduction of exotic diseases, the growing number of endangered reptiles, among other reasons, emphasize the importance of reproduction in captivity and ex-situ conservation. South California is a Hotspot for biodiversity and the Zoological Society of San Diego maintains a nature preserve in Escondido City. In an area of about 400 hectares, composed by vegetation types like Chaparral and Coastal Sage Scrub, it has been found the greatest diversity of snake in region. Between May 2005 and July 2006, 96 rattlesnakes of species *Crotalus ruber ruber, C. oreganus helleri* and *C. mitchellii phyrrus* were captured by active searching during field work. In the Laboratory of Reproductive Physiology the snakes were measured, weighted, and marked the captured snakes. We evaluated their body condition, collected and evaluated semen from males and performed ultrasound exams in females. Snakes were released up to 24 hours after capture. The *Crotalus ruber ruber* studied initiated vitellogenesis in fall, courtship and mating occurred in spring and gravid snake were observed in spring and summer. Only females with a good or very good body condition were in secondary vitellogenesis or gravid. There were no statistical differences in seminal parameters among season in males of the *Crotalus ruber ruber*. Protocols to freeze snake´s semen were tested in this study, with positive results that are discussed in specific chapter. This study results contribute to understand of snake´s biology of reproduction and in or ex-situ conservation.

Key words: Conservation. Reptiles. Semen. Spermatozoa. Follicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ovário de serpente (*Thamnophis sirtalis tetrataenia*). As setas indicam alguns dos folículos presentes no ovário.....27

Figura 2- Região cloacal de uma fêmea de cascavel (*Crotalus r. ruber*) onde evidenciam-se as vaginas (setas brancas) e a papila genital (seta preta) 27

Figura 3- Testículo (asterisco) e ducto deferente (seta) em um macho adulto de cascavel (*Crotalus ruber ruber)* 28

Figura 4- Região cloacal dissecada em macho adulto de cascavel (*Crotalus ruber*), evidenciando estruturas do trato reprodutor masculino: hemipênis esquerdo exposto (asterisco branco) e direito retraído (asterisco preto), papila genital (seta preta) e sulco genital (seta branca) 28

Figura 5- Macho adulto da *Crotalus ruber ruber* (macho 120) encontrado em área com rochas.....38

Figura 6- Mapa representando a distribuição geográfica (área em vermelho) da *Red Diamond Rattlesnake (Crotalus ruber ruber*) (adaptado de IUCN, 2008). A estrela destaca a área onde ocorreu este estudo 38

Figura 7- Macho adulto da *Crotalus oreganus helleri* (macho 47) capturado em área aberta com vegetação arbustiva.....40

Figura 8- Dois machos de *Crotalus oreganus helleri* em dança-combate em natureza (San Diego, CA, EUA) durante o verão. Foto: John Kinkaid (03/07/2004) 40

Figura 9- Mapa representando a distribuição geográfica (área em vermelho) da *Western Rattlesnake* (*Crotalus oreganus*), incluindo a *Southern Pacific Rattlesnake (Crotalus oreganus helleri*) uma das nove subespécies descritas (adaptado de IUCN, 2008). A estrela destaca a área onde ocorreu este estudo.....41

Figura 10- Macho adulto da *Crotalus mitchellii phyrrus* (macho 21) capturado em área de encosta rochosa 42

Figura 11- Mapa representando a distribuição geográfica (área em vermelho) da *Speckled Rattlesnake (Crotalus mitchellii*), incluindo a *Southwestern Speckled Rattlesnake (Crotalus mitchellii phyrrus*) uma das duas subespécies conhecidas (adaptado de IUCN, 2008). A estrela destaca a área onde ocorreu este estudo.....42

Figura 12- Foto aérea da área do *Wild Animal Park*, (Escondido, CA, EUA). As áreas de *Coastal Sage Scrub* e *Chaparral* estão representadas em vermelho e amarelo, respectivamente. A estrela indica a localização do CRES 46

Figura 13- Formações vegetais encontradas na área da reserva ecológica (Escondido, CA, EUA). A) Vegetação do tipo *Chaparral* com predominância de cactos (Opuntia sp.). B) Vegetação do tipo *Coastal Sage Scrub*. C) Rochas de granito em meio à vegetação tipo *Chaparral* ... .47

Figura 14- Diferentes condições corporais observadas em cascavéis no estudo. A) Exame de condição corporal em uma cascavel (*Crotalus ruber ruber*) B) Condição corporal classe 3 ou muito boa em cascavel (*Crotalus oreganus helleri*). C) Condição corporal classe 1 ou ruim em cascavel (*Crotalus ruber ruber*) 50

Figura 15- Recipiente específico para congelação (5100 Cryo 1°, *Nalgene*, EUA) utilizado no protocolo de congelamento 2 53

Figura 16- Representação gráfica da porcentagem relativa de machos e fêmeas de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia,. nas diferentes estações do ano. (a,b) letras diferentes representam diferença estatisticamente significante (p<0,05) 61

Figura 17- Radiografia de uma fêmea adulta de *Crotalus ruber ruber* (fêmea 41) capturada em vida-livre no Sul da Califórnia e que tinha ingerido um coelho (*Sylvilagus audubonii*). As setas indicam o crânio e o fêmur da presa 63

Figura 18- 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) 69

Figura 19 - Distribuição de fêmeas de *Crotalus ruber ruber* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006, nos diferentes estados reprodutivos: vitelogênica, não-vitelogênica e prenhe – São Paulo - 2008.....70

Figura 20- Representação do maior folículo e prenhez (pontos sombreados) em fêmeas de *Crotalus ruber ruber* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006, com diferentes condições corporais (Cc) 72

Figura 21- 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 padrão anormal de coloração C) Amostra de sêmen diluída em Test-gema com glicerol após a congelação, apresentando padrão anormal de coloração... 79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Fatores que compõem o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de serpentes - São Paulo – 2008.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das espécies de cascavéis e protocolos para diluição e congelação de sêmen testados no experimento II – São Paulo -2008..... 54

Tabela 2- Relação de espécies de cascavel capturadas na reserva ecológica da *Zoological Society of San Diego* em Escondido (CA, EUA), durante o período de abril de 2005 a julho de 2006 - São Paulo - 2008 59

Tabela 3- Parâmetros morfológicos (média ± EPM) de machos e fêmeas de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo – 2008 63

Tabela 4- Parâmetros morfológicos (média ± EPM) de machos de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, ao longo das estações do ano - São Paulo – 2008 64

Tabela 5- Parâmetros morfológicos (média ± EPM) de fêmeas adultas de *Crotalus ruber ruber* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006, segundo a estação do ano - São Paulo - 2008.....65

Tabela 6- Resultados (média ± EPM) dos parâmetros morfológicos em relação à condição corporal de fêmeas adultas de *Crotalus ruber ruber* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008 66

Tabela 7- Resultados (média ± EPM) dos parâmetros índice de massa corpórea em relação à condição corporal de machos adultos de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo – 2008 66

Tabela 8- Parâmetros seminais (média ± EPM) de machos adultos de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006, segundo as estações do ano - São Paulo - 2008 68

Tabela 9- Condição corporal, estação que ocorreu a captura e parâmetros morfológicos estudados em *Crotalus oreganus helleri* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008.....73

Tabela 10- Parâmetros seminais estudados em *Crotalus oreganus helleri,* representando um macho adulto de cativeiro (macho 8) e cinco capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008 74

Tabela 11- Diâmetro do maior folículo observado em fêmeas de *Crotalus oreganus helleri* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006- São Paulo - 2008 74

Tabela 12- Condição corporal, estação que ocorreu a captura e parâmetros morfológicos estudados em *Crotalus mitchellii phyrrus* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008.....76

Tabela 13- Parâmetros seminais estudados em *Crotalus mitchellii phyrrus,* representando um macho adulto mantido em cativeiro (macho 7) e cinco capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008 76

Tabela 14- Diâmetro do maior folículo observado em fêmeas de *Crotalus mitchellii phyrrus* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008 77

Tabela 15- Protocolos utilizados na congelação de sêmen em diferentes indivíduos de diferentes espécies de cascavéis. Sendo os resultados de motilidade e vigor (0-100% / 0-5) apresentados em T0 (avaliação inicial da amostra), T1 (amostra + diluidor), T2 (amostra + diluidor + crioprotetor), T3A (avaliação pós-descongelamento), T3B (avaliação pós)T3C (avaliação pós) - São Paulo - 2008**Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 OBJETIVOS 24

3 REVISÃO DE LITERATURA 26

3.1 ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DAS SERPENTES 26

3.2 ESPERMATOGÊNESE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DAS SERPENTES 29

3.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS SERPENTES 30

3.4 REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM RÉPTEIS 31

3.4.1 Colheita e avaliação de sêmen 32

3.4.2 Congelação e resfriamento de sêmen 34

3.4.3 Avaliação ultra-sonográfica do trato reprodutivo 34

3.5 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL 36

3.6 BIOLOGIA DAS SERPENTES ESTUDADAS 37

4 MATERIAL E MÉTODOS 454

4.1 INTRODUÇÃO 45

4.2 ÁREA DO ESTUDO 46

4.2.1 Colheita de dados 48

4.2.2 Trabalho de campo 48

4.2.3 Trabalho de laboratório 48

4.2.4 Avaliação reprodutiva dos machos 51

4.2.5 Avaliação reprodutiva das fêmeas 51

4.3 EXPERIMENTO II: CONGELAÇÃO DE SÊMEN EM CASCAVÉIS 52

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 56

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: AVALIAÇÕES REPRODUTIVAS E DE CONDIÇÃO CORPORAL DAS SERPENTES ESTUDADAS 59

5.1 ANIMAIS 59

***5.2* AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DE CONDIÇÃO CORPORAL EM *CROTALUS RUBER RUBER* 60**

5.2.1 Biologia reprodutiva da Crotalus ruber ruber 61

5.2.2 Avaliação de parâmetros morfológicos da Crotalus ruber ruber 62

5.2.3 Avaliação da condição corporal e índice de massa corpóreo da Crotalus ruber ruber *65*
5.2.4 Avaliação reprodutiva dos machos de Crotalus ruber ruber *67*
5.2.5 Avaliação reprodutiva das fêmeas de Crotalus ruber ruber *70*
5.3 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DE CONDIÇÃO CORPORAL EM MACHOS E FÊMEAS DE *CROTALUS OREGANUS HELLERI* **73**
5.4 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DE CONDIÇÃO CORPORAL EM MACHOS E FÊMEAS DE *CROTALUS MITCHELLII PHYRRUS* **75**
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO II: CONGELAÇÃO DE SÊMEN **78**
7 CONCLUSÕES **83**
REFERÊNCIAS **85**

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse mundial pelos répteis em diversas áreas da ciência possibilita, cada vez mais, estudos sobre taxonomia, fisiologia, comportamento, história natural, patologia, farmacologia, toxicologia, anestesiologia, semiologia, etc.

Os répteis compõem uma classe com 8.734 espécies (UETZ, 2008), uma diversidade maior que a dos anfíbios e até mesmo dos mamíferos. Essas espécies têm evoluído nos mais diferentes ambientes desde desertos, florestas tropicais, oceanos até zonas temperadas próximas ao círculo ártico. Assim, a diversidade de adaptações a esses ambientes criou uma diversidade fisiológica e morfológica muito grande (FITCH, H. S., 1970), e generalizar constatações feitas em uma espécie para uma ordem ou mesmo toda a classe *Reptilia* pode levar a grandes erros.

Existem alguns exemplos interessantes da variabilidade nos aspectos reprodutivos dentro de um mesmo gênero ou até espécie de serpente. No gênero *Helicops* (cobra d´água) existem variações entre as espécies quanto ao modo de reprodução ovípara ou vivípara (DE AGUIAR; DI-BERNARDO, 2005; SALE-NUNES, 2006). Na espécie *Liophis miliaris* (cobra d´água) a ocorrência de sazonalidade na reprodução varia ao longo das porções sul e norte da Mata Atlântica em sua área de ocorrência (PIZZATTO; MARQUES, 2006). O gênero *Micrurus* (corais verdadeiras) pode apresentar, de acordo com a espécie, grandes diferenças na estratégia reprodutiva com comportamento de disputa entre machos (dança-combate) e dimorfismo sexual quanto ao tamanho (*Micrurus frontalis*) ou ausência de disputas e dimorfismo (*Micrurus corallinus*) (MARQUES et al., 2006). Assim, se apenas uma espécie fosse estudada, ou estudada apenas em parte de sua área de ocorrência poderia generalizar-se de forma errônea informações sobre a reprodução em uma família, gênero ou mesmo espécie de serpente.

Hoje as restrições na importação de répteis, o risco na introdução de doenças exóticas à fauna, o crescente número de espécies ameaçadas no mundo, o interesse no estudo de venenos animais, entre outros, tornam a reprodução e a manutenção em cativeiro desses animais muito importante (MENGDEN et al., 1980; ALBERTS et al., 1998; GIBBONS, J. WHITFIELD et al., 2000; TOURMENTE et al., 2007;). No entanto, a ausência de cópulas ou problemas com a concepção, em parte devido ao desconhecimento ou dificuldade em mimetizar as condições ambientais

necessárias para essas espécies, tornam a reprodução em cativeiro limitada (ROSS; MARZEC, 1990).

A inseminação artificial e a transferência de embriões revolucionaram a criação de animais domésticos, sendo que estas técnicas fazem parte de uma série de estratégias para incrementar a reprodução e a formação de bancos de germoplasma de animais silvestres (WILDT, 1989), e vários autores consideram a inseminação artificial como uma das ferramentas que podem melhorar o desempenho reprodutivo dos répteis em cativeiro (MENGDEN et al., 1980; PLATZ et al., 1980; QUINN et al., 1989; LANGLADA et al., 1994; FAHRIG et al., 2007; MATTSON et al., 2007).

No entanto, os maiores obstáculos para o sucesso na reprodução de animais selvagens em cativeiro são o desconhecimento de informações básicas sobre essas espécies, incluindo a biologia reprodutiva (SWANSON, 2006). A reprodução assistida de répteis por sua vez, ainda é muito pouco explorada na literatura científica mundial, apesar de técnicas como a colheita e avaliação de sêmen, congelamento de sêmen, inseminação artificial, entre outras recentemente publicadas (TOURMENTE, M. et al., 2006; MATTSON et al., 2007; ZACARIOTTI et al., 2007; SAHATRAKUL et al., 2008).

Assim esse estudo visa preencher algumas dessas lacunas de conhecimento com o estudo de aspectos relacionados à reprodução das serpentes.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

1) Realizar a avaliação reprodutiva de machos de serpentes pela colheita de sêmen e estabelecer valores de referência de espermograma nas espécies de cascavéis estudadas;

2) Realizar a avaliação reprodutiva de fêmeas de serpentes pela ultra-sonografia dos ovários e detecção de prenhez nas espécies de cascavéis estudadas;

3) Desenvolver um método prático para avaliação da condição corporal e correlacioná-la com estado reprodutivo da serpente;

4) Desenvolver e testar protocolos para resfriamento e congelação de sêmen em serpentes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

O texto a seguir apresenta a revisão de literatura deste estudo.

3.1 ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DAS SERPENTES

Os ovários (Figura 1) são difusos e localizados próximos aos ovidutos. Os ovidutos por sua vez, são duas estruturas alongadas que estão ligadas às vaginas (Figura 2), e recebem os ovos após a ovulação e fecundação (ALMEIDA-SANTOS, 2005). Algumas espécies de serpentes (*Tantilla* sp.) apresentam dois ovários e um único oviduto (GREENE, 1997). As funções do oviduto são a produção de albúmen, produção da casca, placentação, estocagem de espermatozóides, entre outros (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Um aspecto interessante é a capacidade mitótica das oogônias na serpente adulta, à semelhança do que ocorre com a espermatogônia nos mamíferos (ROTHCHILD, 2003).

O testículo (Figura 3) é uma massa ovóide composta por túbulos seminíferos, células intersticiais e vasos sanguíneos; envolvido por tecido conjuntivo (túnica própria) e estão localizados na cavidade celomática onde, geralmente, o direito é mais cranial que o esquerdo em serpentes (DENARDO, 1996). Os ductos deferentes (Figura 3) ligam os testículos à papila genital na cloaca, próximo à base do pênis, onde existe o sulco espermático, já que répteis não possuem uretra peniana (VASSE, 1994). A porção mais distal dos ductos deferentes, diferenciada em algumas espécies, é denominada ampola e tem função relacionada ao armazenamento de espermatozóides no macho (SEVER, 2004). Na cloaca, a papila genital dos machos é o fim de uma via comum aos tratos genital (ductos deferentes) e urinário (rins) (OLIVEIRA et al., 2004).

Os machos dos lagartos e das serpentes possuem inúmeras características que não são observadas em outros répteis (LANCE, 2003), como por exemplo, o

órgão copulatório (hemipênis) que é duplo, sendo que apenas um dos pares é usado durante a cópula (FOX, 1977) (Figura 4).

Figura 1- Ovário de serpente (*Thamnophis sirtalis tetrataenia*). As setas indicam alguns dos folículos presentes no ovário

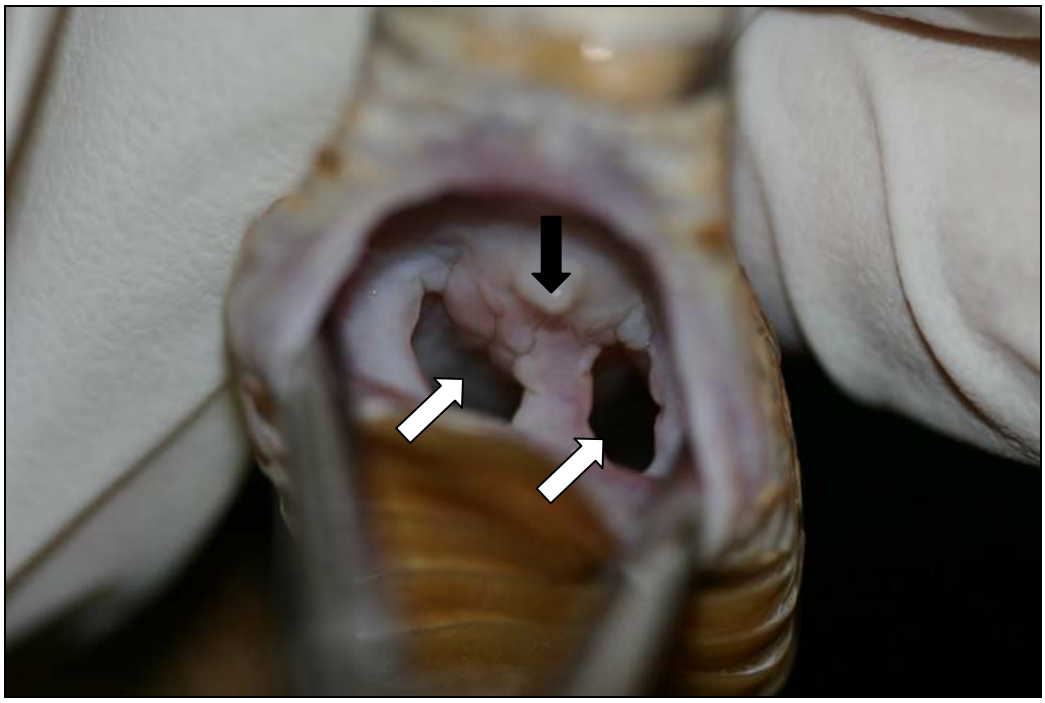

Figura 2- Região cloacal de uma fêmea de cascavel (*Crotalus r. ruber*) onde evidenciam-se as vaginas (setas brancas) e a papila genital (seta preta)

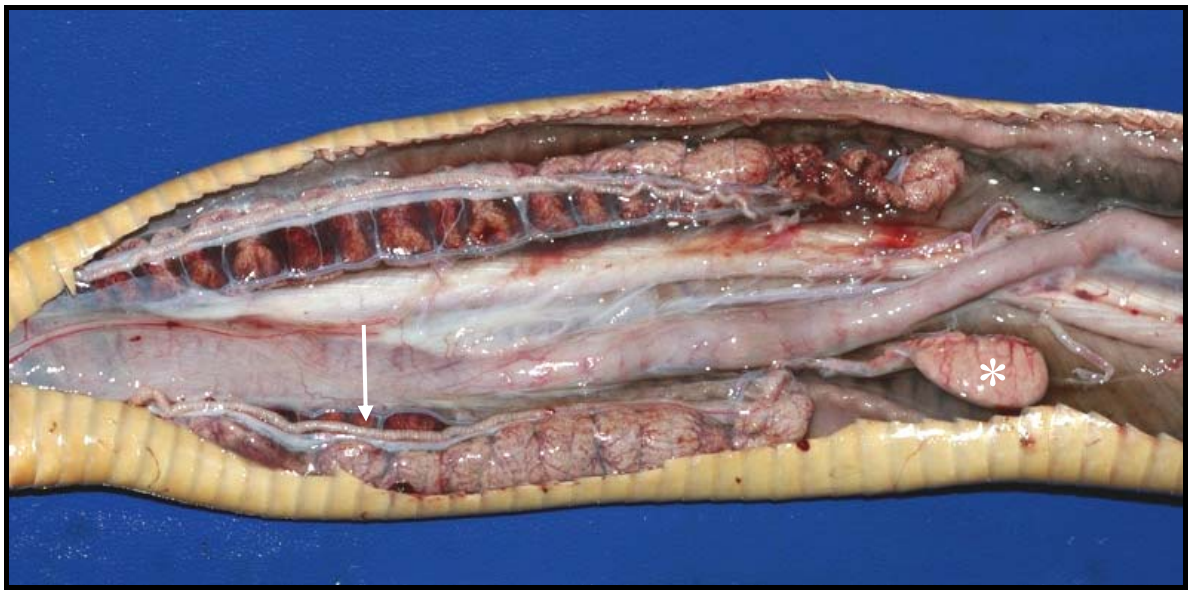

Figura 3- Testículo (asterisco) e ducto deferente (seta) em um macho adulto de cascavel (*Crotalus ruber ruber)*

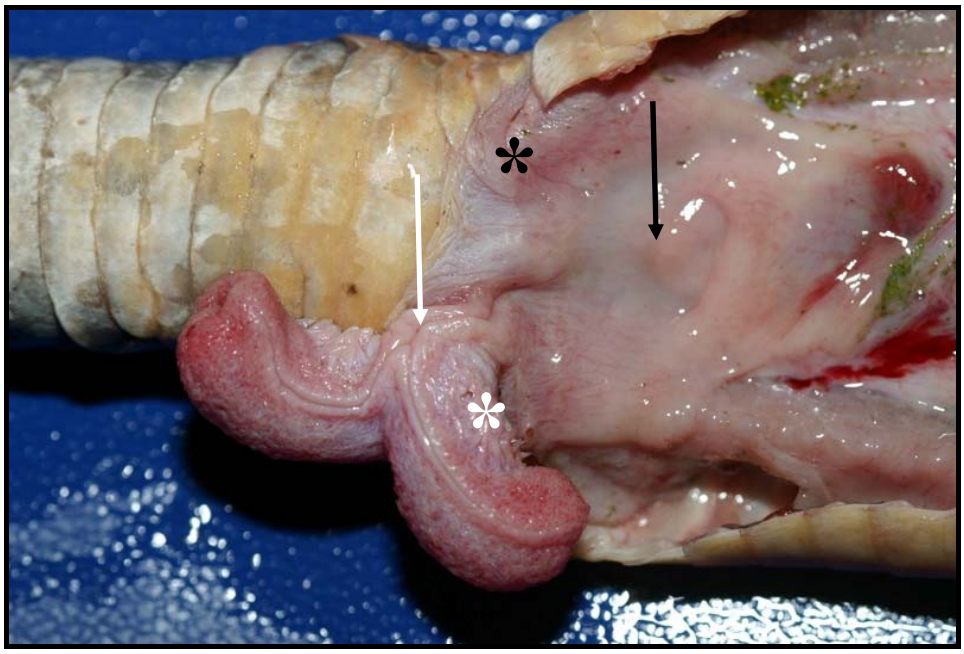

Figura 4- Região cloacal dissecada em macho adulto de cascavel (*Crotalus ruber*), evidenciando estruturas do trato reprodutor masculino: hemipênis esquerdo exposto (asterisco branco) e direito retraído (asterisco preto), papila genital (seta preta) e sulco genital (seta branca)

3.2 ESPERMATOGÊNESE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA DAS SERPENTES

A espermatogênese para algumas espécies de serpentes na América do Norte parece estar extremamente condicionada à elevação da temperatura e não a alterações do fotoperíodo. Em estudo sobre o controle ambiental da espermatogênese de *Crotalus viridis* foi constatada o início da espermatogênese apenas com a elevação da temperatura (ALDRIDGE, 1975) e em outro estudo com a espécie *Arizona elegans* a espermatogênese foi iniciada com a elevação da temperatura e ausência total da luz (ALDRIDGE, 1979).

A espermatogênese em serpentes é classificada em: Estágio 1 - túbulos seminíferos com presença predominante de espermatogônias e espermatócitos primários, e alguns espermatócitos secundários e espermátides; Estágio 2 – surgimento dos primeiros espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos; Estágio 3 - grande quantidade de espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos, e diminuição do número de espermatócitos secundários e espermátides; Estágio 4 - diminuição do número de espermatozóides, presença de apenas espermatogônias e espermatócitos primários; Estágio 5 - ausência de espermatozóides e uma ou duas camadas de espermatogônias ou espermatócitos primários (TSAI; TU, 2000).

A morfologia do espermatozóide das serpentes observada sob ultra-estrutura é basicamente composta de forma filiforme, acrossoma em forma de cone e cabeça alongada, distinção entre medula e cortex acrossomal, presença de *perfuratorium* no espaço sub-acrossomal, peça intermediária extremamente longa (sinapomorfia das serpentes) e envolvida por um sistema de multi-membranas, estruturas chamadas de corpos densos (possível transformação mitocondrial) ao longo da peça intermediária e presença de dois centríolos (proximal e distal) ao invés de um, como observado em mamíferos (AUSTIN, 1965; HAMILTON; FAWCETT, 1968; JAMIESON; KOELER, 1994; OLIVER et al., 1996; TOURMENTE et al., 2006).

3.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA DAS SERPENTES

O início de todo o processo para que a reprodução aconteça é a aquisição de energia (alimentação) de ambos os sexos. O custo energético para a reprodução é elevado nas fêmeas (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; AUBRET et al., 2002; BONNET, XAVIER et al., 2002; SHINE, 2003) devido à mobilização das reservas de gordura para a vitelogênese (SANTOS; LLORENTE, 2004), e embora este custo não esteja claro para os machos, alguns autores relatam que pode ser tão elevado quanto nas fêmeas (OLSSON et al., 1997; SHINE; MASON, 2005).

O ciclo vitelogênico no ovário é basicamente dividido em vitelogênese primária (folículos pequenos, arredondados e transparentes) e vitelogênese secundária (folículos maiores, arredondados ou ovais e variando de coloração branca a amarelada). O crescimento folicular durante a vitelogênese primária ocorre principalmente devido ao acúmulo de água no interior do folículo, enquanto que a vitelogênese secundária é a fase de maior crescimento folicular devido à deposição de vitelo (lipoproteínas) no interior do folículo (DENARDO, 1996; SANTOS; LLORENTE, 2004). A vitelogênese secundária pode ou não estar associada à cópula em serpentes (MEDONÇA; CREWS, 1990; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; TAYLOR; DENARDO, 2005).

No quadro 1 podemos observar os fatores que compõem o ciclo reprodutivo das serpentes (ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

Macho	**Fêmea**
Aquisição de energia	Aquisição de energia
Espermatogênese	Vitelogênese
Desenvolvimento de características sexuais secundárias	Sinalização do estro (ferormônios)
Comportamento de busca por cópulas	Corte e cópula
Dança-combate entre machos	Ovulação
Corte e cópula	Fertilização
	Gestação
	Parto
	Cuidados parentais

Quadro 1 Fatores que compõem o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de serpentes - São Paulo - 2008

Outro processo da fisiologia reprodutiva de inúmeras espécies de serpentes é a estocagem de espermatozóides, como parte da sua estratégia reprodutiva, separando por até alguns anos os eventos cópula e fecundação (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; YAMANOUYE et al., 2004; SIEGEL; SEVER, 2006).

A partir da fecundação, o desenvolvimento embrionário acontecerá no útero ou no ovo (ambiente externo), pois as serpentes possuem dois modos de reprodução: a viviparidade e a oviparidade. As espécies ovíparas põem ovos e a maior parte do desenvolvimento embrionário ocorre no ambiente, enquanto as vivíparas retêm os embriões no útero até o final da gestação com o parto (DENARDO, 1996; BLACKBURN, 2006). O vitelo acumulado pela fêmea durante a vitelogênese secundária no ovo servirá de substrato e energia para o crescimento embrionário, seja no ovo ou no útero da serpente (THOMPSON; SPEAKE, 2002).

Uma estratégia reprodutiva utilizada por várias espécies de serpentes é a estocagem de espermatozóides, que varia de alguns meses até alguns anos (ALDRIDGE, 2002; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; ALMEIDA-SANTOS. et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005). Recentemente foi proposto que uma série de peptidases poderiam estar envolvidas na sobrevida destes espermatozóides por tanto tempo (MARINHO et al., 2008).

A estocagem de espermatozóides parece ocorrer no oviduto com a contração da parede muscular uterina em formato de espiral, levando à formação de compartimentos preenchidos com espermatozóides (YAMANOUYE et al., 2004; SIEGEL; SEVER, 2006).

3.4 REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM RÉPTEIS

A reprodução assistida em répteis, existente na literatura científica, consiste basicamente da inseminação artificial aliada às técnicas de colheita, avaliação e congelação de sêmen e avaliação por ultra-sonografia dos ovários nas fêmeas. Esses temas serão apresentados ao longo desta revisão de literatura.

3.4.1 Colheita e avaliação de sêmen

Existem alguns relatos descrevendo técnicas de colheita de sêmen em répteis, uma importante etapa a ser desenvolvida antes da inseminação artificial.

Larsen e Cardeilhac (1984) realizaram a colheita de sêmen *post-mortem* em *Alligator mississippiensis* (aligátores) através da compressão dos ductos deferentes em um tubo de colheita. Platz et al. (1980) realizaram a colheita de sêmen utilizando a eletroejaculação com sucesso em alguns testudinos: *Chelonia mydas* (tartaruga-verde), Geochelone *elephantopus* (tartaruga-de-Galápagos) e *Pseudemys scripta elegans* (tigre d'água americano). Os testudinos de menor tamanho foram contidos manualmente enquanto os de maior porte eram suspensos com o auxílio de cintas sob o plastrão dos animais não permitindo o contado dos membros com o chão. Após massagem manual no interior da cloaca, estimulando a exposição do pênis, o transdutor do eletro-ejaculador era introduzido no reto do animal. Eram aplicados estímulos elétricos semelhantes às técnicas usadas em mamíferos selvagens e o sêmen que percorria o sulco ejaculatório era colhido em um tubo de ensaio (WOOD et al., 1982).

Sêmen foi obtido pela primeira vez em serpentes através da compressão do terço final do corpo do animal, no entanto, era comum a contaminação das amostras por fezes e urato (FITCH, H., 1960). Mengden et al. (1980) descreveram uma técnica para a colheita de sêmen em serpentes contidas fisicamente realizando massagens digitais na região ventral do terço final do animal e colhendo o sêmen, quase sem contaminação, diretamente da cloaca com o auxilio de uma seringa. As espécies utilizadas foram: *Elaphe subocularis* (*Ratsnake*), *E. obsoleta* (*Ratsnake*), *Epicrates inornatus* (*Rainbow boa*), *Eunectes notaeus* (sucuri-amarela), *Python anchietae* (píton-de-angola), *P. timoriensis* (píton-do-timor), *Bitis gabonica* (víbora-do-gabão) e *Notechis scutatus* (cobra-tigre). Quinn (1989) descreveu a colheita de sêmen com auxílio da eletroejaculação, seguida de massagens digitais na região ventral de *Thamnophis marcianus* (*Checkered garter snake*), mas a contaminação por fezes e uratos era comum. Sêmen foi colhido em *Boa constrictor occidentalis* (jibóia argentina) através do método proposto por Mengden et al. (1980) (TOURMENTE et al., 2007).

Zacariotti et al. (2007) realizaram a colheita de sêmen em cascavéis utilizando a técnica descrita por Mengden et. al, mas modificada com uso de anestésico local. A lidocaína 1% na dose de 15 mg/Kg era aplicada em quatro diferentes pontos ao redor da cloaca, permitindo o relaxamento da mesma e a exposição da papila genital, o que favorece um maior controle sobre o procedimento para evitar contaminação. Após as massagens, o sêmen era colhido com auxílio de uma seringa de 1 ml.

Outro método descrito para serpentes consiste na eutanásia dos machos, retirada dos ductos deferentes e colheita do sêmen (LANGLADA et al., 1994; TOURMENTE et al., 2006; TOURMENTE et al., 2008), porém este método não é indicado, pois implica na morte do indivíduo.

Não existem até o momento na literatura científica relatos de colheita de sêmen em lagartos, apenas descrições da morfologia espermática ou da espermatogênese, utilizando técnicas de histologia e microscopia eletrônica. As avaliações são realizadas após a remoção e fixação de estruturas como testículos e dutos deferentes. No entanto, existe um projeto em andamento na Nova Zelândia para o desenvolvimento de tais técnicas em lagartos (BELL, 2008).

O passo seguinte é a avaliação do espermograma, muito importante para avaliar o potencial de um macho específico em um programa de reprodução, seja essa natural ou assistida, além de gerar informações para o conhecimento de parâmetros normais para a espécie. No entanto, existem poucos parâmetros de espermograma publicados para répteis (MENGDEN et al., 1980; LARSEN; CARDEILHAC, 1984; SAMOUR, 1986; LANGLADA et al., 1994; TOURMENTE et al., 2006; ZACARIOTTI; DURRANT, 2006; MATTSON et al., 2007; TOURMENTE. et al., 2007; ZACARIOTTI et al., 2007; SAHATRAKUL et al., 2008).

Freqüentemente o sêmen é diluído antes da avaliação, especialmente em serpentes devido à sua alta concentração. Os meios usados para a cultura de células M199 e Ham´s F-10 têm mostrado bons resultados para a diluição inicial e avaliação do sêmen em diversas espécies.

Uma avaliação rápida da concentração aparente auxilia na escolha da proporção de diluição da amostra e estudos realizados com serpentes demonstraram que uma diluição ao redor de 1:500 mostrou-se adequada para a avaliação da motilidade e vigor espermático, bem como da morfologia do

espermatozóide (MATTSON et al., 2007; TOURMENTE et al., 2007;; ZACARIOTTI et al., 2007).

É importante ressaltar que os répteis são animais ectotérmicos, assim o uso de placas ou platinas aquecedoras para a manutenção de equipamentos e amostras a uma temperatura mais elevada que o ambiente desnecessário e temperaturas entre 25 e 27°C utilizadas com sucesso (FAHRIG et al., 2007; TOURMENTE et al., 2007; ZACARIOTTI et al., 2007).

Adicionalmente às avaliações citadas, colorações específicas podem ser realizadas para tornar a caracterização da amostra mais completa. Atualmente a coloração simples de acrossoma e de peça intermediária utilizando a Diaminobenzidina (DAB) estão validadas apenas para cascavel (INNOCENTI et al., 2006), mas podem ser usadas em outras espécies em caráter experimental.

3.4.2 Congelação e resfriamento de sêmen

A literatura científica contempla muito pouco sobre técnicas para o congelamento ou o resfriamento de sêmen em répteis, e os diluidores citados são TEST-gema, Ham´s F 10, água de coco e um diluidor a base de leite (MENGDEN et al., 1980; LARSEN; CARDEILHAC, 1984; FAHRIG et al., 2007; MATTSON et al., 2007). Apenas as publicações mais recentes (FAHRIG et al., 2007; MATTSON et al., 2007) possuem descrições detalhadas sobre os protocolos, embora contemplem apenas o resfriamento do sêmen

3.4.3 Avaliação ultra-sonográfica do trato reprodutivo

A história natural e biologia reprodutiva dos répteis é o foco de inúmeros estudos há pelo menos seis décadas, no entanto a eutanásia dos animais para os estudos é muito comum, não permitindo repetidas avaliações de um mesmo

indivíduo (GILMAN; WOLF, 2007). Portanto, a ultra-sonografria é uma ferramenta muito importante no estudo da biologia reprodutiva nos répteis permitindo a repetida avaliação de um mesmo indivíduo (TAYLOR; DENARDO, 2005; GILMAN; WOLF, 2007) ou mesmo no diagnóstico de enfermidades do trato reprodutivo de répteis (SCHUMACHER, 2001; RIVERA, 2008).

A ultra-sonografia tem sido empregada na avaliação reprodutiva de testudinos (TODD R. ROBECK, 1990), lagartos (MORRIS et al., 1996; BRETT D. GARTRELL, 2002; MARTÍNEZ-TORRES et al., 2006; GILMAN; WOLF, 2007), serpentes (SMITH, C. R. et al., 1989; TAYLOR; DENARDO, 2005; BETKOWSKY et al., 2006; ZACARIOTTI; DURRANT, 2006), e crocodilianos (TUCKER; LIMPUS, 1997; COUTINHO; CAMPOS, 2005), com o objetivo de mensurar e contar folículos ou detectar a presença de ovos ou embriões.

Transdutores de 7,5 a 12 MHz são úteis na maioria dos répteis de pequeno e médio porte, enquanto transdutores entre 2,5 a 5 MHz são necessários naqueles de maior porte (TODD R. ROBECK, 1990; COUTINHO; CAMPOS, 2005; BETKOWSKY et al., 2006; ZACARIOTTI; DURRANT, 2006; RIVERA, 2008).

Alguns autores relatam que a visualização do corpo lúteo em répteis é difícil ao exame ultra-sonográfico (TAYLOR; DENARDO, 2005; MARTÍNEZ-TORRES et al., 2006).

O diâmetro dos folículos ovarianos varia de acordo com a fase reprodutiva e o tamanho do réptil. Em cascavéis (*Crotalus atrox*) folículos menores do que seis mm são classificados como não-vitelogênicos e os maiores que dez mm como vitelogênicos (TAYLOR; DENARDO, 2005; BETKOWSKY et al., 2006), enquanto em outras espécies (*Tantilla* sp.) folículos maiores do que 5 mm já são considerados vitelogênicos (SANTOS-COSTA et al., 2006).

Estudos descritivos mais profundos sobre a morfologia dos ovários durante diferentes fases do ciclo reprodutivo dos répteis, com utilização da ultra-sonografia, são necessários para auxiliar na determinação do melhor momento para a inseminação artificial.

3.5 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial foi realizada, com algum sucesso, apenas em *Thamnophis marcianus* (*Checkered garter snake)* (QUINN et al., 1989), *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) (LANGLADA et al., 1994), Elaphe guttata (*Corn snake*) (MATTSON et al., 2007) e sem sucesso em *Python anchietae (Píton de angola)* (MENGDEN et al., 1980). É importante ressaltar que nos casos citados anteriormente, a inseminação artificial tem gerado ninhadas reduzidas em comparação com aquelas produzidas naturalmente através de cópula.

Larsen e Cardeilhac (1984) realizaram sem sucesso a inseminação artificial em *Alligator mississippiensis* (jacaré americano) e até o momento não foram descritos na literatura científica procedimentos para a inseminação artificial em lagartos ou quelônios.

Nas técnicas de inseminação descritas os autores utilizaram sêmen fresco, depositando-o no oviduto das fêmeas. Assim a localização da entrada nos ovidutos dentro da cloaca é muito importante. A grande maioria dos répteis possui dois ovidutos, mas estes podem ter aberturas individuais (testudinos e crocodilianos) ou duplas (lagartos e serpentes) na cloaca. Assim durante o procedimento de inseminação é importante certificar se os dois ovidutos estão sendo inseminados (LANGLADA et al., 1994; MATTSON et al., 2007).

As técnicas de inseminação descritas usam uma sonda, flexível ou rígida, com diâmetro adequado ao tamanho da fêmea, já que o oviduto é bastante delgado, acoplada a uma seringa contendo o sêmen. A determinação do momento da inseminação em répteis ainda não está definida e os pesquisadores utilizam como referência o período que normalmente corresponderia à fase de cópula para a espécie (LANGLADA et al., 1994; MATTSON et al., 2007).

A reprodução de répteis, natural ou assistida, representa um grande desafio, com raras exceções. O pequeno sucesso obtido com uso das técnicas de reprodução assistida aplicadas se deve em grande parte a escassez de informações sobre fisiologia reprodutiva dos répteis. Por exemplo, ainda não se sabe até que ponto o estímulo da cópula é importante na indução de ovulação ou vitelogênese de inúmeras espécies (MENDONÇA; CREW, 1990).

Apesar das limitações, cada vez mais surgem estudos utilizando répteis como modelos experimentais e futuramente a reprodução assistida será uma realidade para esses animais como é para diversas espécies.

3.6 BIOLOGIA DAS SERPENTES ESTUDADAS

Atualmente existem 3.149 espécies de serpentes no mundo (UETZ, 2008) sendo que as cascavéis do gênero *Crotalus* são compostas por 31 espécies, a maior parte nativa dos Estados Unidos e México. Neste trabalho foram estudados aspectos da reprodução de três dessas espécies: *Crotalus ruber ruber* (*Red diamond rattlesnake*) *Crotalus oreganus helleri* (*Southern pacific rattlesnake*) e *Crotalus mitchelli phyrrus (Speckled rattlesnake)*. O texto a seguir apresenta uma breve descrição sobre a biologia de cada uma dessas espécies:

A *Crotalus ruber ruber* é conhecida como *Red diamond rattlesnake* por apresentar uma coloração geral avermelhada (Figura 5) e o adulto tem um comprimento total que varia entre 760 e 1650 mm (KLAUBER, 1982).

A *C. r. ruber* alimenta-se principalmente de pequenos mamíferos (roedores e coelhos), lagartos e eventualmente aves. Apesar da densidade de presas afetar a dinâmica populacional de *C. r. ruber,* locais para fêmeas prenhes se abrigarem e as serpentes hibernarem são fatores mais limitantes (KEENLYNE, 1972).

Essa espécie alterna o período de atividade entre diurna nos períodos mais frios do ano e noturna nas estações mais quentes. Klauber (1972) sugere após 16 anos de estudos na região de *San Diego*, que a *C. ruber* pode ser ativa durante o ano todo, com o pico da atividade nos meses de corte e cópula entre abril e maio (primavera), com o nascimento de filhote (três a 20 filhotes) durante o verão.

A *C. r. ruber* ocorre ao Sul da Califórnia e em toda *Baja California* no México (Figura 6), onde é encontrada em áreas rochosas com densa vegetação arbustiva, áreas de deserto e cactos, áreas cultivadas e mesmo ninho de roedores (KLAUBER, 1982; BROWN et al., 2005; IUCN, 2008).

Figura 5- Macho adulto da *Crotalus ruber ruber* (macho 120) encontrado em área com rochas

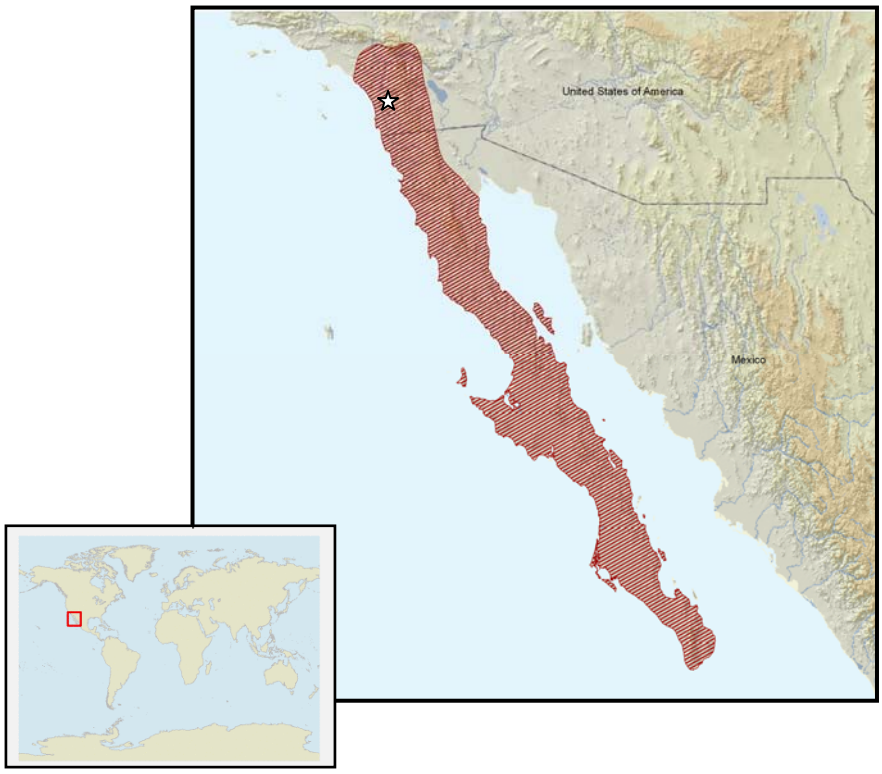

Figura 6- Mapa representando a distribuição geográfica (área em vermelho) da *Red Diamond Rattlesnake (Crotalus ruber ruber*) (adaptado de IUCN, 2008). A estrela destaca a área onde ocorreu este estudo

A IUCN (2008) lista o estado de conservação desta espécie como *Least concern* ou “pouco preocupante” devido a ampla distribuição geográfica e grande número de sub-populações na natureza. No entanto, o Estado da Califórnia lista essa espécie como *Species of Special Concern* ou espécie que merece uma “preocupação especial”, pois essas populações estão em declínio com a destruição do hábitat costeiro pela ocupação humana.

Outra espécie estudada é a *Crotalus oreganus helleri* (Figura 7) que apresenta um comprimento variando entre 760 e 1370 mm. Possui hábitos alimentares similares às outras espécies descritas, além de anfíbios, insetos e eventualmente outras serpentes. É importante ressaltar que existe a variação ontogenética na dieta desta espécie, sendo que os filhotes se alimentam principalmente de lagartos e os adultos de roedores (LABONTE, 2005).

Durante as estações mais frias pode ser encontrada durante o dia aquecendo-se ao sol e mesmo sobre arbustos em áreas de vegetação mais densa. Nas estações mais quentes, essa serpente é mais ativa durante o período noturno como as outras espécies citadas. Essa espécie parece apresentar dois picos de atividade, durante a primavera e no outono (DUGAN; HAYES, 2005). A literatura apresenta de maneira controversa a fase de cópula para *C. oreganus helleri* na primavera e/ou verão, com dança-combate entre machos durante a primavera e o verão (Figura 8) (ALDRIDGE, 2002; ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

Aldridge (2002) demonstrou que *Crotalus viridis viridis* (espécie filogeneticamente próxima) apresenta a hipertrofia do segmento sexual renal apenas durante o verão, enquanto a *C. oreganus helleri* tem essa hipertrofia durante o verão e provavelmente no inverno e na primavera. Como a hipertrofia do segmento sexual está associada à elevação dos níveis de testosterona (JOHNSON et al., 1982; SCHUETT, GORDON W. et al., 1997), esse fato pode explicar a observação de cópulas na primavera e verão em *C. oreganus helleri.*

Essa subespécie ocorre do sul da Califórnia até a porção central da *Baja California* (Figura 9), onde habita desde a costa até regiões de floresta de pinheiros nas montanhas, sobrevivendo inclusive em áreas degradadas.

Figura 7- Macho adulto da *Crotalus oreganus helleri* (macho 47) capturado em área aberta com vegetação arbustiva

Figura 8- Dois machos de *Crotalus oreganus helleri* em dança-combate em natureza (San Diego, CA, EUA) durante o verão. Foto: John Kinkaid (03/07/2004)

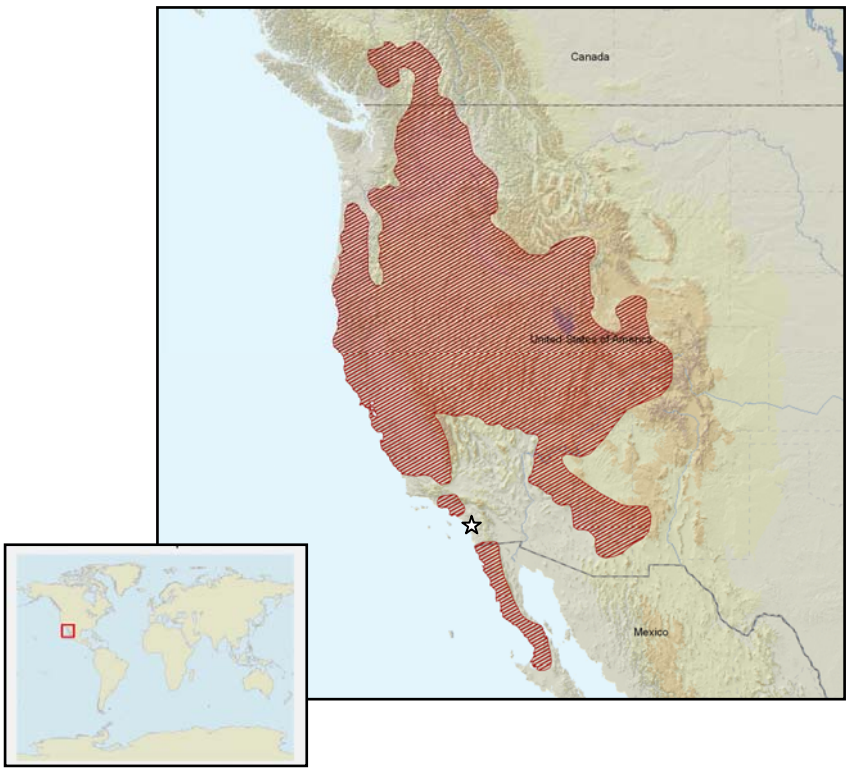

Figura 9- Mapa representando a distribuição geográfica (área em vermelho) da *Western Rattlesnake* (*Crotalus oreganus*), incluindo a *Southern Pacific Rattlesnake (Crotalus oreganus helleri*) uma das nove subespécies descritas (adaptado de IUCN, 2008). A estrela destaca a área onde ocorreu este estudo

A última espécie estudada é a *Crotalus mitchellii phyrrus*, que apresenta uma coloração bem variada desde alaranjado, rósea até cinza (Figura 10). Essa espécie tem um comprimento que varia de 580 a 762 mm, porém existe o relato de um indivíduo com 1320 mm. Alimenta-se de pequenos mamíferos, lagartos e eventualmente aves, como as outras espécies.

Parece ser a espécie mais especializada em hábitat rochosos das três espécies descritas neste estudo, sendo às vezes encontrada em áreas com vegetação arbustiva e suculenta e raramente próxima à costa litorânea (KLAUBER, 1982). Cópulas são descritas na primavera e nascimento de filhotes (3 a 11 filhotes) no fim do verão (ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

A IUCN (2008) estima uma população aproximada de 100.000 *C. mitchellii* (duas subespécies) distribuídas em inúmeras populações ao longo da sua área de ocorrência (Figura 11), e classifica seu estado de conservação como *Least Concern.*

Figura 10- Macho adulto da *Crotalus mitchellii phyrrus* (macho 21) capturado em área de encosta rochosa

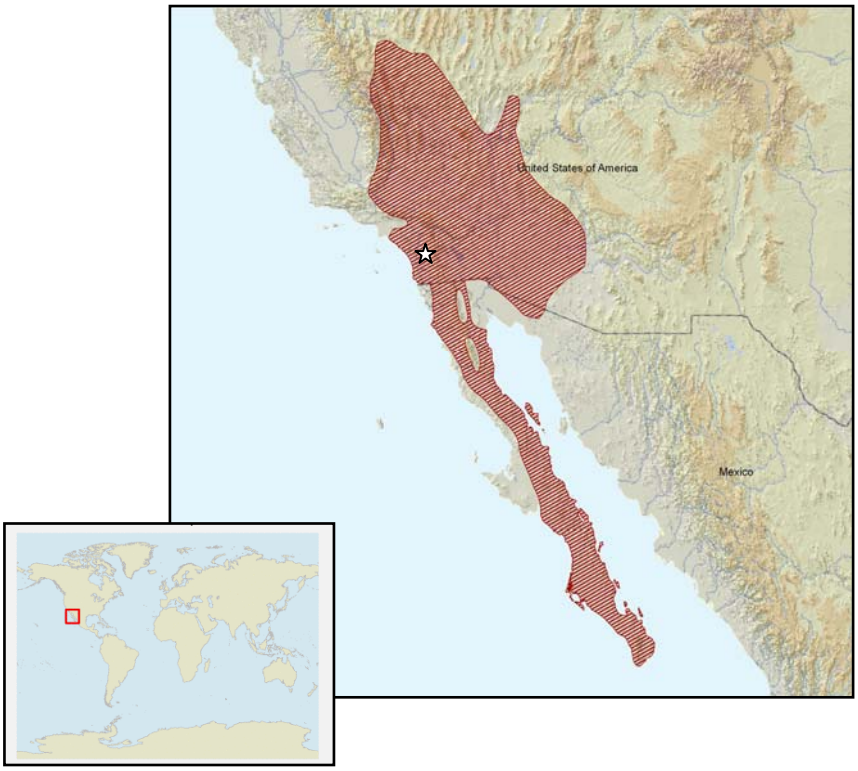

Figura 11- Mapa representando a distribuição geográfica (área em vermelho) da *Speckled Rattlesnake (Crotalus mitchellii*), incluindo a *Southwestern Speckled Rattlesnake (Crotalus mitchellii phyrrus*) uma das duas subespécies conhecidas (adaptado de IUCN, 2008). A estrela destaca a área onde ocorreu este estudo

Apesar de nenhuma das espécies de cascavéis citadas nesta revisão estarem ameaçadas de extinção (IUCN, 2008), a conservação de suas populações é muito importante, especialmente nas espécies de ampla distribuição, mas com populações isoladas. Um estudo recente demonstrou ser mais importante para a conservação a manutenção da variabilidade genética de diferentes populações de *C. ruber, C. mitchelli, C. tigris* e *C. cerastes* em sua área de ocorrência nos desertos, do que basear-se unicamente nas suas subespécies (DOUGLAS et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir estão descritos os materiais e métodos utilizados no experimento I: Avaliação reprodutiva de serpentes de vida livre do Sul da Califórnia e experimento II: Congelação de sêmen em serpentes.

4.1 INTRODUÇÃO

Esse estudo foi desenvolvido pela parceria entre a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e a *Zoological Society of San Diego* (ZSSD), localizada na Califórnia (CA), Estados Unidos.

A *ZSSD* foi fundada em 1916 pelo Dr. Harry Wegeforth, sendo inicialmente composta pelo Zoológico de San Diego. Em 1969, a *ZSSD* assinou um acordo com a Prefeitura de San Diego para administrar uma reserva ecológica de 1.800 acres na região do San Pasqual Valley, na Cidade de Escondido (CA), onde mais tarde foi construído o parque safári conhecido como *Wild Animal Park* (*WAP*). Em 2004 foram inauguradas as novas instalações do centro de pesquisas *Conservation and Research for Endangered Species* (*CRES*), conhecido como o maior do mundo localizado em um zoológico (MCKEEVER, 2005).

O *CRES* possui a maior parte da sua infra-estrutura de 4.645 m² destinada às pesquisas científicas nas áreas de Ecologia Animal, Ecologia Vegetal, Biologia Comportamental, Genética, Patologia Animal e Fisiologia Reprodutiva, voltadas principalmente para a conservação de espécies ameaçadas de todo o mundo.

Em parceria com a Dr^{a}. Barbara Durrant, chefe da Divisão de Fisiologia Reprodutiva do *CRES* foi desenvolvido um estudo sobre aspectos reprodutivos das serpentes nativas da reserva ecológica adjacente ao *CRES.*

4.2 ÁREA DO ESTUDO

A reserva ecológica mantida pela *ZSSD* tem grande importância para a conservação da biodiversidade. Esta área é parte dos 24,7% remanescentes da Província Florística da Califórnia, que é considerada um *Hotspot* pela *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*, isto é, uma região de alta biodiversidade, alto endemismo e sob alto grau de ameaça (MITTERMEIER et al., 2004). No Brasil, a Mata Atlântica e o Cerrado são exemplos de *Hotspot* pela IUCN (IUCN, 2008). Além disso, durante estudo realizado previamente pelo Laboratório de Ecologia Animal do *CRES*, nessa área foi encontrada a maior diversidade de serpentes do Sul da Califórnia, totalizando 16 espécies (ALBERTS, 2002).

A reserva ecológica tem uma área aproximada de 1.000 acres (Figura 12), composta por formações vegetais do tipo *Coastal Sage Scrub* (Figura 13 B) e Chaparral (Figura 13 A e 13 C), características do Sul da Califórnia.

O clima é do tipo Mediterrâneo caracterizado por verões extremamente quentes e secos e invernos frios e úmidos.

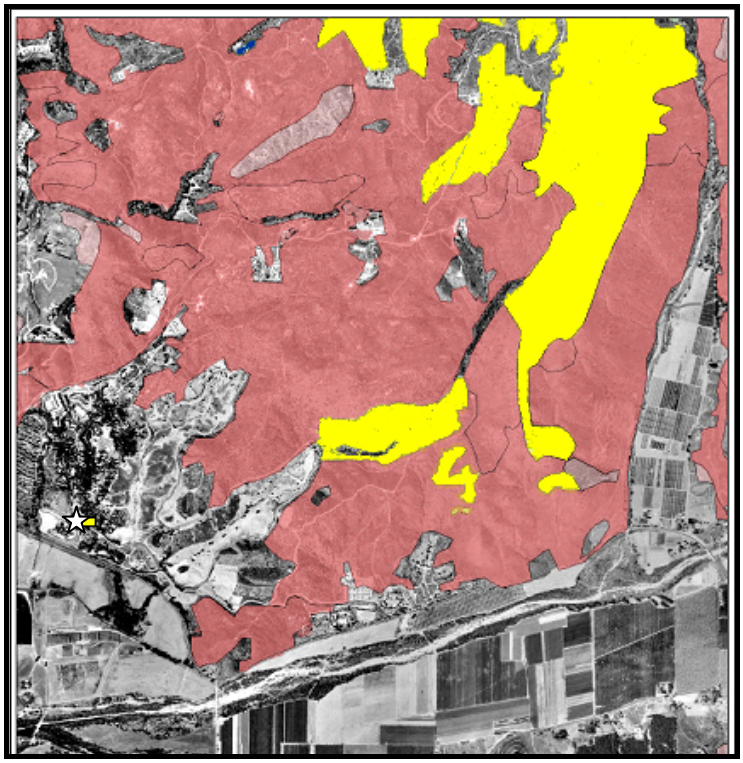

Figura 12- Foto aérea da área do *Wild Animal Park*, (Escondido, CA, EUA). As áreas de *Coastal Sage Scrub* e *Chaparral* estão representadas em vermelho e amarelo, respectivamente. A estrela indica a localização do CRES

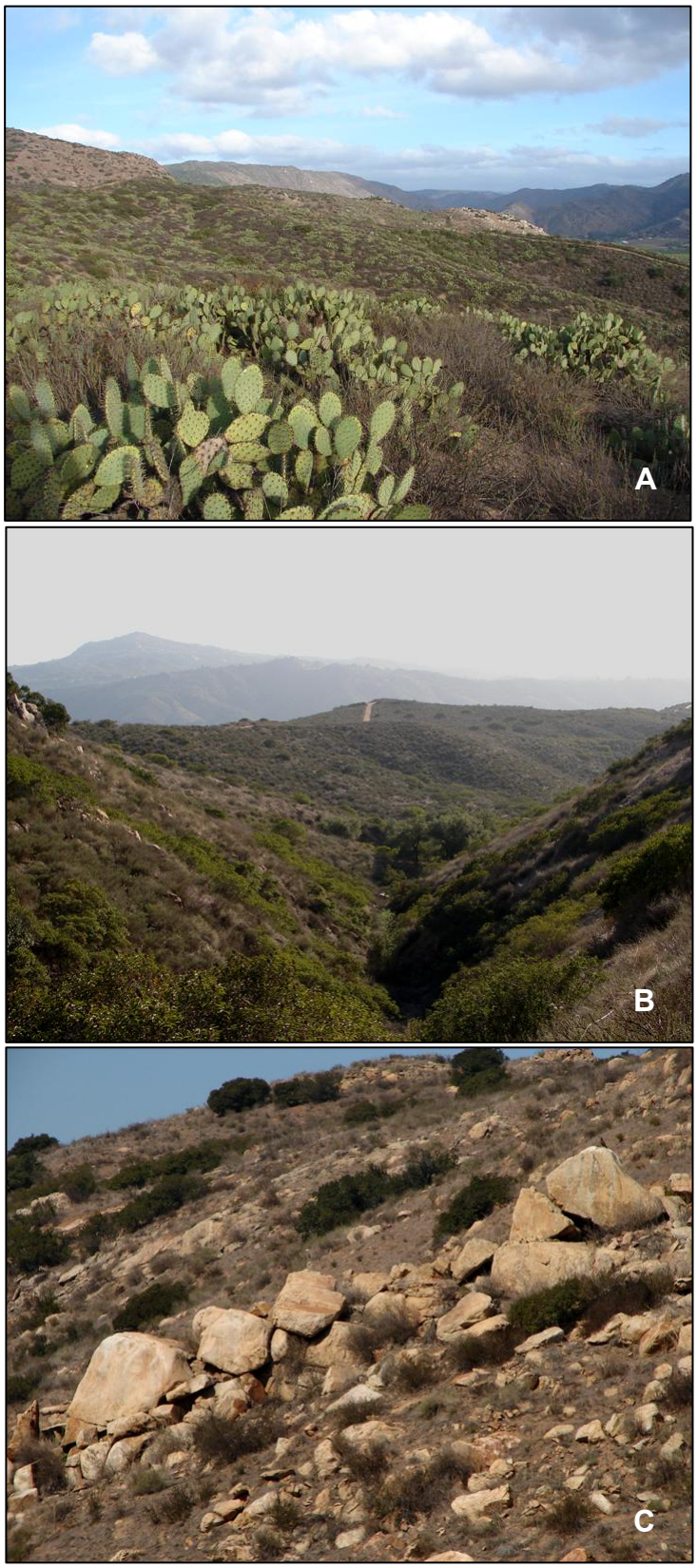

Figura 13- Formações vegetais encontradas na área da reserva ecológica (Escondido, CA, EUA). A) Vegetação do tipo *Chaparral* com predominância de cactos (Opuntia sp.). B) Vegetação do tipo *Coastal Sage Scrub*. C) Rochas de granito em meio à vegetação tipo *Chaparral*

4.2.1 Colheita de dados

A seguir serão descritas as metodologias utilizadas para colheita de dados nos trabalhos de campo e laboratório.

4.2.2 Trabalho de campo

No período de abril de 2005 a agosto 2006 foram realizadas aproximadamente 1.500 horas de busca ativa por serpentes pelo método de Procura Visual Limitada por Tempo (PVLT). A PVLT consiste no deslocamento a pé, lentamente, à procura de serpentes em todos os microambientes visualmente acessíveis (SAWAYA, 2003). Algumas serpentes também foram capturadas por terceiros (tratadores e guardas do *WAP*).

As serpentes localizadas foram capturadas com auxílio da mão, gancho e pinção (*Gentle Giant snake tong*®, *Midwest*®, EUA) e acondicionadas em caixas plásticas transparentes. As coordenadas geográficas foram registradas com auxílio de GPS (eTrex®, Garmin®, EUA), para a posterior soltura no mesmo local da captura. As serpentes foram levadas ao laboratório para as avaliações e mantidas nas mesmas caixas plásticas até a soltura que ocorria no máximo 24 horas após a captura.

Embora este estudo não tenha sido delineado para colheita de parâmetros ecológicos, algumas informações obtidas serão apresentadas nos resultados e discussão.

4.2.3 Trabalho de laboratório

As serpentes capturadas foram transportadas ao laboratório de Fisiologia Reprodutiva do *CRES,* para a colheita de dados e amostras.

Após a pesagem em balança digital com precisão de 5 gramas (SC-2010 Baby Scale, Midwest®, EUA), as serpentes foram contidas fisicamente com auxílio de tubo plástico e gancho. Dados morfológicos como comprimentos rostro-cloacal (CRC) e total (CT) foram obtidos com auxílio de fita métrica e estão expressos em centímetros.

Foi proposta a avaliação subjetiva da condição corporal (Figura 14) das serpentes, segundo as classes:

Classe 1- Musculatura axial bem desenvolvida e costelas dificilmente palpáveis;

Classe 2- Musculatura axial desenvolvida e costelas facilmente palpáveis;

Classe 3- Musculatura axial pouco desenvolvida, vértebras e costelas facilmente palpáveis.

Além da condição corporal, também foi calculado o índice de massa corpórea segundo a fórmula: (comprimento rostro-cloacal)^3/ massa (BEYER, 1987).

Após a sexagem pela exposição dos hemipênis, os machos e fêmeas eram submetidos à avaliação reprodutiva. Nos machos foi colhido sêmen para avaliação e os experimentos de congelação, enquanto as fêmeas eram submetidas ao exame de ultra-sonografia para avaliação dos ovários e detecção de prenhez.

Ao final dos procedimentos as serpentes eram marcadas com numeração no guizo (Figura 7) e soltas no mesmo local em que foram capturadas.

É importante salientar que todos os procedimentos deste projeto foram aprovados pelas Comissões de ética e experimentação animal da *ZSSD* (*IACUC*) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Em todas as avaliações preocupou-se em não superar 20 minutos de procedimento com os animais sob contenção. Durante todas as avaliações a maioria das serpentes mostrou-se relaxada e nenhum efeito negativo importante foi constatado, sendo inclusive observado o comportamento de corte em natureza no dia seguinte à soltura de indivíduos manejados no projeto.

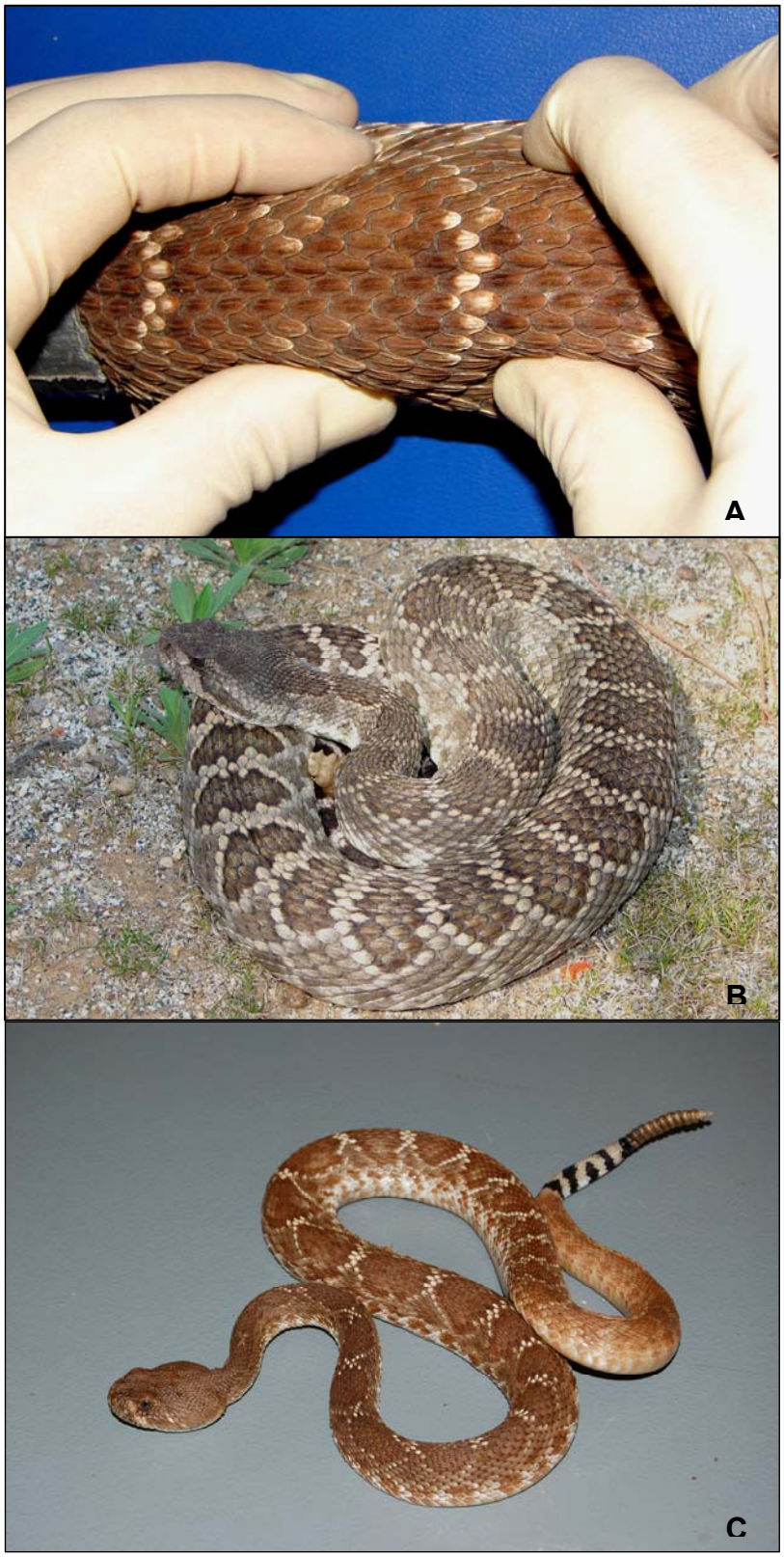

Figura 14- Diferentes condições corporais observadas em cascavéis no estudo. A) Exame de condição corporal em uma cascavel (*Crotalus ruber ruber*) B) Condição corporal classe 3 ou muito boa em cascavel (*Crotalus oreganus helleri*). C) Condição corporal classe 1 ou ruim em cascavel (*Crotalus ruber ruber*)

4.2.4 Avaliação reprodutiva dos machos

Para a avaliação reprodutiva dos machos foi colhido sêmen por massagens ventrais e uso da anestesia local (ZACARIOTTI et al., 2007).

O sêmen colhido foi avaliado quanto aos seguintes aspectos:

- **Volume**: estimado com auxílio de micropipeta automática de volume variável (Eppendorf, EUA).
- **Motilidade e Vigor**: para avaliação do vigor e da motilidade, o sêmen foi previamente diluído (1/500) em meio de cultura de células (Ham´s – F10, Sigma, EUA), devido à sua alta concentração. As amostras foram avaliadas em microscópio de luz, sob aumento de 100 vezes. A motilidade foi determinada pela porcentagem (%) de espermatozóides móveis na amostra. O vigor foi determinado numa escala de 0 a 5 (0= ausência de motilidade, 1= ausência de motilidade progressiva, 2= motilidade progressiva lenta, 3= movimentos laterais da cabeça do espermatozóide acompanhados de motilidade progressiva lenta, 4= motilidade progressiva rápida, 5= motilidade progressiva muito rápida), segundo os critérios descritos por Zacariotti (2007).
- **Integridade acrossomal**: avaliada pela coloração simples de acrossoma proposta por Pope *et al*. (1991) e validada por Innocenti *et al.* (2006).
- **Integridade membrana celular**: avaliada pela coloração eosina-nigrosina.

Em virtude do pequeno volume das amostras colhidas (0,5 a 13 µL) e o aproveitamento das amostras na realização dos experimentos de congelação de sêmen, não foi possível avaliar concentração ou morfologia espermática das amostras.

4.2.5 Avaliação reprodutiva das fêmeas

As fêmeas já contidas fisicamente em tubo plástico foram submetidas ao exame de ultra-som para avaliação dos ovários ou gestação (TAYLOR; DENARDO,

2005), submergindo o terço final do corpo da serpente em água. Informações sobre número de folículos, diâmetro do menor e maior folículo, bem como a ocorrência de gestação e número de filhotes foram registradas para as fêmeas avaliadas.

4.3 EXPERIMENTO II: CONGELAÇÃO DE SÊMEN EM CASCAVÉIS

Foram colhidas amostras de sêmen de diferentes espécies de cascavel para os testes de congelação durante o experimento I e também *post-mortem* de serpentes mantidas em cativeiro no Zoológico de San Diego. As colheitas de sêmen *post-mortem* foram realizadas segundo descrito por Langlada (1994).

Em conseqüência da inexistência de protocolos bem definidos para a congelação de sêmen de serpentes, foram realizados testes para resfriamento e congelação de sêmen de diferentes espécies de cascavel com o principal objetivo de desenvolver um protocolo.

Assim sendo, as amostras foram divididas aleatoriamente e testadas frente a diferentes diluidores, crioprotetores em diferentes concentrações e diferentes protocolos de congelação.

Os dois diluidores seminais utilizados foram Test-gema e diluidor Lake's (anexo 1) segundo as formulações disponíveis em literatura (LAKE, 1960; LAKE; RAVIE, 1984; POPE et al., 1989).

As amostras foram resfriadas a partir da temperatura ambiente até 4ºC em geladeira já misturadas à fração A dos diluidores testados. Simultaneamente a fração B (diluidor + crioprotetor) também foi resfriada também até 4ºC (velocidade de resfriamento 0,7ºC/min), e após atingir essa temperatura, ambas as frações foram misturadas na proporção 1:1 e aguardou-se 20 minutos antes de iniciar o protocolo de congelação. O tempo de 20 minutos para o equilíbrio do diluidor com crioprotetor e a amostra resfriada foi pré-estabelecido de acordo com os padrões de congelação de sêmen utilizados na rotina do Laboratório de Fisiologia Reprodutiva do *CRES*.

Os protocolos de congelação utilizados estão descritos a seguir:

- **Protocolo 1** (*pellet*): consistia no gotejamento da amostra em nitrogênio líquido, ocorrendo a congelação imediata e a formação de *pellets*.
- **Protocolo 2** (1ºC/min): consistia na utilização de um recipiente específico para congelação (5100 Cryo 1°) (Figura 15), contendo álcool isopropílico e um suporte para as amostras. O recipiente foi resfriado até 4ºC junto com as amostras já diluídas nas frações A e B em refrigerador comum. Após o resfriamento das amostras, este foi colocado em freezer a -80ºC permitindo a congelação em velocidade aproximada de 1ºC/min até -80ºC. Após um período de 4 horas as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196ºC).

Figura 15- Recipiente específico para congelação (5100 Cryo 1°, *Nalgene*, EUA) utilizado no protocolo de congelamento 2

- **Protocolo 3 e 4** (máquina de congelação): as amostras, após atingirem 4ºC, foram colocadas em máquina de congelação (CryoMed Inc., Mt. Clemens, Michigan, EUA) e submetidas a dois diferentes programas (1.1 e 2.1), descritos abaixo:

Protocolo 3 (*CryoMed 1.1*)

a) Manter a 4ºC por 10 minutos
b) Resfriar amostra a 1ºC/min até -4ºC
c) Resfriar câmara a 40ºC/min até -40ºC
d) Resfriar câmara a 20ºC/min até -13ºC
e) Resfriar amostra a 1ºC/min até -20ºC
f) Resfriar câmara a 50ºC/min até -80ºC
g) Manter à -80ºC por 10 minutos
h) Colocar amostra em nitrogênio líquido

Protocolo 4 (*CryoMed 2.1*)

a) Manter a 4ºC por 10 minutos
b) Resfriar amostra a 1ºC/min até -8ºC
c) Manter à -8ºC por 2 minutos
d) Resfriar amostra a 3ºC/min até -16ºC
e) Resfriar amostra a 5ºC/min até -80ºC
f) Colocar amostra em nitrogênio líquido

Após a congelação aguardou-se pelo menos 10 dias antes de descongelar e avaliar a amostra.

Na Tabela a seguir (Tabela 1) estão apresentadas as espécies de serpentes estudadas e os protocolos para congelação propostos no experimento II.

Tabela 1- Relação das espécies de cascavéis e protocolos para diluição e congelação de sêmen testados no experimento II – São Paulo -2008

ID	Espécie	Procedência	Colheita	Diluidor	Crioprotetor	[crioprotetor]	PC
25	C. adamanteus	CAT	Massagem	Test G.	Glicerol	8%	3
25	C. adamanteus	CAT	Massagem	Test G.	Glicerol	16%	3
20	C. cerastes	NAT	Post-mortem	Test G.	DMA	18%	2
36	C. durissus	CAT	Post-mortem	Test G.	Glicerol	4%	3
36	C. durissus	CAT	Post-mortem	Test G.	Glicerol	8%	3
73	C. mitchellii	CAT	Post-mortem	Test G.	Glicerol	8%	3
73	C. mitchellii	CAT	Post-mortem	Test G.	Glicerol	10%	3
9	C. ruber	CAT	Massagem	Lake´s	DMSO	4%	2
9	C. ruber	CAT	Massagem	Lake´s	DMSO	4%	1
9	C. ruber	CAT	Massagem	Lake´s	DMSO	2%	1
9	C. ruber	CAT	Massagem	Lake´s	DMSO	2%	2
6	C. ruber	NAT	Massagem	Lake´s	DMSO	2%	1
6	C. ruber	NAT	Massagem	Lake´s	DMSO	4%	1
122	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	10%	4
122	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	8%	4
122	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	8%	3
122	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	10%	3
42	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	4%	3
42	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	8%	3

ID= identificação da serpente; Test G.= diluidor Test-gema; DMA= dimetilacetamida; DMSO= dimetilsulfóxido; [crioprotetor]= concentração do crioprotetor; PC= protocolo de congelação;

As concentrações dos crioprotetores DMA (18%) e dimetilsulfóxido (DMSO 2 e 4%) testadas nos protocolos de congelação foram estabelecidas a partir do valor médio das concentrações destes diluidores na congelação de sêmen de aves (BLANCO et al., 2000; SAMOUR, 2004; BLESBOIS et al., 2005). A DMA (dimetilacetamida) e o DMSO (dimetilsulfóxido) têm sido amplamente utilizados como alternativas ao glicerol, que comprovadamente reduz a fertilidade em aves (SAMOUR, J. H., 2004).

As concentrações de glicerol (4, 8, 10 e 16%) foram estabelecidas a partir de estudos pilotos e dos protocolos utilizados na rotina do Laboratório de Fisiologia Reprodutiva do *CRES.*

As amostras de sêmen foram aleatoriamente descongeladas segundo os protocolos:

Protocolo 1

a) Descongelação em banho-maria a 25°C e avaliação

Protocolo 2

a) Descongelação em banho-maria a 25°C
b) Centrifugação a 3.000 RPM por dez minutos após a adição de diluidor Test-gema na proporção 1:1 (amostra:diluidor)
c) Remoção do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em diluidor Test-gema para avaliação

Protocolo 3

a) Descongelação em banho-maria a 25°C
b) Centrifugação a 3.000 RPM por dez minutos após a adição de meio de cultura de células M199 na proporção 1:1 (amostra:diluidor)
c) Remoção do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em meio de cultura de células M199 para avaliação

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa *SAS System for Windows* (*SAS Institute Inc*., Cary, NC, USA, 2000).

Utilizando o aplicativo *Guided Data Analysis*, as variáveis contínuas foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, os dados foram transformados (logarítmo na base 10 - $Log_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento *NPAR1WAY* de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões e as médias (média $\pm$ erro padrão da média) e os níveis de significância (p) dos dados.

As variáveis dicotômicas foram avaliadas e comparadas pelo teste Qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher quando a freqüência esperada era 5 ou menos.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (estação do ano e ECC) para uma determinada variável resposta. A análise paramétrica foi realizada através do teste t de Student e do teste LSD de comparação de médias para a avaliação do dimorfismo sexual e para o restante das análises, respectivcamente. A análise não paramétrica foi realizada através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Nestes casos utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon comparando-se os tratamentos dois a dois.

Para os machos, na avaliação do efeito das estações do ano, as variáveis resposta comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento total (CT), massa, integridade acrossomal (IA) e integridade de membrana espermática (IM) obedeceram às premissas, não sendo necessária qualquer transformação. As variáveis volume seminal, motilidade e vigor espermáticos não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-las.

Para as fêmeas, na análise do efeito das estações de ano, as variáveis resposta massa, CRC e condição corporal obedeceram às premissas não sendo necessária qualquer transformação. As variáveis resposta CT e diâmetro do maior folículo (DMF) obedeceram às premissas após a transformação dos seus dados para 1/CT e logaritmo na base 10, respectivamente.

Na avaliação do efeito da condição corporal nas fêmeas, as variáveis resposta massa e CRC obedeceram às premissas não sendo necessária qualquer transformação. As variáveis resposta CT e DMF obedeceram às premissas após a transformação dos seus dados para 1/CT e logaritmo na base 10, respectivamente.

Para a avaliação do dimorfismo sexual, as variáveis CRC e CT obedeceram às premissas após a transformação dos seus dados para o quadrado de seus valores. Já, a variável resposta massa obedeceu às premissas não sendo necessária qualquer transformação. Também para esta análise, a variável DI não obedeceu às premissas, não sendo possível transformá-la.

As variáveis resposta foram submetidas à análise de correlação de Pearson e Spearman para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: AVALIAÇÕES REPRODUTIVAS E DE CONDIÇÃO CORPORAL DAS SERPENTES ESTUDADAS

Os dados aqui apresentados são inéditos e auxiliarão a compor o banco de dados sobre parâmetros reprodutivos das espécies estudadas e na compreensão da biologia reprodutiva das serpentes.

5.1 ANIMAIS

O esforço amostral no trabalho de campo foi de aproximadamente 3.000 horas-homem, com uma média aproximada de 31 horas-homem por cascavel encontrada. Foram capturadas 96 cascavéis das três diferentes espécies (*Crotalus ruber ruber, C. oreganus helleri* e *C. mitchellii phyrrus*) as quais ocorrem na área deste estudo (Tabela 2).

Tabela 2- Relação de espécies de cascavel capturadas na reserva ecológica da *Zoological Society of San Diego* em Escondido (CA, EUA), durante o período de abril de 2005 a julho de 2006 - São Paulo - 2008

Espécie	N= (machos.fêmeas)	Nome comum (inglês)
Crotalus ruber ruber	78 (47.31)	*Red Diamond rattlesnake*
Crotalus oreganus helleri	10 (8.2)	*Southern Pacific rattlesnake*
Crotalus mitchellii phyrrus	8 (5.3)	*Speckled rattlesnake*

Como pode ser observado na tabela acima (Tabela 2), a *Crotalus ruber ruber* mostrou-se a mais abundante dentre a três espécies de cascavel, correspondendo a 81% das serpentes capturadas.

Essa área é formada predominantemente por *Coastal Sage Scrub*, *Chaparral* e cactos (Figura 13), hábitat que favorece a *C. ruber ruber* , enquanto a *C. oreganus helleri* usa primariamente campos de gramíneas não nativas e vegetação ripariana, pouco freqüentes na área (DUGAN; HAYES, 2005). Já a *C. mitchellii phyrrus* utiliza áreas de difícil acesso com predominância de rochas (KLAUBER, 1982), o que diminuiu a eficiência de localização e captura desta espécie.

Foram capturados mais machos do que fêmeas (60.36) durante o período do estudo. Em estudo sobre a ecologia da *Crotalus ruber ruber* na mesma área, Brown et al. (2005) constataram áreas de uso de 2,80 ha e 0,88 ha para machos e fêmeas, respectivamente, com deslocamento anual de 1,38 km para machos e 0,77 km para fêmeas. Assim sendo, os machos percorrem distâncias maiores e por mais tempo do que as fêmeas, o que provavelmente aumenta as chances de serem encontrados e capturados.

Essa diferença na ecologia espacial entre os sexos também é citada na literatura para outras espécies de cascavéis da América do Norte (BROWN et al., 2005; SMITH et al., 2005; WALDRON et al., 2006; PARKER; ANDERSON, 2007), mas não foi observada na cascavel (*Crotalus durissus*) no Brasil (TOZETTI; MARTINS, 2005).

5.2 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DE CONDIÇÃO CORPORAL EM *Crotalus ruber ruber*

As serpentes de *Crotalus ruber ruber* foram encontradas em hábitats com vegetação arbustiva (*Coastal Sage Scrub* e *Chaparral*), áreas com rochas e cactos (*Opuntia* sp.), dentro de ninho de rato (*Neotoma* sp.) ou mesmo atravessando estradas de terra, as quais dão acesso ao local desse estudo.

Foram capturados um total de 78 indivíduos da *Crotalus ruber ruber* na área de estudo. Também foram inclusos três machos provenientes de vida livre de regiões próximas à área estudada, recebidos pelo Departamento de Herpetologia da *ZSSD* e um macho mantido em cativeiro no Zoológico de *San Diego*, totalizando 82 serpentes adultas.

O grande número de serpentes desta espécie permitiu a análise estatística dos dados considerando o sexo e a estação do ano. Além disso, os resultados obtidos nas avaliações reprodutivas de machos e fêmeas são discutidos em capítulos separados.

5.2.1 Biologia reprodutiva da *Crotalus ruber ruber*

Analisando-se os dados referentes à porcentagem de machos e fêmeas capturados ao longo das estações (Figura 16), foi encontrada diferença estatisticamente significante (p=0,0163) apenas entre a primavera e o verão. Na primavera, 75% (24/32) das serpentes encontradas eram machos, enquanto no verão a situação se inverteu, pois 64% (12/19) das serpentes capturadas eram fêmeas.

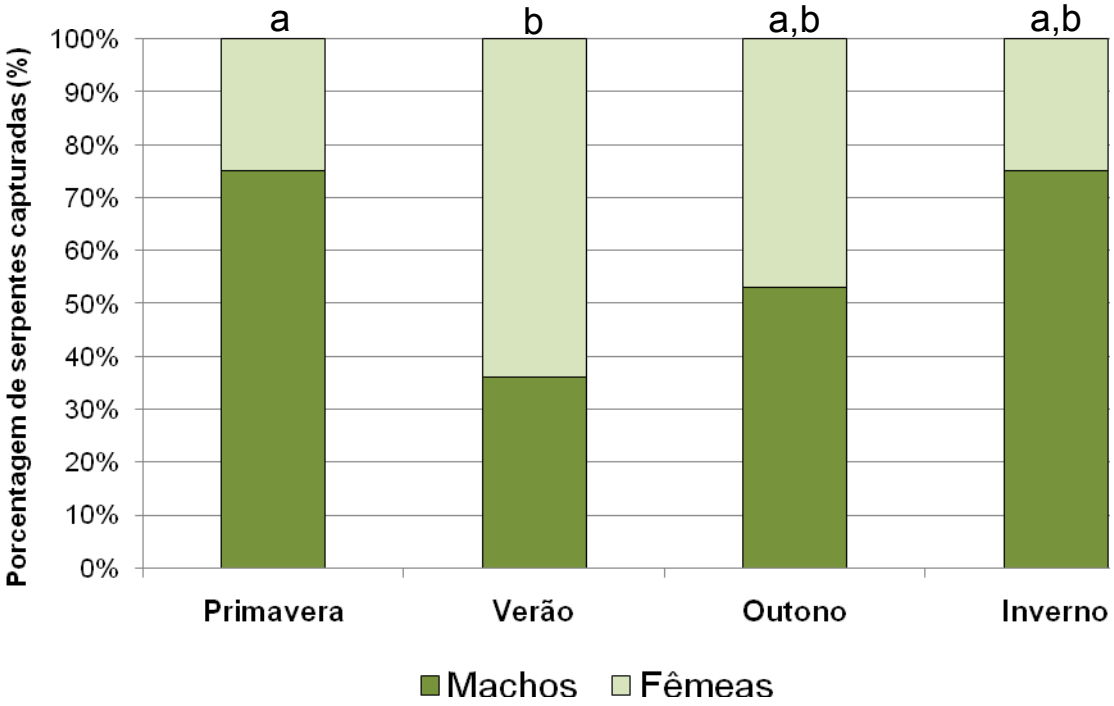

Figura 16- Representação gráfica da porcentagem relativa de machos e fêmeas de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia,. nas diferentes estações do ano. (a,b) letras diferentes representam diferença estatisticamente significante (p<0,05)

A predominância de machos encontrados na primavera está provavelmente relacionada ao aumento da atividade destes em função do comportamento de busca pelas fêmeas para cópula (KLAUBER, 1982; DUVALL; SCHUETT, 1997; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; TAYLOR; DENARDO, 2005; CARDWELL, 2008).

Vários autores (GIBSON; KINGSBURY, 2005; KINGSBURY et al., 2005; PRIVAL, 2005) relatam que fêmeas prenhes de cascavéis utilizam ambientes mais abertos e com menor cobertura de vegetação para favorecer a termorregulação,

deixando-as mais expostas. Esse fato pode ter contribuído para o encontro de mais fêmeas no verão, sendo que 33% (4/12) das fêmeas capturadas estavam prenhes.

Durante a tarde de 5 de março de 2006 (primavera) foi observada a corte entre o macho 98 e a fêmea 94 próximos a um arbusto e a aproximadamente 2 metros de distância foi encontrado o macho 97. Durante a captura os machos imediatamente assumiram uma posição enrodilhada e desferiram botes, enquanto a fêmea tentou escapar por entre os arbustos. A observação deste comportamento de corte, reforça os dados já existentes na literatura, descrevendo a primavera como a fase de corte e cópula para *Crotalus ruber ruber* (KLAUBER, 1982; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; BROWN et al., 2005).

Aldrige e Duvall (2002) propõem a hipótese de que o estro em viperídeos da América do Norte está condicionado à vitelogênese secundária e eliminação de ferormônios através da pele, tornando a fêmea atrativa aos machos. Entretanto, Taylor e DeNardo (2005) verificaram em *Crotalus atrox* várias cópulas de fêmeas não vitelogênicas e com baixos níveis de estradiol, contrariando a hipótese anterior.

Durante a avaliação reprodutiva, a fêmea 94 foi classificada como vitelogênica (folículos ovarianos entre 4 e 15 mm de diâmetro) corroborando a hipótese de Aldridge e Duvall (2002), no entanto, uma única corte observada não é suficiente para compreender a relação entre vitelogênese secundária, corte e cópula em *Crotalus ruber*.

5.2.2 Avaliação de parâmetros morfológicos da *Crotalus ruber ruber*

Na avaliação morfológica e da condição corporal a fêmea 41 não foi incluída, em virtude da massa superestimada pela presença de conteúdo alimentar, muito provavelmente um coelho (*Sylvilagus audubonii*) (Figura 17), uma das presas descritas para esta espécie (KLAUBER, 1982; RUBIO, 1998; IUCN, 2008).

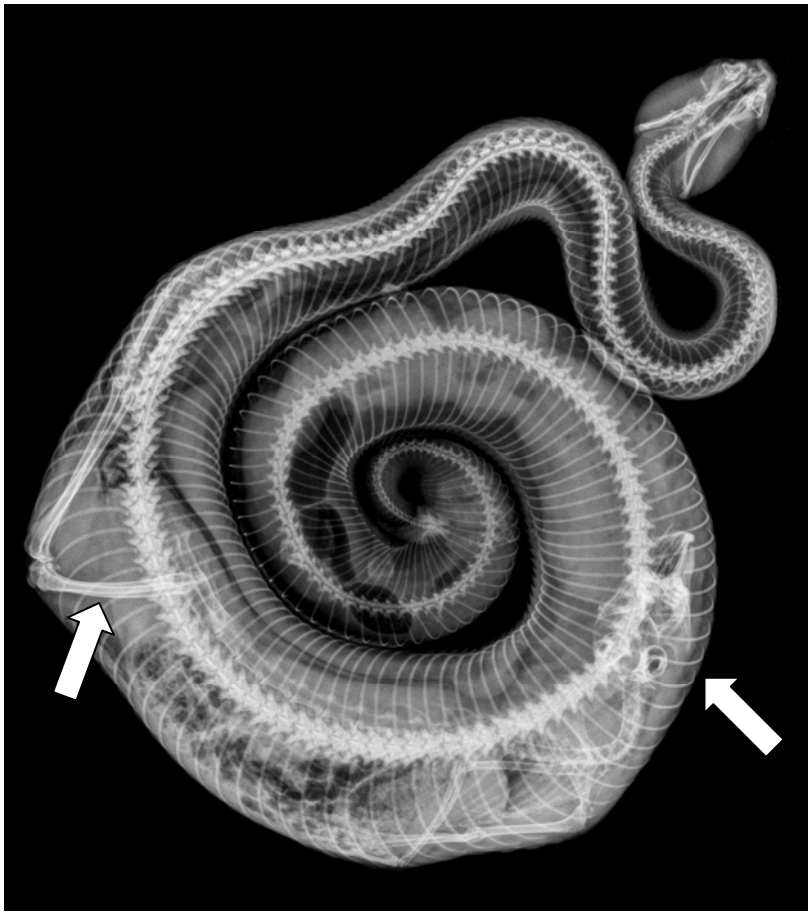

Figura 17- Radiografia de uma fêmea adulta de *Crotalus ruber ruber* (fêmea 41) capturada em vida-livre no Sul da Califórnia e que tinha ingerido um coelho (*Sylvilagus audubonii*). As setas indicam o crânio e o fêmur da presa

A análise dos parâmetros morfológicos de massa, comprimento rostro-cloacal, comprimento total e índice de massa corpórea da *C. ruber ruber* demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre machos e fêmeas (tabela 2).

Tabela 3- Parâmetros morfológicos (média ± EPM) de machos e fêmeas de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo – 2008

	Machos (n=51)	**Fêmeas (n=30)**	**p**
Massa (g)	989.256 ± 56.75[a]	477,45 ± 51,76[b]	<0,0001
CRC (cm)	108.28 ± 2.12[a]	92.40 ± 2.71[b]	<0,0001
CT (cm)	116.27 ± 2.27[a]	96.84 ± 2.72[b]	<0,0001

CRC= comprimento rostro-cloacal; CT= comprimento total; (a,b) Letras diferentes em uma mesma variável significam diferença estatisticamente significante (p<0,05)

Essas diferenças indicam o dimorfismo sexual quanto ao tamanho dos adultos, sendo machos maiores do que fêmeas. Este fato já está descrito na

literatura para diversas espécies de cascavéis (GIBBONS, 1972; SHINE, 1994; BEAUPRE, S. et al., 1998).

Na estratégia reprodutiva de várias espécies de cascavéis (*Crotalus*) existe a disputa entre os machos (danças-combate), que provavelmente favorece o dimorfismo sexual pela seleção natural de machos maiores (GIBBONS, 1972; SHINE, 1978; SHINE, 1993; , 1994; DUVALL; BEAUPRE, 1998). Porém, alguns autores sugerem que diferenças nas taxas metabólicas de machos e fêmeas poderiam ser um dos fatores envolvidos no dimorfismo sexual dessas serpentes (BEAUPRE; DUVALL, 1998).

A análise dos parâmetros morfológicos de machos em relação às estações do ano revelou que as variáveis CRC, CT e massa possuem diferenças estatisticamente significantes entre verão e outono (Tabela 3). Sendo que os machos encontrados no outono são maiores (mais pesados e compridos) do que os encontrados no verão.

Tabela 4- Parâmetros morfológicos (média ± EPM) de machos de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, ao longo das estações do ano - São Paulo – 2008

	Primavera (n=24)	**Verão (n=7)**	**Outono (n=8)**	**Inverno (n=12)**
CRC	109,35 ± 1,83[a,b]	100,5 ± 7,75[b]	117,37 ± 3,87[a]	108,6 ± 4,54[a,b]
CT	117,41 ± 1,97[a,b]	107,93 ± 8,34[b]	125,94 ± 3,96[a]	116,75 ± 4,84[a,b]
Massa	1000,35 ± 65,94[a,b]	746,66 ± 303,39[b]	1175,43 ± 82,66[a]	996 ± 134,05[a,b]

CRC= comprimento rostro-cloacal; CT= comprimento total; (a,b) Letras diferentes em uma mesma variável significam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$)

Para as fêmeas, a análise das variáveis CRC e CT em relação às estações do ano não demonstrou diferenças estatisticamente significantes (Tabela 4). No entanto, foi detectada diferença significante da variável massa, entre o outono e a primavera/verão. Sendo que no outono as fêmeas encontradas eram mais pesadas do que nas estações primavera e verão, que não diferiram entre si. Não houve diferença significante da variável massa no inverno em relação às outras estações.

Tabela 5- Parâmetros morfológicos (média ± EPM) de fêmeas adultas de *Crotalus ruber ruber* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006, segundo a estação do ano - São Paulo - 2008

	Primavera (n=7)	**Verão (n=12)**	**Outono (n=7)**	**Inverno (n=4)**
CRC	88,67 ± 5,41[a]	87,71 ± 3,92[a]	101,16 ± 3,26[a]	99,75 ± 2,78[a]
CT	115,50 ± 23,72[a]	92,43 ± 4,14[a]	106,42 ± 3,37[a]	104,87 ± 2,68[a]
Massa	363,83 ± 83,24[a]	405,71 ± 72,07[a]	766,66 ± 103,26[b]	510,00 ± 46,00[a,b]

CRC= comprimento rostro-cloacal; CT= comprimento total (a,b) Letras diferentes em uma mesma variável significam diferença estatisticamente significante (P<0,05)

As análises demonstraram que machos e fêmeas encontrados no outono, em geral são maiores do que os observados nas outras estações. Como demonstrado por Figueroa (2006) em estudo sobre a ecologia da *Crotalus oreganus helleri*, os maiores indivíduos permaneciam por mais tempo ativos durante o outono, enquanto os menores se recolhiam aos abrigos de hibernação para a chegada do inverno. Fato semelhante pode ter ocorrido com a *Crotalus ruber ruber* na área estudada, levando à captura de indivíduos maiores no outono.

5.2.3 Avaliação da condição corporal e índice de massa corpóreo da *Crotalus ruber ruber*

As tabelas (Tabela 5 e 6) a seguir apresentam os resultados obtidos (média ± EPM) para os parâmetros morfológicos de acordo com a condição corporal de machos e fêmeas de *Crotalus ruber ruber*.

Tabela 6- Resultados (média ± EPM) dos parâmetros morfológicos em relação à condição corporal de fêmeas adultas de *Crotalus ruber ruber* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008

	Cc 1 (n=6)	**Cc 2 (n=21)**	**Cc 3 (n=3)**
Massa (g)	453.33 ± 50.57[a]	432.80 ± 62.39[a]	823.33 ± 190.12[b]
CRC (cm)	98.66 ± 2.52 [a]	89.77 ± 3.68 [a]	98.83 ± 3.61 [a]
CT (cm)	103.75 ± 2.49 [a]	208.20 ± 70.81 [a]	103.83 ± 3.59 [a]
IMC	2566.11 ± 170.58[a]	1835.60 ± 83.62[b]	1442.46 ± 162.24[b]

CRC= comprimento rostro-cloacal; CT=comprimento total; IMC= índice de massa corpórea; (a,b) Letras diferentes em uma mesma variável significam diferença estatisticamente significante (P<0,05)

A análise estatística do efeito da condição corporal (parâmetro subjetivo de avaliação) sobre o índice de massa corpórea (parâmetro objetivo de avaliação) revelou diferença estatisticamente significante (tabela 5) entre as fêmeas com condição corporal 1 (ruim) em relação às com condição corporal 2 (boa) e 3 (muito boa), que não diferiram entre si. Essa diferença valida, em parte, os critérios subjetivos de avaliação da condição corporal, pois foi demonstrado que as fêmeas com condição corporal 1 apresentam o menor índice de massa corpórea dentre todas.

Com relação aos outros parâmetros morfológicos, apenas a massa das fêmeas com condição corporal 3 foi significante (p<0,05) maior do que as outras classes de condição corporal, que não diferiram entre si.

Tabela 7- Resultados (média ± EPM) dos parâmetros índice de massa corpórea em relação à condição corporal de machos adultos de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo – 2008

	Cc 1 (n=10)	**Cc 2 (n=39)**	**Cc 3 (n=3)**
Massa (g)	1285.56 ± 65.06 [a]	883.94 ± 61.77 [a]	1215.00 ± 445.00 [a]
CRC (cm)	114.00 ± 2.86 [a]	105.96 ± 2.61 [a]	117.00 ± 6.00 [a]
CT (cm)	122.25 ± 3.06 [a]	113.76 ± 2.80 [a]	126.00 ± 6.00 [a]
IMC	1539,11 ± 51,05[a]	1769,97 ± 43,73 [a]	1814,84 ± 429,32[a]

CRC= comprimento rostro-cloacal; CT=comprimento total; IMC= índice de massa corpórea; (a,b) Letras diferentes em uma mesma variável significam diferença estatisticamente significante (P<0,05)

Embora tenha sido observada diferença estatisticamente significante entre as fêmeas de diferentes categorias de condição corporal (tabela 5), o mesmo não foi

observado nos machos, pois nenhum dos parâmetros morfológicos analisados sofreu o efeito da condição corporal.

Esses resultados podem sugerir que a classificação da condição corporal não demonstra diferenças reais entre os machos. Porém, aponta uma diferença no índice de massa corpórea, principalmente, de fêmeas com condição corporal ruim em relação às outras.

A condição corporal da fêmea é muito importante para a reprodução nas serpentes, pois a vitelogênese e a gestação representam um alto custo energético para elas (SHINE, 1980; OLSSON et al., 1997; TAYLOR et al., 2005). Tem sido demonstrado na literatura, que fêmeas com uma condição corporal ruim apresentam menores níveis de estradiol e não conseguem reproduzir (BONNET et al., 1994; BONNET, 1996; TAYLOR et al., 2005).

Assim sendo, o estabelecimento de um critério para definir a condição corporal em fêmeas de serpentes pode ser uma ferramenta importante no manejo reprodutivo de inúmeras espécies em cativeiro.

5.2.4 Avaliação reprodutiva dos machos de *Crotalus ruber ruber*

Durante o período do experimento de maio/2005 a julho/2006 foram capturados 48 machos de *Crotalus ruber ruber*, além dos machos adicionais já citados. Foram obtidas amostras de sêmen em 90% (47/52) dos machos, o que demonstra a grande eficiência da técnica.

Analisando os parâmetros seminais ao longo das estações, foi verificado que o volume seminal, motilidade e vigor espermáticos, integridade acrossomal e de membrana espermática não apresentaram diferença estatisticamente significante ($P<0,05$) entre as estações do ano (Tabela 8) ou de acordo com a condição corporal dos machos.

Tabela 8- Parâmetros seminais (média ± EPM) de machos adultos de *Crotalus ruber ruber* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006, segundo as estações do ano - São Paulo - 2008

	Primavera (n=23)	**Verão (n=7)**	**Outono (n=7)**	**Inverno (n=10)**
Volume (µL)	1,83 ± 0,90 [a]	1,971 ± 0,87 [a]	0,36 ± 0,27 [a]	2,53 ± 1,33[a]
Motilidade (%)	68,14 ± 3,17 [a]	46,75 ± 16,07 [a]	42,60 ± 17,55 [a]	42,60 ± 17,55 [a]
Vigor	2,28 ± 0,16 [a]	1,25 ± 0,63 [a]	1,60 ± 0,68 [a]	1,60 ± 0,67 [a]
IA (%)	96,44 ± 1,12 [a]	92,66 ± 5,04 [a]	96,50 ± 0,50 [a]	95,00 ± 0,70 [a]
IM (%)	56,33 ± 6,57 [a]	81,25 ± 6,25 [a]	80,66 ± 3,53 [a]	73,20 ± 9,25 [a]

IA= integridade acrossomal; IM= integridade de membrana espermática (a,b) Letras diferentes em uma mesma variável significam diferença estatisticamente significante (P<0,05)

Em cascavéis (*Crotalus*), os espermatozóides podem permanecer armazenados nos ductos deferentes antes da cópula por até dois anos (ALDRIDGE, 2002), o que pressupõe uma alta capacidade de manutenção da viabilidade durante esse período. A não observação de variações nos parâmetros seminais estudados pode ser em decorrência desta estabilidade, o que não permitiu a detecção de variações ao longo das estações.

É importante mencionar que apenas durante a primavera foram observadas amostras contaminadas (50% das amostras) (Figura 19). Essa contaminação examinada ao microscópio de luz apresentava grande quantidade de bactérias, protozoários, resto celular, cristais de urato e um possuíam um aspecto mucoso. A presença da contaminação foi uma surpresa, pois era esperado que durante a primavera (fase de cópula) seriam obtidos os maiores volumes seminais e melhores índices de qualidade espermática dentre os parâmetros estudados. Em estudo semelhante com *Crotalus durissus* no Brasil não foi encontrado este tipo de contaminação (ZACARIOTTI et al., 2007).

Em decorrência da escassez de informações sobre a análise de sêmen em serpentes, não foi encontrada explicação plausível para este fato.

Figura 18- 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)

Foi encontrada correlação negativa e de fraca intensidade entre motilidade espermática e os parâmetros morfológicos comprimento rostro-cloacal (p= 0,0390, r=-0,37888), comprimento total (p= 0,0269, r= -0,40384;) e massa (p= 0,0469, r= -0,38566), ou seja, quanto maior a serpente menor foi a motilidade espermática observada e vice-versa.

Essa correlação negativa pode estar relacionada ao comportamento reprodutivo e sistema poligínico de acasalamento dessa espécie (RIVAS; BURGHARDT, 2005), no qual um macho disputa as fêmeas com outros machos e tenta copular com o maior número possível de fêmeas. Apesar dos maiores machos terem provavelmente mais oportunidades de cópula, o estresse e desgaste físico envolvidos neste comportamento poderiam ser deletérios à qualidade seminal.

Também foi encontrada correlação negativa e de média intensidade entre integridade de membrana espermática e volume seminal (p= 0,0175; r= -0,51253), ou seja, quanto maior o volume seminal menor foi a integridade de membrana espermática observada e vice-versa.

Um maior volume de sêmen pode gerar um acúmulo maior de metabólitos e espécies reativas de oxigênio (ROS), tornando o espermatozóide mais suscetível à

peroxidação dos lipídios de membrana, o que culminaria com a diminuição da integridade dessa membrana (MUIÑO-BLANCO et al., 2008).

Não foram encontradas outras correlações entre os parâmetros estudados.

5.2.5 Avaliação reprodutiva das fêmeas de C*rotalus ruber ruber*

Durante o período do experimento de maio/2005 a julho/2006 foram capturadas 31 fêmeas de *Crotalus ruber ruber*, sendo que cinco estavam prenhes.

A análise dos estados reprodutivos (vitelogênica, não-vitelogênica e prenhe) em relação às diferentes estações do ano revelou um padrão (Figura 19). Fêmeas não-vitelogênicas (vitelogênese primária) foram observadas durante todas as estações, enquanto fêmeas vitelogênicas (vitelogênese secundária) foram observadas apenas durante o outono, inverno e primavera. As fêmeas prenhes foram observadas apenas na primavera e verão.

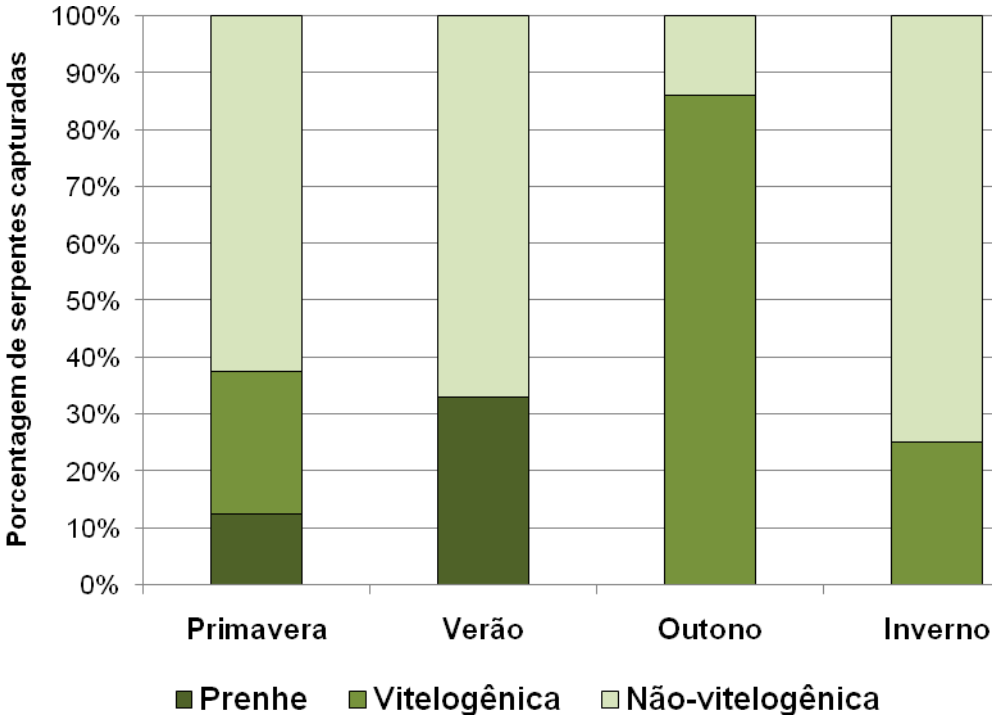

Figura 19 - Distribuição de fêmeas de *Crotalus ruber ruber* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006, nos diferentes estados reprodutivos: vitelogênica, não-vitelogênica e prenhe – São Paulo - 2008

O padrão observado da vitelogênese secundária iniciando em outono, ovulação e cópulas na primavera e gestação durante parte da primavera e no verão também foi descrito por outros autores para as cascavéis da América do Norte (ALDRIDGE, 2002; TAYLOR; DENARDO, 2005), o que corrobora nossos dados e a utilização da ultra-sonografia como ferramenta no estudo da biologia reprodutiva das serpentes.

A cascavel na América do Sul (*Crotalus durissus*), mais especificamente no Brasil, apresenta um padrão semelhante de vitelogênese secundária iniciando-se no outono e ovulação na primavera, porém com cópulas ocorrendo no outono (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; YAMANOUYE et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Quando comparamos os ciclos reprodutivos das cascavéis das Américas do Norte e do Sul, observamos diferentes estratégias. Essas estratégias tem sido motivo de inúmeras publicações na literatura (SCHUETT, G. W., 1992; ALDRIDGE, 1993; SCHUETT et al., 1997; ALDRIDGE, 2002; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; PIZZATTO; MARQUES, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, et al., 2004; TAYLOR; DENARDO, 2005).

Apesar do padrão de vitelogênese secundária iniciando no outono, com ovulação ocorrendo na primavera ser semelhante entre essas espécies de cascavel, a fase de cópula representa uma importante diferença. Na América do Norte a cascavel copula na primavera, sendo o macho quem armazena os espermatozóides durante o inverno, enquanto na América do Sul, as cópulas ocorrem no outono e é a fêmea quem armazena os espermatozóides durante o inverno, pois a ovulação só ocorre na primavera.

Quando analisado o diâmetro do maior folículo associado à condição corporal da fêmea (Figura 20), não foram observadas fêmeas em vitelogênese secundária (DMF> 10 mm) ou mesmo prenhes, que apresentassem condição corporal ruim (classe 1).

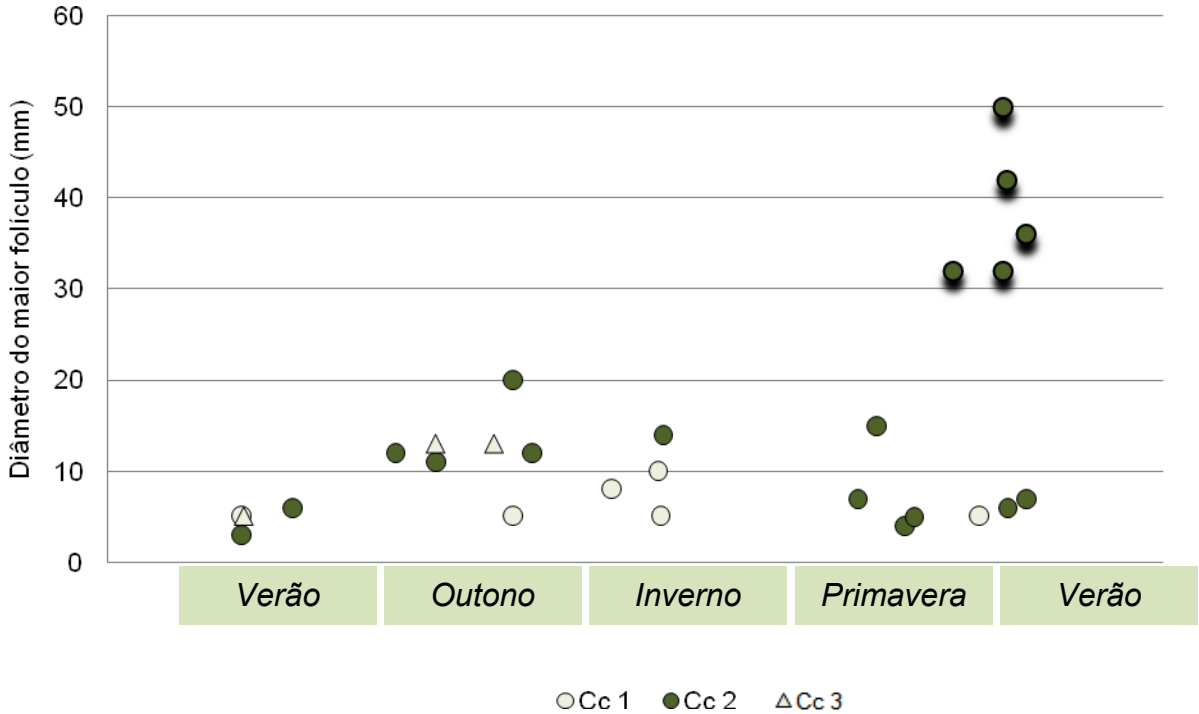

Figura 20- Representação do maior folículo e prenhez (pontos sombreados) em fêmeas de *Crotalus ruber ruber* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006, com diferentes condições corporais (**Cc**)

A produção de vitelogeninas durante a vitelogênese secundária e a gestação representa um alto custo energético para as fêmeas de serpentes, consumindo parte das suas reservas de gorduras (SHINE, 1980; AUBRET et al., 2002; TAYLOR; DENARDO, 2005; TAYLOR et al., 2005). Sendo assim, não era esperado o encontro de fêmeas com uma condição corporal ruim (Cc 1) em vitelogênese secundária ou prenhes e provavelmente, essas fêmeas estão recuperando suas reservas de gordura para que possam reproduzir no próximo ano.

5.3 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DE CONDIÇÃO CORPORAL EM MACHOS E FÊMEAS DE *Crotalus oreganus helleri*

Foram capturados dez indivíduos da espécie *Crotalus oreganus helleri* (Tabela 7) em diferentes locais como cruzando estradas, em meio à vegetação arbustiva, ninho de roedor (*Neotoma* sp.), áreas com rochas e inclusive um indivíduo no pátio externo das instalações do *CRES* (macho 89).

Em virtude do pequeno número de indivíduos e à grande variabilidade individual, os dados não serão discutidos estatisticamente ou segundo possíveis variações sazonais e de condição corporal.

De acordo com os dados apresentados na tabela 7, apenas um indivíduo (macho 72) apresentou uma condição corporal ruim. Os outros indivíduos apresentaram uma condição corporal boa ou muito boa, mesmo durante o inverno. No entanto, como citado, o pequeno número de indivíduos não permite estabelecer uma relação entre estado reprodutivo, estação do ano e condição corporal.

Tabela 9- Condição corporal, estação que ocorreu a captura e parâmetros morfológicos estudados em *Crotalus oreganus helleri* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008

Sexo	Cc	Estação	Massa (g)	CRC (cm)	CT (cm)
Macho 1	3	Verão	1130	105	113
Macho 37	3	Outono	200	59	63,5
Macho 47	3	Outono	470	87	93
Macho 49	3	Inverno	220	63	68,5
Macho 72	1	Inverno	580	94	102
Macho 89	2	Primavera	340	79	85
Macho 134	3	Verão	780	101	109
Macho 142	3	Verão	460	80	87
Fêmea 93	2	Primavera	100	49	52,3
Fêmea 108	3	Primavera	40	38	40,5

Cc= condição corporal; CRC= comprimento rostro-cloacal; CT= comprimento total

Todos os machos foram submetidos à colheita de sêmen obtendo-se os resultados representados na tabela 8. Em adição ao estudo das serpentes em vida-livre foi colhido sêmen de um macho adulto mantido em cativeiro no Zoológico de San Diego (macho 8) durante o verão e o outono.

Tabela 10- Parâmetros seminais estudados em *Crotalus oreganus helleri,* representando um macho adulto de cativeiro (macho 8) e cinco capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008

Identificação	Estação	Vol (µL)	Mot (%)	Vigor	AI (%)	MEI (%)
1	Verão	<0.5	87	2	57	91
8(1)	Outono	-	-	-	-	-
8(2)	Verão	23,3	1	0	98	69
37	Outono	5	81	1	100	88,5
47	Outono	5	79	2	98,5	88
49	Inverno	<0.5	69	2	98,5	88,5
72(3)	Inverno	<0.5	9	1	-	30
89(4)	Primavera	<0.5	-	-	-	-
134	Verão	60	50	2	86	58
142	Verão	6	84	2	99	*87*

Vol= volume de sêmen; Mot= motilidade; AI= acrossoma íntegro; MEI= membrana espermática íntegra; (1) Não foi obtida amostra de sêmen (2) Aproximadamente 20µl do volume de sêmen era plasma seminal (3) Não foi possível realizar a coloração para integridade acrossomal devido ao pequeno volume da amostra (4) Não foram encontrados espermatozóides na amostra.

Apesar do pequeno número de animais representarem mais as variações nos indivíduos do que na espécie, a obtenção de amostras de sêmen de *C. oreganus helleri* em praticamente todas as estações (Tabela 8), pode ser corroborada por Aldridge (2002), quando demonstrou através da histologia que *C. oreganus helleri* apresenta espermatozóides nos ductos deferentes durante o ano todo.

Um estudo futuro com um número maior de indivíduos e que contemple também a testosterona sérica poderá ajudar a esclarecer a papel de danças-combate observadas em primavera e verão, com cópulas apenas no verão.

Na Tabela a seguir estão listadas os resultados das avaliações reprodutivas de duas fêmeas avaliadas de *Crotalus oreganus helleri* (Tabela 9):

Tabela 11- Diâmetro do maior folículo observado em fêmeas de *Crotalus oreganus helleri* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006- São Paulo - 2008

Identificação	Estação	DMF (mm)	Massa (g)	CRC (cm)	CT (cm)
Fêmea 93	Primavera	2	100	49	52,3
Fêmea 108*	Primavera	-	40	38	40,5

(*) Não foram observados folículos nos ovários; DMF= diâmetro do maior folículo.

A fêmea 108 é muito provavelmente jovem (massa=40g, CRC=38 cm), o que explica a ausência de folículos nos ovários. Enquanto a fêmea 93 apesar de ser adulta e da condição corporal favorável não foram observados folículos em

vitelogênese secundária (DMF superior a 10 mm). Como já citado anteriormente, a literatura aponta o verão, como início da vitelogênese secundária nesta espécie (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; GARTENER, 2003) e é provável que esta fêmea em questão estivesse recuperando sua condição corporal após reproduzir no ano anterior.

Não foram observadas fêmeas vitelogênicas ou prenhes nesta espécie.

5.4 AVALIAÇÃO REPRODUTIVA E DE CONDIÇÃO CORPORAL EM MACHOS E FÊMEAS DE *Crotalus mitchellii phyrrus*

Todos os indivíduos de *Crotalus mitchellii phyrrus* foram encontrados em áreas de rochas, entre frestas ou próximo a grandes blocos de granito, como descrito na literatura (KLAUBER, 1982; GREENBERG, 2005). O difícil acesso ao hábitat em que vivem dificultou o encontro e a captura dessa espécie. Foram encontrados dez indivíduos, porém apenas oito foram capturados (Tabela 10).

Em virtude do pequeno número de indivíduos e à grande variabilidade individual, os dados não serão discutidos estatisticamente ou segundo possíveis variações sazonais e de condição corporal.

Durante a primavera foram capturados 50% (4/8) dos indivíduos de *Crotalus mitchellii phyrrus* (Tabela 10). Essa estação corresponde à fase de corte e cópula desta espécie (KLAUBER, 1982; ALDRIDGE; DUVALL, 2002; GARTENER, 2003) e provavelmente ao período de maior atividade dessa espécie, o que facilitaria seu encontro.

Apenas um macho (macho 113) apresentou uma condição corporal ruim (tabela 10), os outros indivíduos apresentaram uma condição boa ou muito boa, mesmo durante o inverno. Como já explicado anteriormente, não serão discutidas a relação entre estado reprodutivo, estação do ano e condição corporal nesta espécie.

Tabela 12- Condição corporal, estação que ocorreu a captura e parâmetros morfológicos estudados em *Crotalus mitchellii phyrrus* capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008

Sexo	Cc	Estação	Massa (g)	CRC (cm)	CT (cm)
Macho 21	2	Verão	280	77	83,5
Macho 50	3	Inverno	660	90	97
Macho 53	3	Inverno	890	103	110
Macho 99	3	Primavera	820	96	102,5
Macho 113	1	Primavera	370	88	97
Fêmea 96	2	Primavera	40	37	39
Fêmea 100	3	Primavera	50	38	40
Fêmea 137	3	Verão	340	74	78

Cc= condição corporal; CRC= comprimento rostro-cloacal; CT= comprimento total

Todos os machos foram considerados adultos e submetidos à colheita de sêmen obtendo-se os resultados representados n tabela 11. Em adição ao estudo com as serpentes de vida-livre, foi colhido sêmen durante o verão e o outono, de um macho adulto mantido em cativeiro no Zoológico de San Diego (macho 7).

Tabela 13- Parâmetros seminais estudados em *Crotalus mitchellii phyrrus,* representando um macho adulto mantido em cativeiro (macho 7) e cinco capturados em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008

Identificação	Estação	Vol (µL)	Mot (%)	Vigor	AI (%)	MEI (%)
Macho 7	Verão	<0,5	37	2	56	([1])
Macho 7*	Outono	-	-	-	-	-
Macho 21	Verão	<0,5	0	0	15	2
Macho 50*	Inverno	-	-	-	-	-
Macho 53*	Inverno	-	-	-	-	-
Macho 99*	Primavera	-	-	-	-	-
Macho 113	Primavera	10	76	2	95,5	87,5

Vol= volume de sêmen; Mot= motilidade; AI= acrossoma íntegro; MEI= membrana espermática íntegra; (*) Não foram obtidas amostras de sêmen ([1]) Devido ao pequeno volume e à concentração muito baixa não foi possível realizar este teste.

Ao contrário da maior parte das cascavéis da América do Norte, a espermatogênese em *C. mitchellii* se inicia na primavera (GARTENER, 2003), o que poderia explicar a ausência de sêmen nos animais estudados, durante outono e inverno

Na Tabela a seguir estão listadas as informações sobre as avaliações reprodutivas das três fêmeas estudadas (Tabela 13):

Tabela 14- Diâmetro do maior folículo observado em fêmeas de *Crotalus mitchellii phyrrus* capturadas em vida-livre no Sul da Califórnia, durante o período de maio de 2005 a junho de 2006 - São Paulo - 2008

Identificação	Estação	DMF (mm)	Massa (g)	CRC (cm)	CT (cm)
Fêmea 96*	Primavera	-	40	37	39
Fêmea 100*	Primavera	-	50	38	40
Fêmea 137	Verão	9 mm	340	74	78

(*) Não foram observados folículos nos ovários; DMF= diâmetro do maior folículo.

Vários autores (ALDRIDGE; DUVALL, 2002; GARTENER, 2003) citam a vitelogênese secundária iniciando no fim do verão / início do outono em cascavéis na América do Norte. É provável que a fêmea 137, avaliada no verão, iniciasse a vitelogênese secundária no outono, já que o diâmetro do maior folículo aproximava-se de 10 mm. As fêmeas 96 e 100 eram muito provavelmente jovens, em virtude do seu tamanho pequeno (Tabela 10) e ausência de folículos ovarianos, apesar da estação e condição corporal favoráveis.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO II: CONGELAÇÃO DE SÊMEN

Os testes de congelação de sêmen foram realizados com amostras de sete indivíduos de cinco diferentes espécies de cascavéis (*Crotalus adamanteus, C. cerastes, C. durissus, C. mitchellii* e *C. ruber*), provenientes da natureza e de cativeiro (Tabela 13). Em decorrência da variedade de espécies associada ao pequeno número de repetições dos vários protocolos testados nos indivíduos, potencializando as variações individuais, os resultados não serão discutidos estatisticamente.

Durante as avaliações pré e pós-descongelação foram avaliados os parâmetros de motilidade, vigor, integridade acrossomal e integridade de membrana espermática como descrito no material e métodos (capítulo 4). No entanto, a influência dos crioprotetores sobre permeabilidade de membrana espermática e acrossomal alterou as colorações utilizadas e gerou padrões inconsistentes de avaliação (Figura 21) que não possibilitaram o uso desses dados.

Celeghini (2005) destacou as inúmeras alterações que os crioprotetores causam nas colorações espermáticas, em decorrência das alterações provocadas na membrana espermáticas, o que dificultou a avaliação de sêmen bovino após a descongelação.

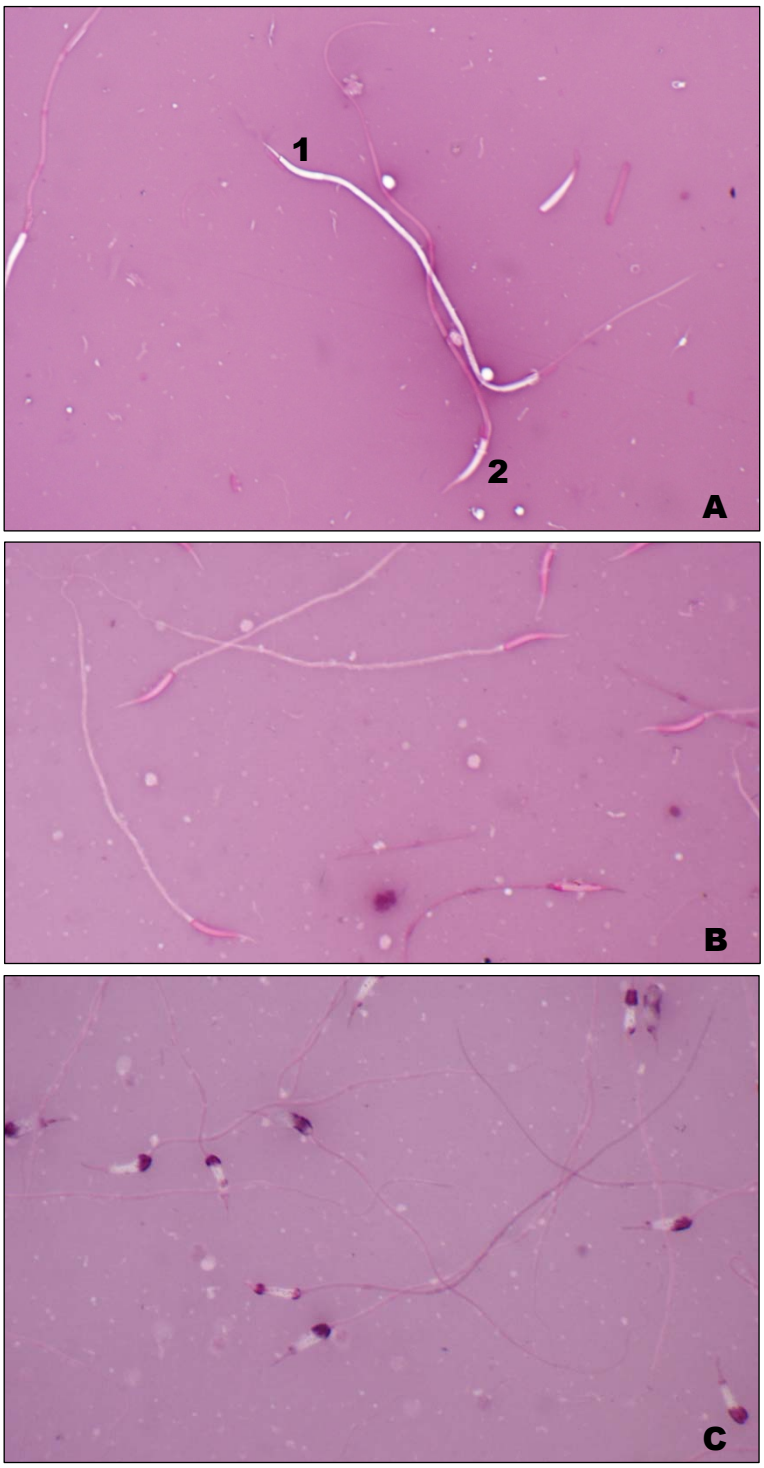

Figura 21- Fotomicrografias de amostras de sêmen de *Crotalus ruber ruber* coradas com coloração Eosina/Nigrosina para avaliação de integridade de membrana espermática. A) Amostra de sêmen diluída em Test-gema e apresentando padrão normal de coloração. Espermatozóide com membrana íntegra (n°1) e alterada (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

Tabela 155- Protocolos utilizados na congelação de sêmen em diferentes indivíduos de diferentes espécies de cascavéis. Sendo os resultados de motilidade e vigor (0-100% / 0-5) apresentados em T0 (avaliação inicial da amostra), T1 (amostra + diluidor), T2 (amostra + diluidor + crioprotetor), T3A (avaliação pós-descongelamento), T3B (avaliação pós-descongelamento procotlo)T3C (avaliação pós) - São Paulo - 2008

ID	Espécie	Procedência	Colheita	Diluidor	Crioprotetor	[crioprotetor]	PC	T0	T1	T2	T3A	T3B	T3C
25	C. adamanteus	CAT	Massagem	Test G.	Glicerol	8%	3	34% / 2	90% / 3	93% / 3	0	0	0
25	C. adamanteus	CAT	Massagem	Test G.	Glicerol	16%	3	34% / 2	90% / 3	15% / 3	1% / 1	22% / 1	42% / 2
20	C. cerastes	NAT	Post-mortem	Test G.	DMA	18%	2	65% / 2	59% / 2	10% / 1	0	0	0
36	C. durissus	CAT	Post-mortem	Test G.	Glicerol	4%	3	69% / 2	63% / 3	63% / 3	0	0	0
36	C. durissus	CAT	Post-mortem	Test G.	Glicerol	8%	3	69% / 2	63% / 3	71% / 2	12% / 1	0	3% / 1
73	C. mitchellii	CAT	Post-mortem	Test G.	Glicerol	8%	3	15% / 1	88% / 4	84% / 1	0	0	3% / 1
73	C. mitchellii	CAT	Post-mortem	Test G.	Glicerol	10%	3	15% / 1	88% / 4	92% / 1	0	0	0
9	C. ruber	CAT	Massagem	Lake´s	DMSO	4%	2	52% / 3	57% / 3	41% / 2	0	0	0
9	C. ruber	CAT	Massagem	Lake´s	DMSO	4%	1	52% / 3	57% / 3	41% / 2	0	0	0
9	C. ruber	CAT	Massagem	Lake´s	DMSO	2%	1	52% / 3	57% / 3	50% / 2	0	0	0
9	C. ruber	CAT	Massagem	Lake´s	DMSO	2%	2	52% / 3	57% / 3	50% / 2	0	0	0
6	C. ruber	NAT	Massagem	Lake´s	DMSO	2%	1	63% / 1	60% / 1	35% / 1	0	0	0
6	C. ruber	NAT	Massagem	Lake´s	DMSO	4%	1	63% / 1	60% / 1	36% / 1	0	0	0
122	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	10%	4	70% / 3	75% / 3	76% / 3	3% / 1	8% / 1	15% / 1
122	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	8%	4	70% / 3	75% / 3	76% / 3	0	1% / 1	7% / 1
122	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	8%	3	70% / 3	75% / 3	76% / 3	1% / 1	1% / 1	1% / 2
122	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	10%	3	70% / 3	75% / 3	76% / 3	1% / 1	0	1% / 1
42	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	4%	3	69% / 2	80% / 3	70% / 3	1% / 1	0,5% / 1	0,5% / 1
42	C. ruber	NAT	Massagem	Test G.	Glicerol	8%	3	69% / 2	80% / 3	70% / 3	21% / 1	24% / 1	48% / 1

ID= identificação da serpente; Test G.= diluidor Test-gema; DMA= dimetilacetamida; DMSO= dimetilsulfóxido; PC= protocolo de congelação;

Comparando-se os resultados de motilidade e vigor espermáticos após a adição dos diluidores Lake´s e Test-gema, em geral esses parâmetros tiveram um aumento mais acentuado após com o diluidor Test-gema (Tabela 13). Publicações recentes demonstram resultados melhores com a utilização do diluidor Test-gema em serpentes, inclusive na inseminação com sêmen fresco e refrigerado (FAHRIG et al., 2007; MATTSON et al., 2007).

Pode-se constatar que a adição da fração B do diluidor Test-gema com crioprotetor dimetilacetamida (DMA) 18% causou uma importante diminuição da motilidade e vigor espermáticos no sêmen de *C. cerastes* (Tabela 13). Por ser um composto inflamável, altamente tóxico e que aparentemente causou um efeito negativo sobre a motilidade e vigor espermáticos da amostra, o DMA foi logo descartado nos testes posteriores. Recentemente foi demonstrado que o DMA reduz a viabilidade espermática em algumas espécies de aves, provavelmente em decorrência de alterações significativas na membrana espermática (BLANCO et al., 2008). As amostras congeladas utilizando-se com os protocolos com o crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 2 e 4% não apresentaram qualquer motilidade pós-descongelamento (Tabela 13).

Ambos os protocolos utilizando DMA e DMSO como crioprotetores aliados aos protocolos 1 e 2 de congelação não apresentaram resultados satisfatórios. Como não era possível em um curto espaço de tempo e com poucas amostras para os testes definir quais fatores afetavam o sucesso da congelação do sêmen, crioprotetor e/ou concentração ou protocolo de congelação (1 e 2), estes protocolos foram descartados logo no início dos experimentos. O que não significa que não possam gerar bons resultados e serem utilizados, após estudos mais detalhados, em futuros protocolos para a congelação de sêmen de serpentes.

Assim sendo, foram priorizados os testes com os protocolos envolvendo o diluidor Test-gema e o crioprotetor glicerol.

Os protocolos utilizando o protocolo de congelação 3 mais o diluidor Test-gema com glicerol nas concentrações de 8 e 16%, foram os que apresentaram os melhores resultados de motilidade para *C. ruber* e *C. adamanteus*, respectivamente (Tabela 13). No entanto, o vigor espermático das amostras após a descongelação não foi satisfatório (vigor variou entre 1 e 2).

Durante o processo de congelação, o espermatozóide pode sofrer crio-injúrias com a formação descontrolada de cristais de gelo, que rompem a membrana celular

e estruturas importantes do citoesqueleto, prejudicando sua fisiologia normal e, portanto, a motilidade (HOLT, 2000).

Como comparação, os benefícios da congelação do sêmen de aves silvestres ainda são muito limitados, mesmo após décadas de estudos desenvolvidos em aves de produção, e muito provavelmente em razão das grandes perdas de viabilidade espermática após a descongelação (BLANCO et al., 2008). Em relação aos mamíferos, com exceção de bovinos, os mamíferos domésticos ainda enfrentam muitos desafios no desenvolvimento de um protocolo de congelação de sêmen satisfatório (BAILEY et al., 2000).

No entanto, os poucos resultados positivos alcançados ressaltam a importância da continuidade desta linha de pesquisa para o desenvolvimento de protocolos, que possibilitem congelar o sêmen de serpentes como ferramenta para a conservação de espécies ameaçadas. Ainda, a utilização da microscopia eletrônica aliada ao desenvolvimento de colorações (fluorescentes ou não) que auxiliem na avaliação do espermatozóide é fundamental para orientar o desenvolvimento desses protocolos, pois apenas os parâmetros de motilidade e vigor não são suficientes.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

As conclusões deste estudo são:

- As técnicas de avaliação reprodutiva pela colheita de sêmen e ultra-sonografia dos ovários mostraram-se eficientes no estudo da biologia reprodutiva de serpentes.
- A espécie *Crotalus ruber ruber* apresentou dimorfismo sexual quanto ao tamanho das serpentes.
- A proposta de classificação de condição corporal mostrou-se uma ferramenta que pode ser aplicada na avaliação das fêmeas de *Crotalus ruber ruber* em associação com os diferentes estados reprodutivos.
- As fêmeas de *Crotalus ruber ruber* apresentam a vitelogênese ao longo do outono, inverno e primavera. Fêmeas prenhes são encontradas apenas na primavera e no verão.
- Os machos de *Crotalus ruber ruber* não apresentam variações significativas dos parâmetros seminais estudados ao longo das estações do ano.
- O congelamento de sêmen de serpentes ainda não é uma alternativa viável, porém os resultados positivos demonstram que essas técnicas poderão ser uma realidade no futuro próximo.
- Este estudo contribui com a conservação das serpentes, apresentando dados inéditos provindos das avaliações reprodutivas realizadas e técnicas inovadoras para o estudo da biologia reprodutiva desses animais.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, A. C. Biodiversity monitoring and habitat management in Southern California. **CRES report**, v. 3, n. 1, p. 32-33, 2002.

ALBERTS, A. C.; OLIVA, M. L.; WORLEY, M. B.; TELFORD JR, S. R.; MORRIS, P. J.; JANSSEN, D. L. The need for pre-release health screening in animal translocations: a case study of the Cuban iguana (Cyclura nubila). **Animal Conservation**, v. 1, n. 3, p. 165-172, 1998.

ALDRIDGE, R. D. Enviromental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, v. 3, n. 4, p. 493-496, 1975.

ALDRIDGE, R. D. Seasonal spermatogenesis in sympatric *Crotalus viridis* and *Arizona elegans* in New Mexico. **Journal of Herpetology**, v. 13, n. 2, p. 187-192, 1979.

ALDRIDGE, R. D. Male reproductive anatomy and seasonal occurrence of mating and combat behavior of the rattlesnake *Crotalus v. viridis*. **Journal of Herpetology**, v. 27, n. 4, p. 481-484, 1993.

ALDRIDGE, R. D. The link between mating season and male reproductive anatomy in the rattlesnakes *Crotalus viridis oreganus* and *Crotalus viridis helleri*. **Journal of Herpetology**, v. 36, n. 2, p. 295-300, 2002.

ALDRIDGE, R. D.; DUVALL, D. Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. **Herpetological Monographs**, v. 16, n. 1, p. 1-25, 2002.

ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (serpentes:viperidae)**. 2005. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ABDALLA, F. M. F.; SILVEIRA, P. F.; YAMANOUYE, N.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the Neotropical Crotalus durissus terricus: I. Seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139 n. 2, p. 143-150 2004.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Sperm storage in males of the snake Crotalus durissus terrificus (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 139, n. 2, p. 169-174, 2004.

AUBRET, F.; BONNET, X.; SHINE, R.; LOURDAIS, O. Fat Is Sexy for Females but Not Males: The Influence of Body Reserves on Reproduction in Snakes (*Vipera aspis*). **Hormones and Behavior 42**, v. 42, n. 1, p. 135-147, 2002.

AUSTIN, C. R. Fine structure of the snake sperm tail. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 12, n. 3, p. 452-462, 1965.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J.; CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p., 2000.

BEAUPRE, S.; DUVALL, D.; O'LEILE, J. Ontogenetic variation in growth and sexual size dimorphism in a central Arizona population of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Copeia**, v. 1998, n. 1, p. 40-47, 1998.

BEAUPRE, S. J.; DUVALL, D. Variation in oxygen consumption of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*): implications for sexual size dimorphism. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 168, n. 7, p. 497-506, 1998.

BELL, T. **Reproductive technologies for conservation of native frogs and lizards**. Disponível em <http://www.landcareresearch.co.nz/research/wildlifeecol/herpetology/projects.asp>. Acesso em: 5 nov. 2008.

BETKOWSKY, S. E.; INNOCENTI, M. C.; ZACARIOTTI, R. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Estudo dos níveis de progesterona e estradiol séricos e acompanhamento das características ultrassonográficas de ovários e ovidutos de cascavéis (Crotalus durissus terrificus) mantidas em cativeiro em um período de 12 meses. In: Congresso Brasileiro da Associação de Veterinários de Animais Selvagens, 2006, São Pedro. **Anais…2006.** 25 p.

BEYER, J. E. On lenght-weight relationships. Part I: computing the mean weight of the fish of a given length class. **Fishbyte**, v. 5, n. 1, p. 11-13, 1987.

BLACKBURN, D. G. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. **Herpetological Monographs**, v. 20, n. 1, p. 131-146, 2006.

BLANCO, J. M.; GEE, G.; WILDT, D. E.; DONOGHUE, A. M. Species Variation in Osmotic, Cryoprotectant, and Cooling Rate Tolerance in Poultry, Eagle, and Peregrine Falcon Spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 63, n. 4, p. 1164-1171, 2000.

BLANCO, J. M.; LONG, J. A.; GEE, G.; DONOGHUE, A. M.; WILDT, D. E. Osmotic tolerance of avian spermatozoa: Influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. **Cryobiology**, v. 56, n. 1, p. 8-14, 2008.

BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; SEIGNEURIN, F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. **Reproduction**, v. 129, n. 3, p. 371-378, 2005.

BONNET, G. N. X. Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. **Oecologia**, v. 107, n. 301-306, p., 1996.

BONNET, X.; LOURDAIS, O.; SHINE, R.; NAULLEAU, G. Reproduction in a Typical Capital Breeder: Costs, Currencies, and Complications in the Aspic Viper. **Ecology**, v. 83, n. 8, p. 2124-2135, 2002.

BONNET, X.; NAULLEAU, G.; MAUGET, R. The influence of body condition on 17-[3 estradiol levels in relation to vitellogenesis in female Vipera aspis (Reptilia, Viperidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 93, n. 4, p. 424-437, 1994.

BRETT D.; GARTRELL, J. E. G. A. E. S. M. J. Comparison of noninvasive methods for the evaluation of female reproductive condition in a large viviparous lizard, (*Tiliqua nigrolutea*). **Zoo Biology**, v. 21, n. 3, p. 253-268, 2002.

BROWN, T. K.; LEMM, J.; MONTAGNE, J. P.; ALBERTS, A. Movement, denning, and relocations of Red Diamond Rattlesnakes (Crotalus ruber ruber) at the San Diego Wild Animal Park. In: The Biology of rattlesnake Symposium, Loma Linda. **Anais…** 2005. 30 p.

CARDWELL, M. D. The reproductive ecology of Mohave rattlesnakes. **Journal of Zoology**, v. 274, n. 1, p. 65-76, 2008.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W.**The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca:Cornell University Press, 2004. 976 p.

COUTINHO, M.; CAMPOS, Z. **Metodologia de avaliação do potencial reprodutivo de fêmeas e machos de jacaré-do-pantanal.** Corumbá: EMBRAPA, 2004. 5 p.

DE AGUIAR, L. F. S.; DI-BERNARDO, M. Reproduction of the water snake Helicops infrataeniatus (Colubridae) in southern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 26, n. 4, p. 527-533, 2005.

DENARDO, D. Reproductive biology. In: Mader, D. R. (Ed.). **Medicine of reptiles.** Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p. 212-224

DOUGLAS, M. E.; DOUGLAS, M. R.; SCHUETT, G. W.; PORRAS, L. W. Evolution of rattlesnakes (Viperidae:Crotalus) in the warm deserts of western North America shaped by Neogene vicariance and Quaternary climate change. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p. 3353–3374, 2006.

DUGAN, E. A.; HAYES, W. K. Comparative Ecology of Red Diamond (*Crotalus ruber*) and Southern Pacific (*Crotalus helleri*) Rattlesnakes in southern California. In: The Biology of rattlesnake Symposium, Loma Linda. **Anais…** 2005. 27 p.

DUVALL, D.; BEAUPRE, E. J. Sexual Strategy and Size Dimorphism in Rattlesnakes: Integrating Proximate and Ultimate Causation. **Amer. Zool.**, v. 38, n. 1, p. 152-165, 1998.

DUVALL, D.; SCHUETT, G. W. Straight-line movement and competitive mate searching in prairie rattlesnakes, *Crotalus viridis viridis*. **Anim. Behav.**, v. 54, n. 3, p. 329-334, 1997.

FAHRIG, B. M.; MITCHELL, M. A.; EILTS, B. E.; PACCAMONTI, D. L. Characterization and cooled storage of semen from corn snakes (*Elaphe guttata*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 38, n. 1, p. 7-12, 2007.

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

FITCH, H. S. **Reproductive cycles in lizards and snakes**. Kansas: University of Kansas, Museum of Natural History, 1970. 247 p.

FOX, H. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C. e PARSONS, T. S. (Ed.). **Biology of reptilia**. New York: Academic Press, 1977, p. 1-157.

GARTENER, G. E. A. Crotalus mitchellii (Speckled Rattlesnake): Mating. **Herpetological Review**, v. 34, n. 1, p. 65, 2003.

GIBBONS, J. W. Reproduction, growth, and sexual dimorphism in the canebrake rattlesnake (*Crotalus horridus atricaudatus*). **Copeia**, v. 1972, n. 2, p. 222-226, 1972.

GIBBONS, J. W.; SCOTT, D. E.; RYAN, T. J.; BUHLMANN, K. A.; TUBERVILLE, T. D.; METTS, B. S.; GREENE, J. L.; MILLS, T.; LEIDEN, Y.; POPPY, S.; WINNE, C. T. The Global Decline of Reptiles, Déjà Vu Amphibians. **BioScience**, v. 50, n. 8, p. 653-666, 2000.

GIBSON, S. E.; KINGSBURY, B. A. Habitat Use by the Timber Rattlesnake in Southern Indiana. In: In: The Biology of rattlesnake Symposium, Loma Linda. **Anais…** 2005. 29 p.

GILMAN, C. A.; WOLF, B. O. Use of portable ultrasonography as a nondestructive method for estimating reproductive effort in lizards. **Jounal of Experimental Biology**, v. 210, n. 11, p. 1859-1867, 2007.

GREENBERG, D. B. The effects of surface insolation on shelter site selection by Crotalus mitchellii and C. ruber. In: In: The Biology of rattlesnake Symposium, Loma Linda. **Anais…** 2005. 30 p.

GREENE, H. W. Snakes: Evolution of Mystery in Nature. Berkley: University of California Press, 1997. 366 p.

HAMILTON, D. W.; FAWCETT, D. W. Unusual features of the neck and middle-piece of snake spermatozoa. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 23, n. 1, p. 81-97, 1968.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000.

INNOCENTI, M. C.; ZACARIOTTI, R. L.; BETKOWSKY, S. E.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Avaliação do espermograma , validação da coloração simples do acrossoma e da atividade mitocondrial (citocromo c oxidase) em espermatozóide normal de cascavel (Crotalus durissus terrificus). In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, São Pedro:**Anais...2006.** 166 p.

IUCN. **2008 IUCN Red List of Threatened Species.** Disponível em< http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 22 out. 2008

JAMIESON, B. G. M.; KOELER, L. The ultrastructure of the spermatozoon of northern water snake, *Nerodia sipedon* (Colubridae, Serpentes), with phylogenetic considerations. **Canadian journal of Zoology**, v. 72, n. 6, p. 1648-1652, 1994.

JOHNSON, L. F.; JACOB, J. S.; TORRANCE, P. Annual testicular and androgenic cycles of the cottonmouth (Agkistrodon piscivorus) in Alabama. **Herpetologica**, v. 38, n. 1, p. 16-25, 1982.

KEENLYNE, K. D. Sexual differences in feeding habits of Crotalus horridus horridus. **Journal of Herpetology**, v. 6, n. 2, p. 234-237, 1972.

KINGSBURY, B. A.; SAGE, J. R.; MANNING, J. V.; MARSHALL, J. Spatial Ecology and Conservation of the Eastern Massasauga. In: n: The Biology of rattlesnake Symposium, Loma Linda. **Anais…** 2005. 35 p.

KLAUBER, L. M. **Rattlesnakes:** their habits, life histories, and influence on mankind.California: University of California Press, 1982

LABONTE, J. P. Innate prey preference in neonatal Southern Pacific Rattlesnakes (Crotalus viridis helleri) and changes with ontogeny. In: The Biology of rattlesnake Symposium, Loma Linda. **Anais…** 2005. 27 p.

LAKE, P. E. Studies on the dilution and storage of fowl semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 2, n. 1, p. 30-35, 1960.

LAKE, P. E.; RAVIE, O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. **British Poultry Science**, v. 25, n., p. 145-150, 1984.

LANCE, V. A. Reptile reproduction and endocrinology. In: Holt, W.; Pickard, A. R. (Ed.). Cambridge: Cambridge University Press, 2003, p.426

LANGLADA, F. G.; SANTOS, S.; FERREIRA, I. L. L. Techniques of artificial insemination in Crotalus durissus terrificus (Viperidae – Crotalinae). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal and Science**, v. 31, n. 2, p. 141-144, 1994.

LARSEN, R. E.; CARDEILHAC, P. T. Artificial insemination, semen handling, and assessment of reproductive status in alligators. In: The annual meeting of American ssociation of zoo veterinarians, 1984. **Abstracts...**1984, p. 159.

MARINHO, C.; ALMEIDA SANTOS, S.; CARNEIRO, S.; YAMASAKI, S.; SILVEIRA, P. Peptidase activities in Crotalus durissus terrificus semen. **Reproduction**, in press, 2008.

MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; RODRIGUES, M. G. Activity patterns in coralsnakes, genus Micrurus (Elapidae), in South and Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 1, n. 2, p. 99-105, 2006.

MARTÍNEZ-TORRES, M.; GUZMÁN-RODRÍGUEZ, R.; CÁRDENAS-LEÓN, M.; BRUNNER-REYNALDO, N. Follicular development and ovulation determined by ultrasound imaging in the vivivparous lizard *Barsisia imbricata* (Reptilia:Anguidae). **The Southwestern Naturalist**, v. 51, n. 3, p. 401–406, 2006.

MATTSON, K. J.; VRIES, A. D.; MCGUIRE, S. M.; KREBS, J.; LOUIS, E. E.; LOSKUTOFF, N. M. Successful artificial insemination in the corn snake (Elaphe gutatta), using fresh and cooled semen. **Zoo Biology**, v. 26, n. 5, p. 363-369, 2007.

MCKEEVER, M. Bold Dreamers and the Dreams they made Real. **Zoonooz,** 2005. v. 78**,** 8-12 p.

MEDONÇA, M. T.; CREWS, D. Mating-induced ovarian recrudescence in the red-sided garter snake. **Journal of comparative physiology A**, v. 166, n. 5, p. 629-632, 1990.

MENDONÇA, M. T.; CREW, D. Mating-induced ovaria recrudescence in the red-sided garter snake. **Journal of comparative physiology A**, v. 166, n., p. 629-632, 1990.

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

MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOUREX, J.; FONSECA, G. A. B. D. **Hotspots Revisited:** earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecorregions. Mexico City: Cemex, 2004

MORRIS, P. J.; JACKINTELL, L. A.; ALBERTS, A. C. Predicting the Gender of Subadult Komodo Dragons (*Varanus komodoensis*) Using Two-Dimensional Ultrasound Imaging and Plasma Testosterone Concentration. **Zoo Biology 15**, v. 15, n. 3, p. 341-348, 1996.

MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. s4, p. 18-31, 2008.

OLIVEIRA, C. A.; SILVA, R. M.; GERMÁN, M. M. S.; MAHECHA, A. B. Location of the ureteral openings in the cloacas of tinamous, some ratite birds, and crocodilians: A primitive character. **Journal of Morphology**, v. 260, n. 2, p. 234-246, 2004.

OLIVER, S. C.; JAMIESON, B. G. M.; SCHELTINGA, D. M. The ultrastructure of spermatozoa of squamata. II. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae (Reptilia). **Herpetologica**, v. 52, n. 2, p. 216-241, 1996.

OLSSON, M.; MADSEN, T.; SHINE, R. Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, Vipera berus. **Proceedings of Royal Society of London B**, v. 264, n. 1380, p. 455-459, 1997.

PARKER, J. M.; ANDERSON, S. H. Ecology and Behavior of the Midget Faded Rattlesnake (Crotalus Oreganus Concolor) in Wyoming. **Journal of Herpetology**, v. 41, n. 1, p. 41-51, 2007.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (colubridae) in Brazil. **Herpetological journal**, v. 16, n. 3, p. 353-362, 2006.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Reproductive biology of the false coral snake Oxyrhopus guibei (Colubridae) from southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, n. 4, p. 495-504, 2002.

PLATZ, C. C.; MENGDEN, G.; QUINN, H.; WOOD, F.; WOOD, J. (1980). Semen collection, evaluation and freezing in the Green sea turtle, Galapagos tortoise, and Red-eared pond turtle. In: The annual meeting of American association of zoo veterinarians, 1980. **Proceedings**…1980, 47-54 p.

POPE, C. E.; GELWICKS, E. J.; WACHS, K. B.; KELLER, G. L.; DRESSER, B. L. In vitro fertilization in the domestic cat (Felis catus): Comparison between freshly collected and cooled semen. **Theriogenology**, v. 31, n., p. 241, 1989.

PRIVAL, D. It's not easy being green: selected natural history aspects and a new hypothesis regarding the evolution of sexual dichromatism in *Crotalus lepidus klauberi*. In: n: The Biology of rattlesnake Symposium, Loma Linda. **Anais…** 2005. 48 p.

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

RIVAS, J. A.; BURGHARDT, G. M. Snake Mating Systems, Behavior, and Evolution: The Revisionary Implications of Recent Findings. **Journal of Comparative Psychology**, v. 119, n. 4, p. 447-454, 2005.

RIVERA, S. Health Assessment of the Reptilian Reproductive Tract. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 17, n. 4, p. 259-266, 2008.

ROBECK, TODD R. Ultrasound imaging of reproductive organs and eggs in Galapagos tortoises (*Geochelone elephantopus*). **Zoo Biology**, v. 9, n. 5, p. 349-359, 1990.

ROSS, R. A.; MARZEC, G. **Reproductive husbandry of pythons and boas**. Stanford: Institute for Herpetological Research, 1990

ROTHCHILD, I. The yolkless egg and the evolution of eutherian viviparity. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 2, p. 337-357, 2003.

RUBIO, M. **Rattlesnake: portrait of a predator**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1998. 239 p.

SAHATRAKUL, K.; DHANARUN, K.; SUJARITTHANYATRAKUL, C.; SAKORNCHAROUN, P.; TANASANTI, M.; MANAWATTHANA, S.; SANYATHITISEREE, P.; SIRINARUMITR, K. Semen evaluation in Olive Ridley Turtle (Lepidochelys olivacea). In: CONFERENCE NAME, 2008, Kasetsart. **Anais...**2008. p. 301-314

SALE-NUNES, P. M. **Filogenia da tribo Hydropsini baseada em caracteres morfológicos (Serpentes:Xenodontidae)**. 2006. 130 f. Tese (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

SAMOUR, J. H. Recent advances in artificial breeding techniques in birds and reptiles. **International Zoo Yearbook**, v. 24, p. 143-148, 1986.

SAMOUR, J. H. Semen Collection, Spermatozoa Cryopreservation, and Artificial Insemination in Nondomestic Birds. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 18, n. 4, p. 219-223, 2004.

SANTOS, X.; LLORENTE, G. A. Lipid dynamics in the viperine snake, Natrix maura, from the Ebro Delta (NE Spain). **Oikos**, v. 105, n. 1, p. 132-140, 2004.

SANTOS-COSTA, M. C. D.; PRUDENTE, A. L. C.; DI-BERNARDO, M. Reproductive Biology of Tantilla melanocephala (Linnaeus, 1758) (Serpentes, Colubridae) from Eastern Amazonia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 40, n. 4, p. 553-556, 2006.

SAWAYA, R. J. **História natural e ecologia das serpentes de cerrado da região de Itirapina, SP.** 2003. 145 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003

SCHUETT, G. W. Is long-tenn sperm storage an important component ofthe reproductive biology of temperate pit vipers? . In: CAMPBELL, A.; BRODIE, J. (Ed.). **Biology of Vipers**. Texas: Selva, 1992, p.169-184.

SCHUETT, G. W.; HARLOW, H. J.; ROSE, J. D.; KIRK, E. A. V.; MURDOCH, W. J. Annual Cycle of Plasma Testosterone in Male Copperheads,Agkistrodon contortrix (Serpentes, Viperidae): Relationship to Timing of Spermatogenesis, Mating, and Agonistic Behavior. **General and Comparative Endocrinology**, v. 105, n. 3, p. 417-424, 1997.

SCHUMACHER, J. Advanced Radiography and Ultrasonography in Reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 4, p. 162-168, 2001.

SEVER, D. M. Ultrastructure of the reproductive system of the Black swamp snake (Seminatrix pygaea) IV: Occurrence of an ampulla ductus deferentis. **Journal of Morphology**, v. 262, n. 5, p. 714-730, 2004.

SHINE, R. "Costs" of Reproduction in Reptiles. **Oecologia**, v. 46, n. 1, p. 92-100, 1980.

SHINE, R. Reproductive strategies in snakes. **Proceedings of Royal Society of London B**, v. 270, n. 1, p. 995-1004, 2003.

SHINE, R. Sexual dimorphism in snakes. In: SEIGEL, R.; COLLINS, J. (Ed.). **Snakes:** ecology and behaviour. NewYork: McGraw-Hill, 1993, p.49-86

SHINE, R. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. **Oecologia**, v. 33, n. 2, p. 269-278, 1978.

SHINE, R. Sexual size dimorphism in snakes revisited. **Copeia**, v. 1994, n. 3, p. 326-346, 1994.

SHINE, R.; MASON, R. T. Do a male garter snake's energy stores limit his reproductive effort? **Canadian Journal of Zoology**, v. 83, p. 1265-1270, 2005.

SIEGEL, D. S.; SEVER, D. M. Utero-muscular twistin and sperm storage in viperids. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 1, n. 2, p. 87-92, 2006.

SMITH, C. R.; CARTEE, R. E.; HATHCOCK, J. T.; SPEAKE, D. W. Radiographic and Ultrasonographic Scanning of Gravid Eastern Indigo Snakes. **Journal of Herpetology**, v. 23, n. 4, p. 426-429, 1989.

SMITH, R. M.; WALTER, F. B.; JAMES, R. S. Spatial Ecology of the Timber Rattlesnake in the pinelands of southern New Jersey. In: n: The Biology of rattlesnake Symposium, Loma Linda. **Anais…** 2005. 48 p.

SWANSON, W. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 49-58, 2006.

TAYLOR, E. N.; DENARDO, D. F. Reproductive ecology of western diamond-backed rattlesnakes (*Crotalus atrox*) in the Sonoran Desert. **Copeia**, v. 1, n., p. 152-158, 2005.

TAYLOR, E. N.; MALAWY, M. A.; BROWNING, D. M.; LEMAR, S. V.; DENARDO, D. F. Effects of food supplementation on the physiological ecology of female Western diamond-backed rattlesnakes (*Crotalus atrox*). **Oecologia**, v. 144, n. 2, p. 206-213, 2005.

THOMPSON, M. B.; SPEAKE, B. K. Energy and nutrient utilisation by embryonic reptiles. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 3, p. 529-538, 2002.

TOURMENTE, M.; CARDOZO, G.; BERTONA, M.; GUIDOBALDI, A.; GIOJALAS, L.; CHIARAVIGLIO, M. The ultrastructure of the spermatozoa of Boa constrictor occidentalis, with considerations on its mating system and sperm competition theories. **Acta Zoologica**, v. 87, n. 1, p. 25-32, 2006.

TOURMENTE, M.; CARDOZO, G.; GUIDOBALDI, H.; GIOJALAS, L.; BERTONA, M.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm motility parameters to evaluate the seminal quality of Boa constrictor occidentalis, a threatened snake species **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 1, p. 93 - 98, 2007.

TOURMENTE, M.; GIOJALAS, L.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm ultrastructure of Bothrops alternatus and Bothrops diporus (Viperidae, Serpentes), and its possible relation to the reproductive features of the species. **Journal of Zoomorphology**, v. 127, n. 4, p. 241-248, 2008.

TOZETTI, A. M.; MARTINS, M. Padrões de deslocamento de cascavéis (Crotalus durissus) monitoradas por rádio-rastreamento em uma reserva de Cerrado no estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2005, Belo Horizonte:**Anais…**2005

TSAI, T.-S.; TU, M.-C. Reproductive cycle of male chinese green tree vipers (*Trimeresurus s. stejnegeri*) in Northern Taiwan. **Journal of Herpetology**, v. 34, n. 3, p. 424-430, 2000.

TUCKER, A. D.; LIMPUS, C. J. Assessment of Reproductive Status in Australian Freshwater Crocodiles (*Crocodylus johnstoni*) by Ultrasound Imaging. **Copeia**, v. 1997, n. 4, p. 851-857, 1997.

UETZ, P. **The reptile database.** Disponível em < http://www.reptile-database.org/>. Acesso em: 5 nov. 2008.

VASSE, Y. Hemipenes. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes**. New York: Sterling Publishing, 1994, p.102

WALDRON, J. L.; BENNETT, S. H.; WELCH, S. M.; DORCAS, M. E.; LANHAM, J. D.; KALINOWSKY, W. Habitat specificity and home-range size as attributes of species vulnerability to extinction: a case study using sympatric rattlesnakes. . **Animal Conservation**, v. 9, n. 2, p. 414-420, 2006.

WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology**, v. 1, n. Supplement, p. 17-20, 1989.

WOOD, F.; PLATZ, C.; CRITCHLEY, K.; WOOD, J. Semen collection by electroejaculation of the green turtle (*Chelonia mydas*). **British Journal of Herpetology**, v. 6, n. 1, p. 200 - 202, 1982.

YAMANOUYE, N.; SILVEIRA, P. F.; ABDALLA, F. M. F.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the Neotropical Crotalus durissus terrificus: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 151-157, 2004.

ZACARIOTTI, R. L.; DURRANT, B. S. Baby rattles: Reproductive studies of freeranging snakes at the Wild Animal Park. **Zoonooz**, v. 79, n. 12, p. 8-9, 2006.

ZACARIOTTI, R. L.; GREGO, K. F.; FERNANDES, W.; SANT'ANNA, S. S.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Semen Collection and Evaluation in Free-Ranging Brazilian Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). **Zoo Biology**, v. 26, n. 3, p. 155-160, 2007.

Anexo 1

Diluidor Test-Gema (q.s.p. 500 ml)

Reagente	Quantidade
Tes (Sigma, T-1375)	24,15 g.
Trizma-base (Sigma, T-1503)	5,8 g.
Dextrose (Sigma, G-8270)	1,0 g.
Pen-Strep (Gibco, 15140-015)	10 ml

1- Adicionar os ingredientes a 475 ml de água destilada estéril e homogeneizar a solução.

2- Checar a osmolaridade e adicionar água destilada estéril para ajustar a osmolaridade entre 320 e 327 mOsm.

3- Checar o pH e necessário ajustar o pH com NaOH, HCl ou Tes. O pH desejado é 7,2.

4- Adicionar 20% de gema de ovo clarificada*.

(*) Clarificar a gema de ovo através de centrifugação (750-900 G por 15 minutos), utilizar o sobrenadante.

Diluidor Lake´s (q.s.p. 100 ml)

Reagente	Quantidade
Ácido glutâmico	1,92 g.
Frutose	0,80 g.
Acetato de magnésio ($4H_2O$)	0,08 g.
Acetato de potássio (anidro)	0,50 g
Poli-vinil pirrolidona (PVP)	0,30 g

1- Adicionar os ingredientes a 90 ml de água destilada estéril e homogeneizar a solução.

2- Checar a osmolaridade e adicionar água destilada estéril para ajustar a osmolaridade para 300 miliosmóis

3- Checar o pH e se necessário ajustá-lo com NaOH ou HCl. O pH desejado é 7,0.