INGRID VERA STEIN

Monitoramento das oscilações anuais nos níveis de testosterona plasmática e andrógenos fecais de machos de jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) mantidos em cativeiro

Ilustração: Rolf Grantsau, 2013

São Paulo

2016

INGRID VERA STEIN

Monitoramento das oscilações anuais nos níveis de testosterona plasmática e andrógenos fecais de machos de jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) mantidos em cativeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Selma Maria de Almeida Santos

De acordo:_____

Orientador(a)

São Paulo

2016

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.3356
FMVZ

Stein, Ingrid Vera
Monitoramento das oscilações anuais nos níveis de testosterona plasmática e andrógenos fecais de machos de jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) mantidos em cativeiro / Ingrid Vera Stein. -- 2016.
48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

1. Serpentes. 2. Endocrinologia. 3. Reprodução. 4. Sazonalidade. 5. *Bothrops insularis*. I. Título.

São Paulo, 05 de maio de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Monitoramento das Oscilações Anuais nos Níveis de Testosterona Plasmática e Andrógenos Fecais em Machos de Jararaca Ilhoa (Bothrops insularis) Mantidos em Cativeiro", protocolado sob o CEUA nº 8108110214, utilizando 8 Répteis (8 machos), sob a responsabilidade de Selma Maria De Almeida Santos, foi aprovado na reunião de 23/04/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "", protocol number CEUA 8108110214, utilizing 8 Reptiles (8 males), under the responsibility Selma Maria De Almeida Santos, was approved in the meeting of day 04/23/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: STEIN, Ingrid Vera

Título: **Monitoramento das oscilações anuais nos níveis de testosterona plasmática e andrógenos fecais de machos de jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) mantidos em cativeiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Ilustração: Rolf Grantsau, 2013

À todas as mulheres pesquisadoras
que dedicam sua vida à
conservação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de aprendizado nessa vida e aos meus guias espirituais que sempre estão ao meu lado me acalmando e soprando a direção certa em forma de intuições.

Aos meus pais, Ana Marta e Rudi Stein por me darem amor, educação, por me ensinarem valores e disciplina. À minha irmã Marilia Stein, meu cunhado Rafael Cardoso e minha afilhada Camila, pelo amor incondicional.

Ao meu grande amor Fernando Figliolini, que sempre acreditou em mim e me apresentou ao fascinante “mundo dos répteis”. À minha filha Cecília que veio me mostrar o que realmente é importante na vida.

À minha orientadora Selma de Almeida Santos, pela oportunidade, paciência e carinho com que me recebeu.

Ao meu co-orientador Ricardo Pereira, que foi fundamental na realização desse trabalho.

Ao professor Marcílio Nichi pelo grande auxílio com a análise estatística.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, processo n° 2014/07612-4.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa temporária.

À Faculdade de Medicina Veterinária, em especial ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela oportunidade dessa formação.

À minha melhor amiga Raquel Mesquita, que mesmo estando longe sempre teve tempo pra me ouvir e bons conselhos a me dar.

À minha amiga de longa data, Ana Luiza Leal Vieira, que acompanha minha trajetória e dá mais alegria à ela desde os tempos de CMPA.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan: Fernanda Magno, Diego Muniz, Karina Silva, Karina Kasperoviczus, Rafaela Coeti, Serena Migliori, Patrícia, Poliana Correa, Antônio Bordignon e Juliana Passos. Em especial à amiga Kalena Barros que me cedeu seu material coletado para realização dessa dissertação. À Mv. Josana Kapronezai, pela sua imensa ajuda nas realizações dos ensaios imunoenzimáticos. Aos funcionários

Adriano Fellone, Kelly Kishi e Maria Vendramini por todas as coletas das fezes. Às FUNDAPs Patrícia Valoto e Jéssica Silva pelo auxílio na minuciosa separação e pesagem fecais.

Aos colegas do Departamento de Reprodução Animal, Mayra, Jéssica, Marcel e Bruno, que me auxiliaram nas etapas laboratoriais.

À Priscila Viau e ao Laboratório de Dosagens Hormonais da FMVZ-USP, por ceder o espaço e prestar auxílio na liofilização das fezes.

À professora Renata Moreira, que gentilmente cedeu espaço em seu freezer -80°C para armazenar as amostras de plasma.

Ao professor Maurício Barbanti e ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), por cederem os anticorpos contra testosterona utilizados nesse estudo.

À bibliotecária Elza Faquim pelas minuciosas correções desse trabalho.

Às secretárias do Programa de Anatomia, Jaqueline Santana e Rosememary de Souza e aos funcionários da Pós-graduação da FMVZ-USP Henrique Oliveira e Thaís Shakushiya, pela dedicação ao trabalho que executam e pelas orientações prestadas.

Aos meus sogros Marlene e Felipe Figliolini que sempre cuidam de mim como se eu fosse filha deles.

Aos animais utilizados nesse estudo, minha gratidão e respeito.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas,
é quem faz as verdadeiras perguntas.”

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

STEIN, I. V. **Monitoramento das oscilações anuais nos níveis de testosterona plasmática e andrógenos fecais de machos de jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) mantidos em cativeiro.** [Annual fluctuations monitoring of plasma testosterone and fecal androgen levels in males of golden lancehead pitviper (*Bothrops insularis*) kept in captivity]. 2016. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) é uma serpente criticamente ameaçada, endêmica da Ilha da Queimada Grande (IQG), litoral sul de São Paulo. Com a sua população em declínio, foi estabelecido um programa de reprodução em cativeiro, porém o conhecimento da sua biologia reprodutiva ainda é incipiente. Até o momento considera-se essa espécie como sazonal, com período de espermatogênese e cópulas associado, ocorrendo do outono até início da primavera, porém não existem estudos a cerca da endocrinologia reprodutiva. O objetivo desse trabalho foi validar um método de avaliação hormonal não invasiva por meio das fezes e realizar o monitoramento dos metabólitos fecais de testosterona em conjunto com avaliação plasmática de testosterona. Ao longo de 36 meses foram coletadas 156 amostras de fezes e 30 amostras de sangue de oito machos cativos. As concentrações de metabólitos fecais de testosterona variaram entre 10,9 à 249,3 ng/g de fezes, enquanto as concentrações de testosterona plasmática variaram de 0,07 à 0,30 ng/mL de plasma. Não houve diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de testosterona e de metabólitos fecais de testosterona ao longo do ano, apesar dos machos demonstrarem comportamento reprodutivo durante esse período. Os dados corroboram com outros estudos de estocagem espermática, qualidade seminal e volume gonadal, porém vão de encontro à resultados de histologia testicular. São discutidas a possibilidade da espécie ser assazonal ou desses resultados serem uma consequência das condições do cativeiro. Esse estudo contribui com a validação de um novo método de avaliação longitudinal de esteroides sexuais em *B. insularis*, com o conhecimento da biologia reprodutiva de serpentes tropicais e com a conservação de animais ameaçados de extinção.

Palavras-chave: Serpentes. Endocrinologia. Reprodução. Sazonalidade. *Bothrops insularis*.

ABSTRACT

STEIN, I. V. **Annual fluctuations monitoring of plasma testosterone and fecal androgen levels in males of golden lancehead pitviper (*Bothrops insularis*) kept in captivity.** [Monitoramento das oscilações anuais nos níveis de testosterona plasmática e andrógenos fecais de machos de jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) mantidos em cativeiro]. 2016. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The golden lancehead pitviper (*Bothrops insularis*) is a critically endangered snake, endemic of the Queimada Grande Island, southeastern Brazil. With its declining population, a captive breeding program was established, but the knowledge of its reproductive biology is incipient. By the time this species is considered as seasonal, with spermatogenesis period and matting associated, occurring from autumn until early spring, but there are no studies about their reproductive endocrinology. The aim of this study was to validate a noninvasively hormonal evaluation method through feces and carry out the monitoring of androgens in conjunction with plasma testosterone evaluation. Over 36 months 156 stool samples and 30 blood samples were collected from eight captive males. The fecal androgen concentrations ranged from 10.9 to 249.3 ng / g of feces and the plasma testosterone concentrations ranged from 0.07 to 0.30 ng / mL of plasma. There was no significant difference between the concentrations of fecal androgens and plasma throughout the year, although the males had shown successfully reproductive behavior during this period. The data corroborate whith other studies of sperm storage, sperm quality and gonadal volume, but disagreeded of the results of testicular histology. We discuss the possibility of the species be assazonal or these results are a consequence of the captivity conditions. This study contributes to the validation of a new longitudinal evaluation method of sex steroids in *B. insularis*, with the knowledge of the reproductive biology of tropical snakes and the conservation of endangered animals.

Keywords: Snakes. Endocrinology. Breeding. Seasonality. *Bothrops insularis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

2 REVISÃO DE LITERATURA 14

2.1 A ILHA DA QUEIMADA GRANDE 14

2.2 A JARARACA-ILHOA 16

2.2.1 **Reprodução** 18

2.3 DOSAGEM HORMONAL NÃO INVASIVA 19

2.3.1 **Dosagem hormonal não invasiva em répteis** 20

3 OBJETIVOS 22

3.1 OBJETIVOS GERAIS 22

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22

4 MATERIAIS E MÉTODOS 23

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 23

4.2 ANIMAIS 23

4.3 DADOS AMBIENTAIS 24

4.4 COLETA DE FEZES 24

4.5 COLHEITA DE SANGUE 25

4.6 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS FECAIS 26

4.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO 27

4.7.1 Validação do ensaio 27

4.7.2 Validação fisiológica 28

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 29

5 RESULTADOS 30

6 DISCUSSÃO 34

6 CONCLUSÕES 40

REFERÊNCIAS 41

1 INTRODUÇÃO

A jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) é uma serpente endêmica da Ilha da Queimada Grande (IQG), situada no litoral sul do estado de São Paulo. Estudos recentes indicam, que *B. insularis* pode ter se originado de um ancestral comum semelhante a *B. jararaca* através do isolamento de populações na ilha onde ela hoje ocorre (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002).

Considerada uma espécie criticamente ameaçada de extinção, *Bothrops insularis* encontra-se na "Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção" (MACHADO; MARTINS; DRUMMOND, 2005) e na "Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas" (IUCN, 2013). Conforme Martins, Sawaya e Marques (2008) a população dessa espécie foi estimada em 2100 indivíduos e, de acordo com seus estudos dos últimos 12 anos, essa população está em declínio. Devido ao seu endemismo e à diminuição da qualidade de habitat por impacto antrópico, medidas conservacionistas são imprescindíveis a fim de evitar o desaparecimento dessa espécie. Em virtude de seu "status" de criticamente em perigo e devido aos fatores mencionados, fica clara a necessidade da manutenção desse viperídeo por meio de uma estratégia de longo prazo de reprodução em cativeiro. Todavia, um dos maiores obstáculos para o sucesso na reprodução *ex situ* de répteis é o desconhecimento sobre diversos aspectos ecológicos desses vertebrados, incluindo sua biologia reprodutiva (SWANSON, 2006). Desse modo, os programas de reprodução em cativeiro podem contribuir para a conservação de uma dada espécie por ampliar o conhecimento utilizando um reduzido número de indivíduos e por possibilitar o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas que facilitem o fluxo de genes entre populações cativas e de vida livre (ROLDAN et al., 2006).

Apesar de ter sido descoberta a mais de 100 anos (KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2012), e de haverem diversas recentes publicações a seu respeito (MARTINS; SAWAYA; MARQUES, 2008; BOVO, RAFAEL ; MARQUES; ANDRADE, 2010; MARQUES et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2014), o conhecimento sobre a biologia reprodutiva de *Bothrops insularis* ainda é principiante e as informações a respeito da sazonalidade são conflitantes. Enquanto alguns

trabalhos realizados *in situ* e a partir de espécimes depositados em coleção científica (KASPEROVICZUS, 2009; MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013) afirmam haver sazonalidade reprodutiva de fêmeas e machos, inclusive com um período de quiescência testicular, outro trabalho realizado pelo mesmo grupo mostra não haver diferença expressiva na qualidade seminal de animais mantidos em cativeiro (SILVA et al., 2015). Em decorrência disso, uma investigação da endocrinologia reprodutiva foi proposta na tentativa de elucidar essa questão. Além disso, tais conhecimentos auxiliarão na reprodução em cativeiro, e contribuirão com a manutenção de um plantel sexualmente ativo e pronto para uma possível reintrodução (VAZ GUIMARÃES, 2003), caso seja necessária.

O comportamento reprodutivo, bem como a atividade gonadal são regidos por hormônios (LICHT, 1979), dessa forma, o monitoramento endócrino oferece a obtenção de dados reprodutivos com grande confiabilidade, sendo um importante instrumento para a avaliação do sucesso reprodutivo (WASSER; VELLOSO; RODDEN, 1995). Para um eficiente monitoramento endócrino são necessárias coletas seriadas de sangue (SCHWARZENBERGER et al., 1996), contudo, esse procedimento pode ser estressante e muitas vezes inviável considerando o porte do animal (MACDONALD et al., 2002). Obstáculos como esses levaram a criação de métodos não-invasivos de monitoramento hormonal (via urina, fezes e saliva), uma vez que os mesmos minimizam situações de estresse e não oferecem riscos aos profissionais durante as coletas (ANDRABI; MAXWELL, 2007; PEREIRA, 2007). Essas vantagens somadas ao fato de amostras fecais serem de fácil obtenção, manuseio e conservação, popularizou o uso dessa metodologia em estudos endócrinos prolongados em uma gama de animais domésticos e selvagens (SCHWARZENBERGER et al., 1996; PEREIRA, 2007).

Tendo em vista o pouco conhecimento sobre a biologia reprodutiva de *Bothrops insularis* e da dificuldade de obtenção de amostras sanguíneas seriadas para avaliação hormonal longitudinal, este estudo se propõe a desenvolver um método de avaliação hormonal não invasiva a partir das fezes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ILHA DA QUEIMADA GRANDE

Situada a 33 km da costa, no litoral sul do estado de São Paulo, a Ilha da Queimada Grande (latitude 24° 29’S, longitude 46° 40’W) (Figuras 1 e 2) pertence ao município de Itanhaém e faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) de Cananéia-Iguape-Peruíbe, criada após decreto federal n° 90.347 de 23/10/1984. Também é considerada Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) pelo decreto federal n° 91.887 de 5/11/1985. Com 43 hectares, tem comprimento de 1.500m, largura de 500m e altitude de apenas 200m. Sua formação é rochosa, não possui praias arenosas nem fonte de água doce (DUARTE; PUORTO; FRANCO, 1995).

Figura 1 – Imagem de satélite da região litorânea do estado de São Paulo, indicando a localização da Ilha da Queimada Grande

Fonte: (GOOGLE EARTH, 2015).

Figura 2 – Vista aérea da Ilha da Queimada Grande

Fonte: (MERCADANTE; MOURA, 2005).

O clima da região litorânea do estado de São Paulo é considerado tropical úmido, com alto índice de pluviosidade anual e apresenta uma ligeira queda de precipitação nos meses de outono e inverno (SILVA, 1989). Médias mensais de temperatura da IQG variam de 18,3°C em agosto à 27,2°C em março e a precipitação pluviométrica fica entre 0,2mm em julho e 135,2mm em dezembro (MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013). A vegetação da ilha é de Mata Atlântica, porém existem áreas alteradas com a presença de gramíneas (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002; MARTINS; SAWAYA; MARQUES, 2008). A fauna local é composta por 68 espécies de aves - entre residentes e migratórias – duas espécies de morcegos, duas espécies de anfíbios, três espécies de lagartos, duas espécies de anfisbenídeos e uma serpente além da jararaca ilhoa. Não existem mamíferos terrestres na ilha (MONTANHINI, 2010).

O primeiro registro da Ilha da Queimada Grande foi durante expedições colonizadoras portuguesas, em 1532. Trezentos anos depois, no final do século XIX a Marinha do Brasil implantou um farol, cuja manutenção era feita por faroleiros que

residiam na ilha. Por causa da excessiva população de serpentes, ateava-se fogo na vegetação, provocando grandes incêndios que podiam ser vistos do continente, por causa disso a ilha recebeu o nome de Ilha da Queimada Grande. Não existem registros oficiais de acidente ofídico nessa época, mas sabe-se que no início do século XX o faroleiro enviou os primeiros indivíduos de jararaca-ilhoa para o Instituto Butantan, quando então pode ser descoberta pela comunidade científica (KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2012).

2.2 A JARARACA ILHOA

Bothrops insularis (Figura 3), popularmente conhecida por jararaca-ilhoa, é um viperídeo que pertence ao “Grupo Jararaca” juntamente com *Bothrops alcatraz* (endêmica do arquipélago de Alcatrazes), *Bothrops otavioi* (endêmica da Ilha de Vitória, São Sebastião) e com *Bothrops jararaca* (a jararaca comum do continente) (BARBO et al., 2012). Ela é endêmica da Ilha da Queimada Grande, e sua provável origem deve ter ocorrido há 11.000 anos, por especiação alopátrica em decorrência do isolamento geográfico ocorrido pelas diversas variações no nível do mar durante o final do Pleistoceno (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002). Esses autores ainda sugerem que a jararaca ilhoa e a jararaca do continente tiveram um ancestral comum, porém existem evidências genéticas de que *B. insularis* tenha se diferenciado da própria *B. jararaca* (GRAZZIOTIN et al., 2006).

Os primeiros exemplares de jararaca-ilhoa chegaram ao Instituto Butantan em 1911, enviados pelo então faroleiro da ilha da Queimada Grande (KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2012). Inicialmente foi descrita como *Lachesis lanceolatus* (atualmente *B. jararaca)*, mas alguns anos depois, o pesquisador da extinta “Secção de Ophiologia”, Afrânio do Amaral, em visita a ilha percebeu se tratar de uma espécie diferente da jararaca do continente e então classificou como *Lachesis insularis* (AMARAL, 1921) e posteriormente em *Bothrops insularis* (AMARAL, 1929).

Figura 3 – Individuo de *Bothrops insularis* em vida livre

Fonte: (DIEGO MUNIZ, 2013).

A jararaca-ilhoa é diferente morfologicamente da jararaca do continente, tem coloração pardo-amarelada, cabeça larga, apresenta a porção rostral da cabeça relativamente curta e estreita, corpo delgado e achatado lateralmente, com cauda ligeiramente preênsil (MARTINS et al., 2001). Os machos atingem comprimento rosto-cloacal (CRC) médio de 61,9cm e fêmeas de 72,1cm (MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Martins et al. (2001) a descreve como sendo diurna, semi-arborícola, e uma com alimentação predominantemente composta por aves migratórias durante a vida adulta, diferentemente da jararaca do continente, que tem hábito noturno e alimentação generalista (composta por mamíferos, aves, anfíbios e lagartos). A dieta de indivíduos jovens é composta de animais ectotérmicos, como artrópodes, anfíbios e lagartos (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002), e a ação do veneno de *B. insularis* apresenta especificidade para as presas locais (ZELANIS; TRAVAGLIA-CARDOSO; FURTADO, 2008). A jararaca-ilhoa parece se alimentar com mais frequência no final da estação chuvosa (fevereiro e março) e no final da estação seca (agosto e setembro), quando acontecem os picos migratórios de *Elaenia chilensis* e *Turdus flavipes*, respectivamente (MONTANHINI, 2010). Apesar da abundância da corruíra

(*Troglodytes musculus*) na ilha, essa espécie residente nunca foi encontrada no conteúdo estomacal de *B. insularis*, provavelmente devido a sua agilidade natural (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002; MONTANHINI, 2010).

2.2.1 Reprodução

Bothrops insularis tem ciclo reprodutivo sazonal e suas estratégias reprodutivas são semelhantes à espécie continental *B. jararaca* (KASPEROVICZUS, K., 2009). As fêmeas são maiores que os machos e esses não apresentam comportamento de combate. A cópula ocorre durante a estação seca, de março à agosto, porém machos são avistados procurando por fêmeas mais intensamente durante o inverno, nos meses de junho e julho (KASPEROVICZUS, 2009; MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013).

Fêmeas de *B. insularis* apresentam ciclo reprodutivo extenso, aparentemente bianual e com baixa fecundidade. O início de deposição de vitelo nos folículos acontece em março e aumento substancial no tamanho folicular entre julho e novembro. A ovulação ocorre dissociada da época de cópula, na metade da primavera, isso devido ao fato de haver estocagem de espermatozoides no útero (KASPEROVICZUS, 2009). A gestação ocorre entre outubro e abril, durante os meses mais quentes, e tem duração estimada de quatro a cinco meses. O nascimento dos filhotes ocorre no final do verão, época de chuva, abundante de presas como anfíbios, lagartos e centopeias (KASPEROVICZUS, 2009; MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013). Todas as fêmeas possuem hemipênis, conferindo a elas um grau de intersexualidade.

Conforme Kasperoviczus (2009), os machos apresentam espermatogênese sazonal, com início em abril e término em outubro. A espermatogênese, portanto, ocorre do outono até a metade da primavera, sendo associada ao período de cópula. Durante o verão os testículos ficam inativos, contudo, existe estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes durante o ano todo. Conforme Silva et al. (2015), não existe variação de volume seminal entre as estações do ano, porém indivíduos adultos apresentam melhor qualidade seminal do que jovens durante o outono e início do inverno - época de acasalamento.

2.3 DOSAGEM HORMONAL NÃO INVASIVA

O uso de métodos não invasivos para investigação hormonal iniciou-se na década de 1970, para determinação sexual em aves. Na década seguinte diversos trabalhos foram realizados em animais de produção e desde então essa ferramenta vem sendo amplamente utilizada no monitoramento reprodutivo de animais domésticos e selvagens (SCHWARZENBERGER et al., 1996; VAZ GUIMARÃES, 2003). A dosagem hormonal não invasiva permite uma avaliação reprodutiva longitudinal, sem necessidade de perturbação dos indivíduos, sendo de grande importância para a conservação e manutenção de espécies selvagens (MONFORT, 2002). Quando avaliada em conjunto com informações de comportamento reprodutivo pode fornecer dados precisos sobre a fisiologia endócrina das espécies (SCHWARZENBERGER, 2007).

A dosagem de metabólitos de esteroides a partir das fezes é o método não invasivo mais utilizado de avaliação hormonal. As vantagens da sua utilização são a facilidade de obtenção, simples manuseio e conservação, redução dos riscos causados pela contenção tanto para o animal quanto para o operador, maior confiabilidade dos resultados devido à ausência de estresse, além da possibilidade de colheita seriada de amostras e avaliação em animais de pequeno porte (SCHWARZENBERGER et al., 1996; VAZ GUIMARÃES, 2003; KERSEY; DEHNHARD, 2014). No entanto, essa técnica também apresenta desvantagens, tais como: a degradação microbiana dos metabólitos hormonais após a defecação, o grande número de metabólitos gerados a partir de um único hormônio e a necessidade de sua validação para cada espécie e grupo hormonal a ser avaliado (BUCHANAN; GOLDSMITH, 2004; PALME, 2005; SCHWARZENBERGER, 2007). Por esse motivo, diversos autores além de realizarem a validação do ensaio, ainda comprovaram a confiabilidade dos métodos não invasivos por meio da demonstração de correspondência entre a concentração plasmática dos hormônios esteróides e a concentração de seus metabólitos nas fezes (WASSER et al., 1993; BERKELEY et al., 1997; CAPEZZUTO et al., 2008).

Hormônios esteroides presentes na circulação sanguínea são metabolizados no fígado antes de serem excretados pela urina ou fezes e durante a passagem pelo intestino, podem ser reabsorvidos através da circulação entero-hepática

(SCHWARZENBERGER et al., 1996; WHITTEN; BROCKMAN; STAVISKY, 1998). Portanto os hormônios dosados nas fezes refletem um acontecimento endócrino de um determinado período anterior ao da coleta e esse tempo de atraso pode variar de minutos à dias, de acordo com a espécie e com ritmo de atividade do animal (PALME, 2005). No plasma sanguíneo o hormônio é mensurado, porém nas fezes são mensurados metabólitos do hormônio original (GOYMANN, 2005).

As técnicas imunológicas de radioimunoensaio (RIA) e enzimaimunoensaio (EIA) são as mais utilizadas para mensuração hormonal por serem capazes de detectar pequenas quantidades de hormônio. RIA tem alta sensibilidade e se tornou a técnica mais comumente utilizada até os anos 2000, contudo a necessidade de um laboratório preparado e com licença para o uso de materiais radioativos tornou a EIA mais popular nos últimos anos (BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004; PALME, 2005). Além dessa importante questão, os ensaios imunoenzimáticos são tão sensíveis quando os RIA, estáveis e de fácil execução. *Kits* comerciais são amplamente utilizados nos monitoramentos hormonais não invasivos, mas por serem de alto custo, muitas instituições brasileiras vêm adotando a compra de reagentes separadamente e realizando a montagem dos imunoensaios. Todavia essa alternativa enfrenta, muitas vezes a dificuldade de importação de certos reagentes imunoenzimáticos, provocando atraso na realização desses ensaios (PEREIRA, 2007).

2.3.1 Dosagem hormonal não invasiva em répteis

Apesar de amplamente utilizada em mamíferos e aves, poucos pesquisadores utilizaram a mensuração de metabólitos de hormônios esteróides a partir das fezes para acessar o ciclo reprodutivo ou avaliar estresse em répteis. Na década de 1990 foram produzidas apenas duas publicações sobre monitoramento reprodutivo a partir de metabólitos fecais de Testudines (DOBELI et al., 1992; CASARES, 1995). Alguns anos depois, um grupo australiano realizou uma tentativa de monitoramento reprodutivo de machos de lagarto-de-língua-azul (*Tiliqua nigrolutea*) por radioimunoensaio (RIA), mas apesar de conseguir realizar as mensurações hormonais, não as consideraram úteis na determinação do *status* reprodutivo

(ATKINS; JONES; EDWARDS, 2002). Pesquisadores, (RITTENHOUSE et al., 2005) monitoraram com êxito a excreção de glucocorticóides em tartaruga-de-caixa (*Terrapene carolina*) com o objetivo de analisar o estresse causado pelo uso de radiotransmissores em animais de vida livre. Mais tarde um grupo canadense (KUMMROW et al., 2011) obteve sucesso na validação e caracterização de metabólitos fecais de esteróides sexuais de fêmeas de camaleão calyptratus (*Chamaeleo calyptratus)* por enzimaimunoensaio (EIA). Posteriormente, correlacionaram o ciclo dos metabólitos fecais de estrógeno, testosterona e progesterona com imagens da atividade ovariana por ressonância magnética (KUMMROW et al., 2010).

Nos últimos cinco anos, alguns trabalhos foram publicados utilizando diversas matrizes para acesso de perfil de glicorticóides, com objetivo de avaliar estresse. Análise fecal de iguanas verdes (*Iguana iguana*) foi utilizada em comparação com avaliação comportamental e se mostrou eficiente para comprovar a ação de agentes estressores (KALLIOKOSKI et al., 2012). O primeiro relato de utilização de métodos não invasivos de avaliação hormonal em serpentes (BERKVENS et al., 2013), utilizou fezes e muda de pele para mensurar corticosterona em cobra-de-casa-africana (*Lamprophis fuliginosus*) e em cascavel de massasauga (*Sistrurus catenatus catenatus*). A avaliação da função adrenocortical através das fezes foi validada e se mostrou eficiente em crocodilos do nilo (*Crocodylus niloticus*) (GANSWINDT et al., 2014). O estresse de longa duração foi avaliado por meio das garras de uma espécie de cágado (*Chrysemys picta marginata*), comparando indivíduos de áreas mais e menos impactadas por rodovias (BAXTER-GILBERT et al., 2014). Metabólitos fecais de glicocorticoides foram mensurados por radioimunoensaio no colubrídeo *Thamnophis sirtalis,* com o intuito de predizer a adequação a determinados ambientes (HALLIDAY; GILMOUR; BLOUIN-DEMERS, 2015). Todavia, até o presente momento não foram encontrados trabalhos de dosagem de metabólitos de esteróides sexuais através das fezes em serpentes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Aprofundar o conhecimento relativo ao ciclo reprodutivo de machos de *Bothrops insularis*.
- Adaptar e validar um método de monitoramento endócrino não invasivo para serpentes por enzimaimunoensaio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis plasmáticos de testosterona em machos de *Bothrops insularis* nas quatro estações do ano;
- Determinar os níveis de metabólitos fecais de andrógenos em machos de *Bothrops insularis* ao longo de 36 meses;
- Correlacionar os dados hormonais obtidos invasivamente com aqueles adquiridos de forma não invasiva;
- Comparar dados de temperatura e umidade com os parâmetros hormonais.
- Comparar os resultados hormonais com os dados de literatura sobre produção espermática, análise seminal e estocagem de espermatozóides nos ductos deferentes em *Bothrops insularis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O monitoramento endócrino não invasivo realizado no presente trabalho seguiu as etapas de validação do ensaio imunoenzimático e subsequente dosagem hormonal longitudinal tanto da testosterona plasmática quanto dos metabólitos de andrógenos fecais. Para ambos foram utilizados os mesmos animais, sob as mesmas condições de manejo.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados oito machos adultos de *B. insularis*, mantidos no biotério da sede do Projeto de Conservação da Jararaca-ilhoa, localizado no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em cativeiro desde outubro de 2009 (licença SISBIO n. 25650-1) e estiveram sob a responsabilidade da pesquisadora Selma Maria de Almeida Santos, vinculada ao Instituto Butantan (IB).

Durante os 36 meses do estudo, os animais variaram de comprimento e massa corporal. O comprimento rostro-cloacal (CRC) variou de 65 à 79cm entre todos os machos, sendo que o crescimento máximo encontrado em um mesmo indivíduo foi de 5,3cm e alguns animais não aumentaram de tamanho durante o período avaliado. No início dessa avaliação, a menor massa corporal foi de 92g e a maior de 158g. As massas corporais variaram ao longo do estudo e ao final dele, o menor valor foi de 102g e o maior valor de 166g.

Todos os machos escolhidos para o projeto demonstram comportamento reprodutivo em cativeiro e alguns indivíduos tiveram sucesso na produção de filhotes. Todas as serpentes foram mantidas individualizadas em caixas plásticas transparentes (56,4 x 38,5 x 37,1cm) com tampa e laterais perfuradas e forradas com papelão corrugado. Durante o período reprodutivo machos e fêmeas eram

colocados em pares de acordo com o programa de cruzamentos instituído. A sala onde foram acondicionadas as caixas contendo essas jararacas manteve as condições naturais de fotoperíodo (latitude 23°S), temperatura e umidade, as quais foram frequentemente monitoradas e anotadas. Nos dias mais frios um aquecedor do tipo climatizador (Philco, modelo Ambience NQF) com controle manual foi utilizado para aquecer a sala, durante a noite o aquecedor era desligado. A dieta dos animais era composta de camundongos (*Mus musculus*) provenientes do Biotério do IB que foram oferecidos em intervalos regulares de 30 dias, respeitando-se a proporção de 10 a 20% do peso do indivíduo. Durante o período de pareamento reprodutivo não foi oferecida alimentação para os animais. Foi fornecida água fresca *ad libitum*. Dados referentes ao comportamento reprodutivo e sanidade foram diariamente repassados aos arquivos do Projeto de Conservação da Jararaca-ilhoa, e foram também considerados durante a análise dos resultados hormonais.

4.3 DADOS AMBIENTAIS

Os dados de temperatura e umidade relativa do ar considerados nesse estudo foram aferidos durante o período de janeiro de 2012 até junho de 2014. Com base em aferições diárias, foram calculadas médias mensais para as máximas e mínimas registradas, tanto para a temperatura quanto para umidade. Houve períodos com falhas nos registros, mas foi possível apresentar dados em todos os meses do ano. Temperatura foi aferida em graus Celcius e umidade relativa do ar em porcentagem.

4.4 COLETA DE FEZES

A inspeção para observação da presença de fezes foi realizada durante a manutenção diária que ocorre no biotério. As fezes dos animais foram coletadas diretamente da caixa, tomando-se o cuidado de excluir os uratos do restante da excreta, sempre que possível. Para a coleta desse material e subsequente limpeza da caixa, o animal foi retirado dela com auxílio de gancho, alocado em outra caixa

com tampa furada e posteriormente foi devolvido à sua caixa de origem. Todas as defecações produzidas entre agosto de 2011 e julho de 2014 foram coletadas, acondicionadas em tubos plásticos com tampa, identificadas e armazenadas em congelador doméstico à -20°C. Eventualmente amostras secas (velhas) ou liquefeitas foram descartadas do estudo.

Como a rotina de alimentação dos animais acontece no início de cada mês, e as defecações ocorreram todas até o dia 20 de cada mês, as estações do ano foram definidas da seguinte forma: verão, de janeiro à março; outono, de abril à junho; inverno, de julho à setembro; primavera, de outubro à dezembro.

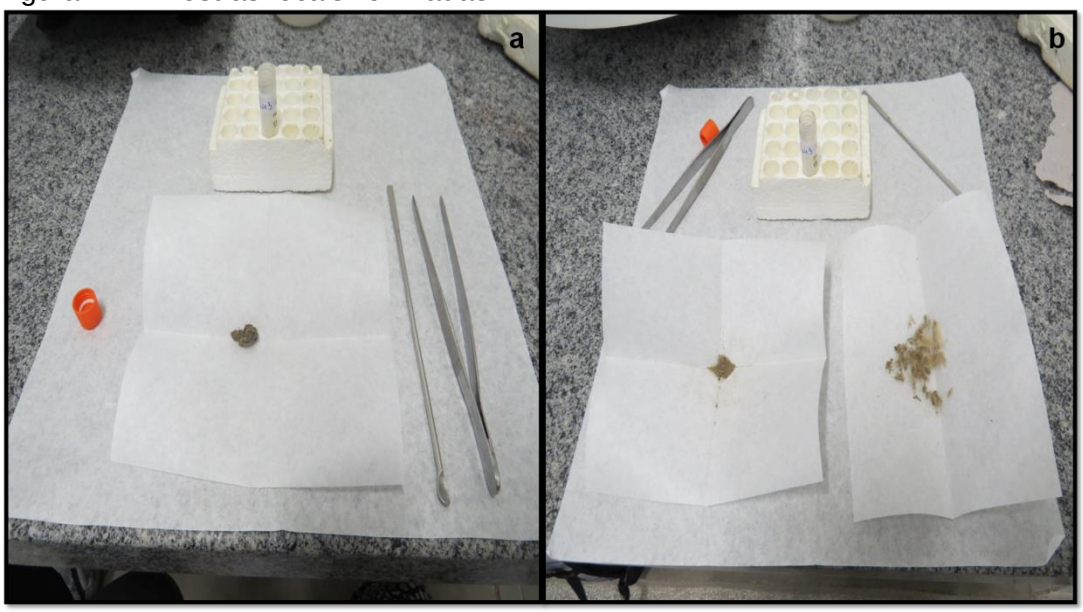
4.5 COLHEITA DE SANGUE

Para a colheita do sangue os animais foram mantidos sob contenção física em tubo plástico transparente, deixando-se o terço final do animal livre para acesso da cauda. A punção venosa foi realizada pela veia caudal após limpeza da região com algodão embebido em álcool iodado. Foram utilizadas seringas descartáveis de 1mL com agulhas de calibre 13x45mm. Os animais foram pesados e o volume coletado foi em torno de 0,8mL, respeitando-se o limite de 1% do peso do animal. As amostras de sangue foram homogeneizadas gentilmente com heparina sódica em criotubos e centrifugadas a 3.500 rpm por cinco minutos para obtenção do plasma. Os plasmas foram acondicionados em microtubos previamente identificados, e foram mantidos congelados à -80°C até análise hormonal. Ao total foram obtidas 31 amostras - foram realizadas quatro coletas por animal, uma para cada estação do ano, com exceção de um indivíduo no verão, por não ter sido possível a realização da punção venosa. As coletas foram executadas nas seguintes datas: 21 de agosto de 2012 (inverno), 21 novembro de 2012 (primavera), 20 de fevereiro de 2013 (verão) e 3 de junho de 2013 (outono), no período entre as 10 e 12h.

4.6 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS FECAIS

O protocolo de extração foi realizado conforme Graham et al. (2001), com algumas modificações. Sucintamente, as fezes congeladas foram liofilizadas por aproximadamente 24 horas, posteriormente foram separados os pelos e ossos (provenientes dos roedores utilizados como alimentação) da matéria fecal e realizou-se a pesagem individual (Figura 4). As amostras fecais foram colocadas em tubos de vidro, e adicionou-se uma quantidade de metanol 80% na proporção de 1mL para cada 0,05g de fezes. Em seguida foram agitadas em vortex por 30 segundos e posteriormente em agitador de Kline por 12 horas. Após esse período, as amostras foram agitadas novamente em vortex por 30 segundos e centrifugadas a 400 G por 20 minutos, os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos e estocados à −20°C até o momento do ensaio imunoenzimático.

Figura 4 – Amostras fecais liofilizadas



Fonte: (arquivo pessoal).
Legenda: a) amostra fecal liofilizada íntegra; b) amostra fecal liofilizada livre de pelos e ossos (esquerda) ao lado dos pelos removidos da mesma amostra (direita).

4.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

A testosterona plasmática e os metabólitos de andrógenos fecais foram mensurados por ensaio imunoenzimático (EIA). O anticorpo utilizado para andrógenos foi o R156/7, provenientes da California University - DAVIS/CA – USA. A reação cruzada foi descrita por Polegato (2004) como sendo: 100% para testosterona; 57.37% para 5B dihidrotestosterona; 0.27% para androstenediona; 0.4% para androsterona; e <0,04% para todos os outros metabólitos analisados. A escolha dos anticorpos ocorreu seguindo o principio da validação do ensaio relatado por Goymann (2005), utilizando os testes de paralelismo, dose-resposta e validação fisiológica (BROWN; WALKER; STEINMAN, 2004). As dosagens de todas as amostras foram feitas em duplicata.

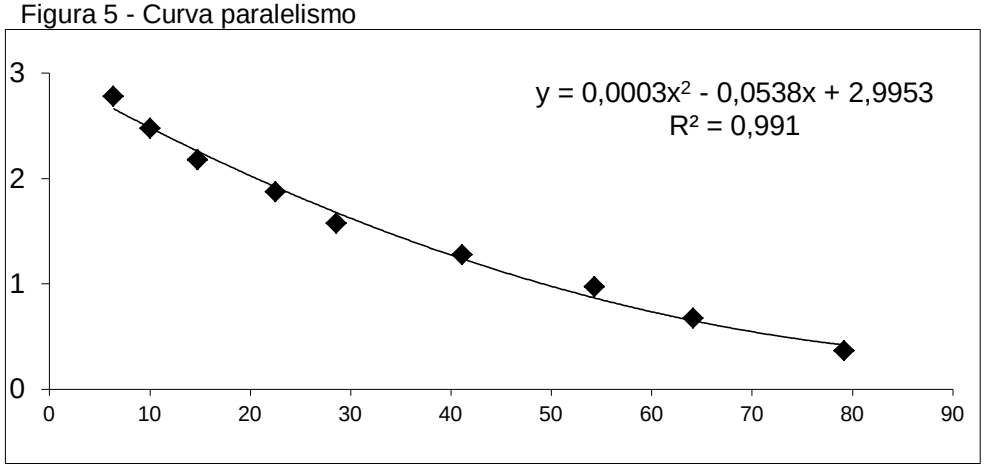
4.7.1 Validação do ensaio

O teste do paralelismo é uma forma de determinar se o ensaio está realmente medindo o metabólito de interesse. Nesse teste, o pool de amostras fecais apresentou um perfil semelhante ao da curva padrão perante sua diluição seriada, gerando uma curva com disposição paralela à curva padrão, (Figura 5). Esse teste também informa a melhor diluição para as dosagens das amostras, que nesse caso foi de 1:8.

No teste da curva de dose-resposta, o acréscimo de hormônio exógeno obteve recuperação significativa do anticorpo utilizado, gerando a curva apresentada na Figura 6 ($y=0,8406x +0,0349$, $R^2=0,9912$), apresentando-se dentro do intervalo aceitável para validação (R^2 entre 0,8 a 1,2).

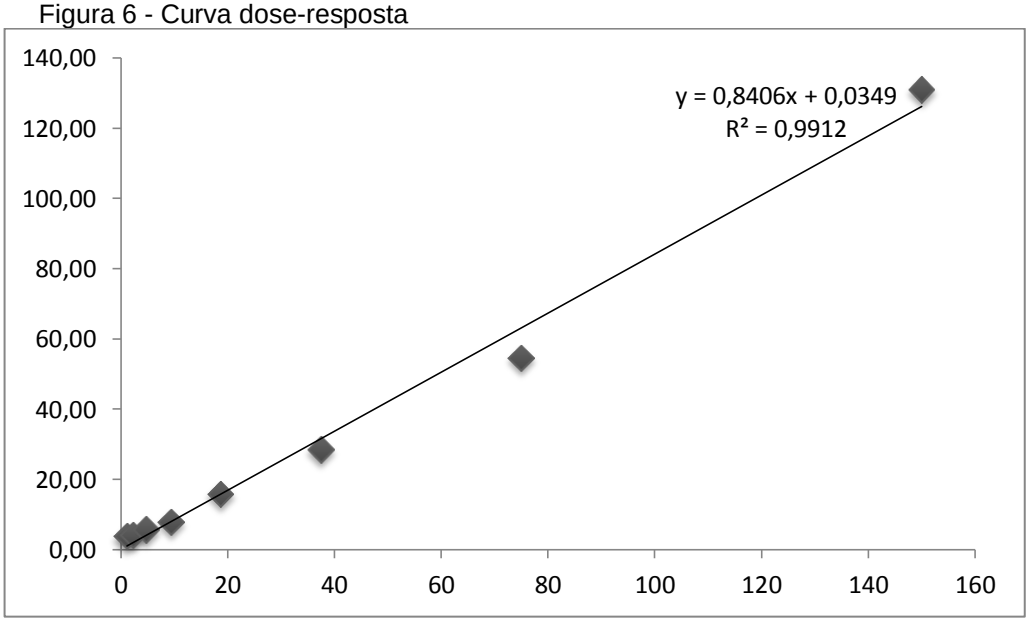
Os coeficientes de variação interensaio foram < 11% e os coeficientes de variação intraensaio foram < 6% estando de acordo com os padrões de qualidade recomendados.

Figura 5 - Curva paralelismo



Diluição seriada das amostras em disposição paralela à curva padrão (R^2= 0,991).

Figura 6 - Curva dose-resposta



Testosterona adicionada (eixo x) *versus* testosterona recuperada (eixo y), (R^2=0,9912).

4.7.2 Validação fisiológica

A validação fisiológica proposta inicialmente, consistiu na colocação de um implante subcutâneo de GnRH (análogo sintético) em quatro machos, com objetivo de causar um aumento na produção de testosterona e que esse aumento fosse refletido nas amostras fecais subsequentes, sendo útil para provar que o EIA é capaz de distinguir flutuações fisiológicas na excreção hormonal.

A aplicação dos implantes foi realizada em março de 2014, inserida na região subcutânea no terço proximal do corpo da serpente. O fármaco utilizado consistiu em uma microfração do implante comercial Suprefact® Depot (acetato de busserrelina, Sanofi Aventis). As amostras fecais obtidas pós-implante foram coletadas nos quatro meses subsequentes. Não foi verificado o aumento esperado de andrógenos fecais em função da aplicação do implante, dessa forma o análogo de GnRH não se mostrou eficiente nos machos de *Bothrops insularis* avaliados.

Em virtude desses fatos, uma validação biológica deve ser realizada através da comparação de dosagens de machos adultos e filhotes.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do programa SAS System for Windows 9.3 (SAS, 2000). Através do aplicativo Guided Data Analisys, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Quando não obedeciam a estas premissas, eram transformados (logaritmo 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. Na avaliação do efeito do tempo (por meses e sazonalidade) foram utilizados os testes LSD (Least Significant Difference; comparações múltiplas) para variáveis paramétricas e o teste de Wilcoxon para variáveis não paramétricas.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos erros padrões (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais. O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, ou seja, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre os meses e estação do ano para um nível de significância menor que 0,05.

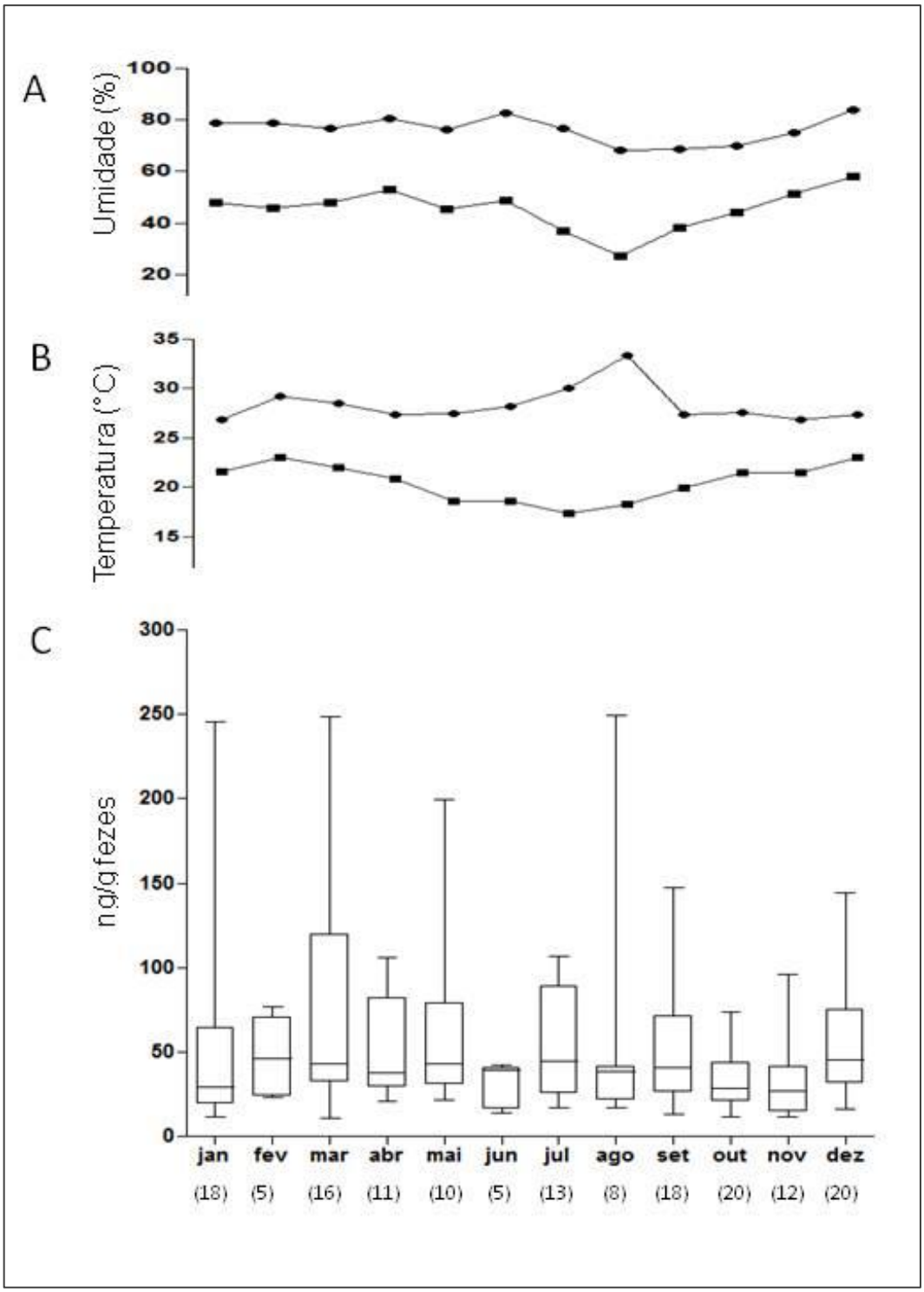
5 RESULTADOS

Ao longo dos 36 meses de coletas foi possível realizar a dosagem hormonal em 156 amostras fecais. A distribuição das concentrações mensais de metabólitos de andrógenos fecais está representada em formato *boxplot* na Figura 7, juntamente com dados ambientais da sala onde ficaram alojadas as serpentes, coletados durante o período do estudo.

As temperaturas máximas registradas ficaram entre 26,8°C (em novembro) e 33,3°C (em agosto). As temperaturas mínimas registradas ficaram entre 17,4°C (em julho) e 23°C (em fevereiro). Os valores máximos de umidade relativa do ar encontraram-se entre 68,2% (em agosto) e 84% (em dezembro). Os valores mínimos de umidade apresentam-se entre 26,9% (em agosto) e 58% (em dezembro). O mês que apresentou maior diferença entre as temperaturas e umidades máximas e mínimas (maior amplitude) foi agosto.

A análise estatística revelou não haver diferença significativa nas dosagens hormonais fecais avaliadas mês à mês ($p=0,229$) e por estação do ano ($p=0,315$), bem como as dosagens de testosterona plasmática avaliadas quanto à estação ($p=0,225$). O número de amostras fecais utilizados em cada estação teve a seguinte distribuição: 52 na primavera, 39 no verão, 26 no outono e 39 no inverno. O número total de amostras sanguíneas foi de 30, sendo oito na primavera, sete no verão, sete no outono e oito no inverno. As concentrações de andrógenos fecais variaram entre 10,9 à 249,3 ng/g de fezes, enquanto as concentrações de testosterona plasmática variaram de 0,07 à 0,30 ng/mL de plasma. Médias e erros padrão das concentrações mensais e sazonais das concentrações de andrógenos fecais e de testosterona plasmática encontram-se expressos na Tabela 1. A representação gráfica das variações sazonais fecais e plasmáticas encontra-se na Figura 8.

Figura 7 – Concentrações médias mensais de metabólitos de andrógenos fecais, temperatura e umidade relativa do ar



Legenda: (A) - médias mensais de umidade relativa do ar máximas (cículos) e mínimas (quadrados), expressas em porcentagem (%); (B) - médias mensais de temperatura ambiental máxima (círculos) e mínima (quadrados), expressas em graus Celcius (°C); (C) - *boxplot* mensal de metabólitos de andrógenos fecais, expressos em ng/g de fezes, os números em baixo dos meses correspondem ao número de indivíduos que compõe a sua média, não existe diferença estatística ao longo do ano (p=0,154).

Tabela 1 – Média e erro padrão das concentrações de metabólitos de andrógenos fecais e testosterona plasmática

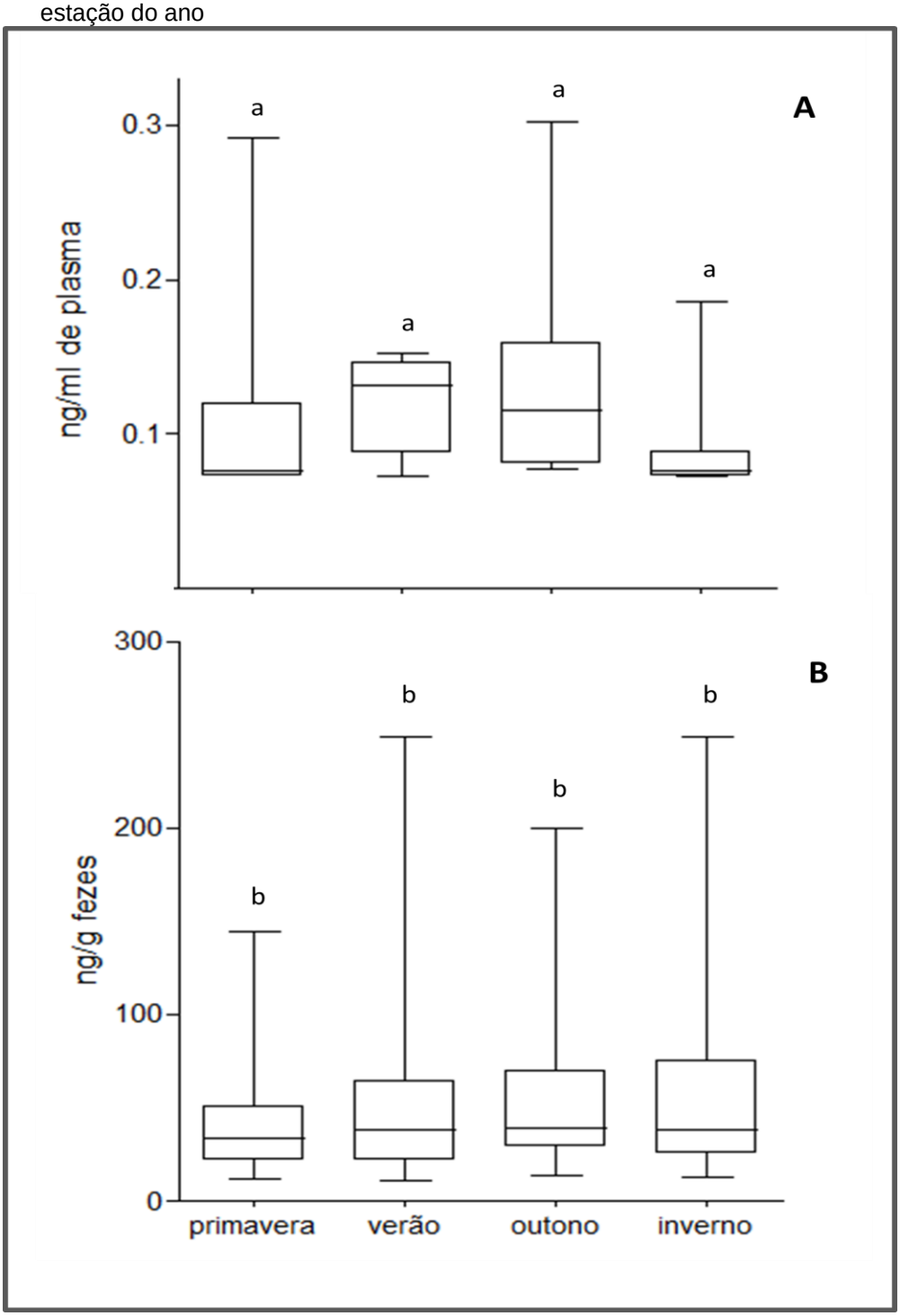
	fezes			fezes		plasma	
mês	**média ± EP**	**N**	**estação**	**média ± EP**	**N**	**média ± EP**	**N**
janeiro	39,44 ± 8,12	18	**verão**	59,45 ± 9,35	39	0,120 ± 0,011	7
fevereiro	47,02 ± 10,59	5					
março	58,96 ± 11,50	16					
abril	52,97 ± 9,93	11	**outono**	57,56 ± 9,29	26	0,134 ± 0,030	7
maio	51,64 ± 13,80	10					
junho	30,63 ± 5,94	5					
julho	55,83 ± 9,25	13	**inverno**	55,35 ± 7,47	39	0,914 ± 0,014	8
agosto	31,73 ± 4,04	8					
setembro	52,70 ± 8,64	18					
outubro	33,49 ± 3.97	20	**primavera**	42,09 ± 4,08	52	0,111 ± 0,027	8
novembro	35,24 ± 8,07	12					
dezembro	54,93 ± 7,97	20					
	p=0,229			p=0,315		p=0,225	

Legenda: Média expressa em ng/g de fezes e ng/mL de plasma; N corresponde ao número de indivíduos amostrados; EP= erro padrão; não houve diferença significativa na avaliação mensal e por estações do ano nas dosagens fecais e plasmática (p>0,05).

Todos os machos desse estudo apresentaram comportamento reprodutivo de corte em algum momento durante o tempo em que estiveram pareados com as fêmeas durante o período de monitoramento desse estudo. Os pareamentos foram realizados no outono e inverno, entre maio e julho, de acordo com o programa de cruzamento instituído. Seis dos oito machos tiveram sucesso reprodutivo, com base na produção de filhotes das fêmeas aos quais foram pareados.

Durante o estudo dois animais vieram a óbito sem causa definida, em março e abril de 2014. As amostras fecais e sanguíneas desses indivíduos foram mantidas na presente avaliação. Nenhum desses indivíduos havia recebido o implante de GnRH.

Figura 8 – Concentrações de testosterona plasmática e metabólitos de andrógenos fecais em cada estação do ano



Legenda: A) variação das concentrações de testosterona plasmática nas estações do ano expressos em ng/mL, letras idênticas mostram diferença não significativa (p>0,05); B) variação das concentrações de metabólitos de andrógenos fecais nas estações do ano expressos em ng/g de fezes, letras idênticas mostram diferença não significativa (p>0,05).

6 DISCUSSÃO

A grande maioria dos trabalhos que avaliam ciclo reprodutivo em serpentes através da mensuração hormonal contemplam animais de regiões temperadas ou subtropicais, com espermatogênese e quiescência testicular marcadas. Nesses estudos, geralmente são encontrados picos hormonais que acompanham a época de produção de espermatozoides e/ou a época de cópulas (BONA-GALLO et al., 1980; NAULLEAU; FLEURY; BOISSIN, 1987; BONNET; NAULLEAU, 1996; SCHUETT et al., 2002; TAYLOR; DENARDO; JENNINGS, 2004; SCHUETT et al., 2005; GRAHAM et al., 2008; LORENZ et al., 2011; KING; BOWDEN, 2013). Muitas dessas avaliações endócrinas não puderam ser realizadas durante alguns meses do inverno porque os animais ficam inacessíveis em hibernáculos. Até então apenas Schuett (2006) fez uma avaliação durante a hibernação de *Crotalus atrox* e revelou que os níveis de hormônios sexuais não são basais durante esse período, como pressupõe a literatura corrente. Poucos monitoramentos longitudinais foram realizados em serpentes tropicais (GORMAN; LICHT; MCCOLLUM, 1981; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; MATHIES et al., 2010; HOLDING et al., 2014), e apenas dois em serpentes tropicais mantidas em cativeiro (ALDRIDGE; ARACKAL, 2005; GREGO, 2006), sendo que o segundo não teve um enfoque reprodutivo. No presente monitoramento endócrino realizado com *B. insularis* cativas, não foi encontrada sazonalidade dos andrógenos em machos, apesar de estudos prévios indicarem um período de pausa testicular durante os meses do verão (KASPEROVICZUS, 2009).

Os valores de testosterona plasmática aqui apresentados (0,07 à 0,30 ng/mL de plasma) diferem da literatura, sendo os mais baixos já registrados para machos (NAULLEAU; FLEURY; BOISSIN, 1987; SCHUETT et al., 2002; TAYLOR; DENARDO; JENNINGS, 2004; ZACARIOTTI, 2004; SCHUETT et al., 2005; GRAHAM et al., 2008). Mais baixos que os encontrados por Mathies et al. (2010), onde 63% dos indivíduos tiveram níveis de testosterona menores que 5ng/ml e mais baixos, inclusive, que os encontrados em *Bothrops jararaca* de cativeiro (GREGO, 2006).

As dosagens plasmáticas foram realizadas de forma pontual, com uma amostragem por indivíduo em cada estação do ano. Dessa forma, mesmo que

houvesse um pico de produção de testosterona, esse poderia ter sido subdetectado por causa da frequência de colheita. Para um efetivo monitoramento endócrino longitudinal são necessárias coletas sucessivas de sangue (SCHWARZENBERGER et al., 1996), o que não foi possível devido ao tamanho dos animais, para evitar o estresse e também por não ser o foco desse estudo. Em serpentes, tem-se observado que coletas mensais são suficientes para detectar flutuações hormonais naquelas espécies com época reprodutiva bem definida (NAULLEAU; FLEURY; BOISSIN, 1987; SCHUETT et al., 2002; TAYLOR; DENARDO; JENNINGS, 2004; SCHUETT et al., 2005; GRAHAM et al., 2008) e também naquelas assazonais (MATHIES et al., 2010). Outra questão a ser considerada, é o fato desses estudos terem sido realizados com animais de vida livre, sem haver coletas repetidas dos mesmos indivíduos, possibilitando um número maior de amostras, sendo mais fácil a detecção de flutuações hormonais. Entretanto, apesar da baixa frequência de coleta sanguínea, existe uma correspondência entre as concentrações plasmáticas de testosterona e as concentrações de andrógenos fecais, de forma que ambas não apresentam variações ao longo do ano. Atkins, Jones e Edwards (2002) não encontraram tal correspondência em *Tiliqua nigrolutea* e consideraram o uso de dosagem hormonal fecal ineficiente para acessar o *status* reprodutivo nessa espécie.

Esse é o primeiro estudo que mensura metabólitos de andrógenos fecais em serpentes e os relaciona com eventos reprodutivos. Apesar de terem sido coletadas praticamente todas as defecações dos oito animais por 36 meses, o número de amostras foi pequeno (156), isso por causa do padrão mensal de alimentação dos animais e devido ao fato de existirem períodos fisiológicos de anorexia, como por exemplo, a época de acasalamento. Esses fatos, juntamente com o tempo de transito intestinal longo – de 4 a 7 dias, semelhante ao encontrado por Lillywhite, De Delva e Noonan (2002) em outros viperídeos arborícolas - podem ter causado um viés nos resultados das dosagens. Entretanto, as concentrações aqui encontradas tiveram uma grande variação individual (vide amplitude de dosagens de cada estação da Figura 8), tanto nos indivíduos com defecação frequente, quanto naqueles após longos períodos de anorexia, tornando portanto, essa hipótese inconsistente.

O ciclo reprodutivo de machos de *B. insularis* foi considerado por Kasperoviczus (2009), como sendo sazonal e pré-nupcial de acordo com a

classificação proposta por Saint Girons (1982). Uma classificação mais recente apresentada por Mathies (2011), leva em consideração o indivíduo (três tipos) e a população (dois tipos) em uma análise que envolve em conjunto as atividades gonadais, de órgãos acessórios e esteroidogênica. O individuo pode ser considerado cíclico descontínuo quando existe um período de quiescência gonadal, cíclico contínuo quando não apresentam quiescência, apenas uma redução de atividade testicular em um período do ano e é considerado acíclico quando apresenta atividade gonadal o ano todo. Com relação à população ela pode ser considerada sazonal quando todos os indivíduos tem ciclicidade sincronizada, com a espermatogênese ocorrendo sempre na mesma época do ano, e assazonal quando os animais apresentam ciclos gonadais em momentos distintos entre si, ou quando os animais são acíclicos.

De acordo com a literatura extensivamente revisada por DeNardo e Taylor (2011) existe um padrão no perfil de concentração de testosterona de acordo com os ciclos reprodutivos. A maioria das espécies apresenta elevadas concentrações de testosterona plasmática durante o período de cópulas, estando ou não associadas à espermatogênese, sugerindo que esse hormônio seria essencial no comportamento reprodutivo. Seguindo essa lógica, os machos de *B. insularis* deveriam apresentar altos níveis de testosterona, pelo menos durante os meses mais intensos de cópulas (junho e julho), mas esse padrão não foi constatado. Outra associação bem estabelecida em squamata é a hipertrofia do segmento sexual renal (SSR) em resposta à níveis altos de andrógenos (KROHMER; MARTINEZ; MASON, 2004). Contudo, não existem dados a respeito do SSR em *B. insularis*, não sendo possível essa comparação.

Portanto, com base nos resultados aqui apresentados, nos quais não foi possível detectar diferença significativa na excreção de andrógenos ao longo do ano, a população de *B. insularis* poderia ser classificada como assazonal. A supracitada avaliação reprodutiva dessa espécie (KASPEROVICZUS, 2009) mostra que o diâmetro dos ductos deferentes e o volume relativo dos testículos não variaram entre a estação seca (outono e inverno) e chuvosa (primavera e verão), corroborando com os resultados aqui presentes. Dados históricos de comportamento em vida livre e cativeiro mostram um amplo período de corte e cópulas, de março à setembro (MARQUES; KASPEROVICZUS; ALMEIDA-SANTOS, 2013), o que sugeriria uma secreção hormonal constante durante boa parte do ano. Além disso,

já se sabe que os andrógenos tem um papel essencial no funcionamento normal do ducto deferente (KNOBIL; ROBAIRE; HERMO, 1988), local de estocagem de espermatozóies. Um estudo posterior com análise seminal em *B. insularis* cativas (SILVA et al., 2015) revelou que embora existam diferenças estacionais em alguns parâmetros, como a motilidade espermática, foi possível coletar amostras viáveis durante todo o ano, inclusive no período de quiescência testicular. Portanto mesmo que haja um período de pausa testicular, se o ciclo reprodutivo dos indivíduos for de fato não sincronizado, ou seja, assazonal, as dosagens hormonais avaliadas a nível populacional podem não mostrar diferença significativa ao longo do ano. Infelizmente, devido às falhas de defecações, os dados individuais não puderam ser avaliados de forma isolada para auxiliar a resolver essa questão.

Semelhante aos resultados hormonais aqui expostos, Mathies et al. (2010) também apresenta a assazonalidade reprodutiva em machos de *Boiga irregularis* – um colubrídeo de região tropical - e mostra que a espermatogênese, estocagem de espermatozoides e até mesmo a presença de SSR desenvolvido, nessa espécie, podem ocorrer em condições de baixas concentrações de testosterona, ao longo do ano. Eles encontraram em machos de vida livre indivíduos com altos níveis de testoterona, porém com distribuição aleatória ao longo do ano e associaram esses achados à possíveis cópulas recentes. Os animais do presente estudo não comeram e, portanto, não defecaram durante o período em que estavam pareados com as fêmeas, dessa forma não foi possível detectar picos hormonais associados à cópula, o que ajudaria a corroborar (ou não) com essa hipótese citada. Assim sendo, a sazonalidade reprodutiva de jararaca-ilhoa poderia ser determinada apenas pelas fêmeas, pois os machos estariam capazes de copular e fecundar a qualquer momento do ano, assim como ocorre no colubrídeo recém citado (BULL; MASON; WHITTIER, 1997).

De uma forma geral, animais de cativeiro são submetidos a um manejo totalmente diferente das condições de vida livre, tanto por não ser possível reproduzir as diferentes situações da natureza, quanto por não ser adequado para a saúde deles. Os indivíduos utilizados nesse estudo sofreram importantes alterações no manejo alimentar e de temperatura em comparação com os animais da IQG, o que pode ser a resposta para os resultados aqui encontrados. Sabe-se que em répteis, a temperatura tem papel importante na regulação da fisiologia reprodutiva (LICHT, 1979; ROSS; MARZEC, 1990; TAYLOR; DENARDO, 2010; KROHMER et

al., 2011), isso fica claro nos animais de clima temperado, que apresentam atividade reprodutiva após o término do período de hibernação (KROHMER et al., 2011), mas também é verdade para algumas espécies de clima tropical, que se mostram sensíveis a pequenas flutuações na temperatura e umidade (ROSS; MARZEC, 1990; BULL; MASON; WHITTIER, 1997) ou pluviosidade (BULL et al., 1997). Conforme (DENARDO et al., 2011) quando um organismo está em adequada condição fisiológica e a condição corporal é suficiente, a reprodução é iniciada por circunstâncias ambientais favoráveis, como temperatura e precipitação. Os gráficos da Figura 7 mostram que a temperatura da sala onde ficam alojadas as jararacas desse trabalho foi muito diferente do padrão de variação anual da IQG - para mais informações ver anexo de Kasperoviczus (2009). Nota-se que, incoerentemente, as temperaturas mais altas foram obtidas durante os meses de inverno, fenômeno causado pelo uso de aquecedor durante o dia nos meses mais frios. As temperaturas mínimas registradas nessa época do ano aparecem mais próximas da realidade, devido ao fato de desligar-se o aquecedor durante a noite e haver um resfriamento nesse período. Assim como acontece em algumas espécies de boídeos (ROSS; MARZEC, 1990), é possível que os machos cativos tenham sido sensíveis às quedas noturnas de temperatura e esse gatilho ter sido suficiente para estimular o comportamento reprodutivo, apesar das altas temperaturas registradas durante o dia nos meses de outono e inverno. Mathies e Miller (2003) também consideram que a atividade reprodutiva foi induzida por condições de sutis quedas de temperatura em um colubrídeo de região tropical. A umidade da sala também foi afetada pelo uso do aquecedor, de maneira geral o ambiente de cativeiro se mostrou mais seco que a IQG. A umidade apresentou uma grande variação entre a máxima e a mínima, não só na média mensal, como também nas aferições diárias. Dados de umidade relativa do ar na IQG mostram que em ambiente natural também há uma grande amplitude desse fator ambiental, sendo a máxima perto de 100% e a mínima em torno de 40%, contudo, sua média mensal fica entre 80 e 95% (considerado úmido) durante o ano todo (BOVO, 2009).

A alimentação oferecida no cativeiro difere totalmente daquela existente no ambiente natural, em tipo e frequência. Na IQG os animais sofrem com a escassez de alimento durante boa parte do ano, os picos de alimentação ocorrem no final do verão (mais abundante) e final do inverno (MONTANHINI, 2010). Coincidentemente a recrudescência testicular citada por Kasperovicsus (2009) ocorre no outono, pouco

tempo depois do principal período de alimentação das jararacas ilhoas. É sabido que a alimentação tem papel fundamental na reprodução de répteis, assim como muitas espécies de mamíferos e aves. *B. insularis* de vida livre sofre concomitantemente a influência da sazonalidade de presas – e portanto de reserva de gordura corporal – e de temperatura ambiental, e possivelmente esses sejam os gatilhos reprodutivos dessa espécie, regulando a produção hormonal e comportamental.

As condições ambientais as quais as *B. insularis* cativas foram submetidas, podem ter mascarado uma real sazonalidade existente em animais *in situ* e terem sido as causadoras da assazonalidade de andrógenos aqui encontrada. Um estudo longitudinal avaliando hormônios sexuais em animais de vida livre ajudaria a elucidar essa questão. Já está sendo realizado uma avaliação seminal nos animais da IQG, nos mesmos moldes e pelo mesmo grupo que Silva et al. (2015) fizeram em cativeiro, o que deve auxiliar a esclarecer melhor a sazonalidade reprodutiva de machos dessa espécie.

6 CONCLUSÕES

Foi possível adaptar e validar um ensaio imunoenzimático capaz de dosar testosterona plasmática e metabólitos de andrógenos fecais de *Bothrops insularis*. Esse estudo, além de aprofundar o conhecimento acerca do ciclo reprodutivo de machos de jararaca-ilhoa, abre portas para uma nova forma de monitoramento endócrino e reprodutivo em serpentes.

Machos de *B. insularis* são assazonais em relação aos níveis de testosterona plasmática e metabólitos de andrógenos fecais nas condições de cativeiro. Essa condição pode ser fruto de uma real assazonalidade em nível populacional ou ser um artefato das condições de temperatura, umidade e alimentação do cativeiro às quais esses animais foram submetidos. Apesar da ausência de sazonalidade de andrógenos os animais apresentaram comportamento reprodutivo com sucesso, havendo o nascimento de filhotes após pareamento durante o outono. Dessa forma, os níveis hormonais constantes aqui encontrados podem indicar que os andrógenos tenham um papel importante na estocagem de espermatozoides nos ductos deferentes, auxiliando na manutenção da qualidade seminal, tornando os machos aptos para a cópula em qualquer época do ano.

Diante da literatura existente que abrange uma imensa variedade de espécies, de regiões distintas, com história evolutiva diferente e diversos padrões reprodutivos, fica difícil determinar a lógica da fisiologia reprodutiva de serpentes do ponto de vista endócrino e comportamental. Mais estudos conduzidos com animais de vida livre e de cativeiro, bem como a investigação de mais espécies - incluindo as de clima tropical - são necessários para esclarecer, no futuro, a complexa relação entre hormônios e a reprodução em serpentes. Esse trabalho vem contribuir com esse propósito e ressalta a importância do conhecimento da fisiologia reprodutiva para a conservação, principalmente naquelas espécies ameaçadas de extinção para as quais existem programas de reprodução em cativeiro.

REFERÊNCIAS

ALDRIDGE, R. D.; ARACKAL, A. A. Reproductive biology and stress of captivity in male brown treesnakes (Boiga irregularis) on Guam. **Australian Journal of Zoology**, v. 53, n. 4, p. 249-256, 2005.

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

AMARAL, A. D. Contribuição para o conhecimento dos ophidios do Brasil. A. Parte II. Biologia da nova espécie, Lachesis insularis. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 1, p. 39-44, 1921.

AMARAL, A. Excursão a Ilha da Queimada Grande: notas sobre a biologia de uma Lachesis ali existente. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 2, p. 49-57. 1927.

AMARAL, A. Contribuição ao conhecimento dos ophidios do Brasil. IV. Lista remissiva dos ophidios do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 4, p. 69-125.1929.

ANDRABI, S.; MAXWELL, W. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 3, p. 223-243, 2007.

ATKINS, N.; JONES, S. M.; EDWARDS, A. Fecal testosterone concentrations may not be useful for monitoring reproductive status in male blue-tongued lizards (Tiliqua nigrolutea: Scincidae). **Journal of Herpetology**, v. 36, n. 1, p. 106-109, 2002.

BARBO, F. E.; GRAZZIOTIN, F. G.; SAZIMA, I.; MARTINS, M.; SAWAYA, R. J. A new and threatened insular species of lancehead from Southeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 68, n. 3, p. 418-429, 2012.

BAXTER-GILBERT, J. H.; RILEY, J. L.; MASTROMONACO, G. F.; LITZGUS, J. D.; LESBARRÈRES, D. A novel technique to measure chronic levels of corticosterone in turtles living around a major roadway. **Conservation Physiology**, v. 2, n. 1, p. cou036, 2014.

BERKELEY, E.; KIRKPATRICK, J.; SCHAFFER, N.; BRYANT, W.; THRELFALL, W. Serum and fecal steroid analysis of ovulation, pregnancy, and parturition in the black rhinoceros (Diceros bicornis). **Zoo Biology**, v. 16, n. 2, p. 121-132, 1997.

BERKVENS, C. N.; HYATT, C.; GILMAN, C.; PEARL, D. L.; BARKER, I. K.; MASTROMONACO, G. F. Validation of a shed skin corticosterone enzyme immunoassay in the African House Snake (Lamprophis fuliginosus) and its evaluation in the Eastern Massasauga Rattlesnake (Sistrurus catenatus catenatus). **General and Comparative Endocrinology**, v. 194, p. 1-9, 2013.

BONA-GALLO, A.; LICHT, P.; MACKENZIE, D. S.; LOFTS, B. Annual cycles in levels of pituitary and plasma gonadotropin, gonadal steroids, and thyroid activity in the Chinese cobra (Naja naja). **General and Comparative Endocrinology**, v. 42, n. 4, p. 477-493, 1980.

BONNET, X.; NAULLEAU, G. Are body reserves important for reproduction in male dark green snakes (Colubridae: Coluber viridiflavus)? **Herpetologica**, v. 52, n. 2, p. 137-146, 1996.

BOVO, R. P. **Ecologia termal da jararaca-ilhoa, Bothrops insularis (Serpentes, Viperidae): um estudo em condições naturais**. 2009. 128 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2009.

BOVO, R. P.; MARQUES, O. A.; ANDRADE, D. V. Does gestation or feeding affect the body temperature of the golden lancehead, Bothrops insularis (Squamata: Viperidae) under field conditions? **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, n. 6, p. 973-978, 2010.

BRASIL. Decreto n° 90.347 de 23 de outubro de 1984. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 24 out. 1984. Seção 1, p. 15539.

BRASIL. Decreto n° 91.887, de 5 de novembro de 1985. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 5 nov. 1985. Seção 1, p. 16187.

BROWN, J.; WALKER, S.; STEINMAN, K. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. Front Royal, Virginia: Endocrine Research Laboratory, Department of Reproductive Sciences, Conservation and Research Center, National Zoological Park, Smithsonian Institution, 2004. p. 1-93. ,

BUCHANAN, K. L.; GOLDSMITH, A. R. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: the importance of validation. **Animal Behaviour**, v. 67, n. 1, p. 183-185, 2004.

BULL, K. H.; MASON, R. T.; WHITTIER, J. Seasonal testicular development and sperm storage in tropical and subtropical populations of the brown tree snake (Boiga irregularis). **Australian Journal of Zoology**, v. 45, n. 5, p. 479-488, 1997.

CAPEZZUTO, A.; CHELINI, M.; FELIPPE, E.; OLIVEIRA, C. Correlation between serum and fecal concentrations of reproductive steroids throughout gestation in goats. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 1, p. 78-86, 2008.

CASARES, M. Untersuchungen zum Fortpflanzungsgeschehen bei Riesenschildkroeten (Geochelone elephantopus und G. gigantea) und Landschildkroeten (Testudo graeca und T. hermanni) anhand von Ultraschalldiagnostik und Steroidanalysen. **Der Zoologische Garten**. n. 65, p. 50-76. 1995.

DENARDO, D. F.; TAYLOR, E. N. Hormones and reproduction in free-ranging snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Queensland. CRC Press, 2011. v. 9, cap. 7, p. 265-287.

DOBELI, M.; RUHLI, M.; PFEIFFER, M.; RUBEL, A.; HONEGGER, R.; ISENBUGEL, E. Preliminary results on faecal steroid measurements in tortoises. In: THE FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FAECAL STEROID MONITORING IN ZOO ANIMALS, 1., 1992, Rotterdam. 1992. p. 73-83.

DUARTE, M.; PUORTO, G.; FRANCO, F. A biological survey of the pitviper Bothrops insularis Amaral (Serpentes, Viperidae): an endemic and threatened offshore island snake of southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, n. 1, p. 1-13, 1995.

GANSWINDT, S. B.; MYBURGH, J. G.; CAMERON, E. Z.; GANSWINDT, A. Non-invasive assessment of adrenocortical function in captive Nile crocodiles (Crocodylus niloticus). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A:** molecular & integrative physiology, v. 177, p. 11-17, 2014.

GORMAN, G. C.; LICHT, P.; MCCOLLUM, F. Annual reproductive patterns in three species of marine snakes from the central Phillippines. **Journal of Herpetology**, v., n., p. 335-354, 1981.

GOYMANN, W. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 35-53, 2005.

GRAHAM, L.; SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; GALAMA, W.; SAVAGE, A. A versatile enzyme immunoassay for the determination of progestogens in feces and serum. **Zoo Biology**, v. 20, n. 3, p. 227-236, 2001.

GRAHAM, S. P.; EARLEY, R. L.; HOSS, S. K.; SCHUETT, G. W.; GROBER, M. S. The reproductive biology of male cottonmouths (Agkistrodon piscivorus): Do plasma steroid hormones predict the mating season? **General and comparative endocrinology**, v. 159, n. 2, p. 226-235, 2008.

GRANTSAU, R. **As serpentes peçonhentas do Brasil.** São Carlos: Vento Verde, 2013. 320p.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of the Bothrops jararaca complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 13, p. 3969-3982, 2006.

GREGO, K. F. **Determinação dos níveis séricos de corticosterona e hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e da extração de veneno, em Bothrops jararaca (Ophidia: Viperidae)**. 2006. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GUIMARÃES, M.; MUNGUÍA-STEYER, R.; DOHERTY JR, P. F.; MARTINS, M.; SAWAYA, R. J. Population dynamics of the critically endangered golden lancehead pitviper, Bothrops insularis: stability or decline? **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95203, 2014.

HALLIDAY, W. D.; GILMOUR, K. M.; BLOUIN-DEMERS, G. Faecal corticosterone metabolite concentrations are not a good predictor of habitat suitability for common gartersnakes. **Conservation Physiology**, v. 3, n. 1, p. cov047, 2015.

HOLDING, M. L.; FRAZIER, J. A.; DORR, S. W.; POLLOCK, N. B.; MUELLEMAN, P.; BRANSKE, A.; HENNINGSEN, S. N.; EIKENAAR, C.; ESCALLÓN, C.; MONTGOMERY, C. E. Wet-and dry-season steroid hormone profiles and stress reactivity of an insular dwarf snake, the Hog Island boa (Boa constrictor imperator). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 87, n. 3, p. 363-373, 2014.

IUCN. International Union for Conservation of Nature. **Red List of Threatened Species**. Version 2013.1. 2013. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 08 jul. 2016.

KALLIOKOSKI, O.; TIMM, J. A.; IBSEN, I. B.; HAU, J.; FREDERIKSEN, A.-M. B.; BERTELSEN, M. F. Fecal glucocorticoid response to environmental stressors in green iguanas (Iguana iguana). **General and Comparative Endocrinology**, v. 177, n. 1, p. 93-97, 2012.

KASPEROVICZUS, K. N. **Biologia reprodutiva da jararaca ilhoa, Bothrops insularis (Serpentes: Viperidae) da Ilha da Queimada Grande, São Paulo**. 2009. 124 p. Dissertação (Mestrado) - Biotechnology and Biodiversity Program (USP/Butantan Institute/IPT), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

KASPEROVICZUS, K. N; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Instituto Butantan e a jararaca-ilhoa: cem anos de história, mitos e ciência. **Cadernos de História da Ciência**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2012.

KERSEY, D. C.; DEHNHARD, M. The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 203, p. 296-306, 2014.

KING, R. B.; BOWDEN, R. M. Seasonal, condition-dependent, and individual variation in testosterone in a natricine snake. **Journal of Herpetology**, v. 47, n. 1, p. 179-183, 2013.

KNOBIL, E.; ROBAIRE, B.; HERMO, L. **Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation The Physiology of Reproduction**. New York NY: Raven Press, 1988.

KORNDÖRFER, C. M. Hormônios sexuais nas fezes: opção para estudos reprodutivos e etiológicos de animais silvestres. **Anais da Etiologia**, v. 14, p.151-158, 1996.

KROHMER, R. W.; MARTINEZ, D.; MASON, R. T. Development of the renal sexual segment in immature snakes: effect of sex steroid hormones. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**: molecular & integrative physiology, v. 139, n. 1, p. 55-64, 2004.

KROHMER, R. W.; LUTTERSCHMIDT, D. I.; ALDRIDGE, R.; SEAVER, D. Environmental and neuroendocrine control of reproduction in snakes. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**, v. 9, p. 289-346, 2011.

KUMMROW, M. S.; SMITH, D. A.; CRAWSHAW, G.; MASTROMONACO, G. F. Characterization of fecal hormone patterns associated with the reproductive cycle in female veiled chameleons (Chamaeleo calyptratus). **General and Comparative Endocrinology**, v. 168, n. 3, p. 340-348, 2010.

KUMMROW, M. S.; GILMAN, C.; MACKIE, P.; SMITH, D. A.; MASTROMONACO, G. F. Noninvasive analysis of fecal reproductive hormone metabolites in female veiled chameleons (Chamaeleo calyptratus) by enzyme immunoassay. **Zoo Biology**, v. 30, n. 1, p. 95-115, 2011.

LICHT, P. Reproductive endocrinology of reptiles and amphibians: gonadotropins. **Annual Review Of Physiology**, v. 41, n. 1, p. 337-351, 1979.

LILLYWHITE, H. B.; DE DELVA, P.; NOONAN, B. P. Patterns of gut passage time and the chronic retention of fecal mass in viperid snakes. In: SCHUETT, G. W; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M.E; GREENE, H.W. **Biology of the Vipers**. Utah. Eagle Montain Publishing. 2002. p. 497-506.

LORENZ, O. T.; HORNE, B. D.; ANDERSON, N. J.; CHEEK, A. O. Reproductive physiology of the Broad-banded Watersnake, Nerodia fasciata confluens, in southeastern Louisiana. **Herpetological Conservation and Biology**, v. 6, n. 3, p. 410-421, 2011.

MACDONALD, S.; BATKAY, D.; KEELEY, T.; MCININCH, M.; NICOLSON, D.; STEINSKY, L.; GOODROWE, K. BEHAVIORAL PREDICTORS OF REPRODUCTIVE STATUS. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY (ART) FOR THE CONSERVATION AND GENETIC MANAGEMENT OF WILDLIFE, 2., 2002, Wild Kingdom Pavilion, Henry Doorly Zoo, Omaha, Nebraska, USA, 2002. p. 50.

MACHADO, A.; MARTINS, C.; DRUMMOND, G. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. 160 p.

MARQUES, O. A.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the Bothrops jararaca group (Serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, v. 58, n. 3, p. 303-312, 2002.

MARQUES, O. A.; MARTINS, M.; DEVELEY, P. F.; MACARRAO, A.; SAZIMA, I. The golden lancehead Bothrops insularis (Serpentes: Viperidae) relies on two seasonally plentiful bird species visiting its island habitat. **Journal of Natural History**, v. 46, n. 13-14, p. 885-895, 2012.

MARQUES, O. A. V.; KASPEROVICZUS, K. N.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Ecology of the Threatened Pitviper Bothrops insularis from Queimada Grande Island, Southeast Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 47, n. 3, p. 393-399, 2013.

MARTINS, M.; ARAUJO, M. S.; SAWAYA, R. J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (Bothrops). **Journal of Zoology**, v. 254, n. 4, p. 529-538, 2001.

MARTINS, M.; SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. A first estimate of the population size of the critically endangered lancehead, Bothrops insularis. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, n. 2, p. 168-174, 2008.

MATHIES, T.; MILLER, L. A. Cool temperatures elicit reproduction in a biologically invasive predator, the brown treesnake (Boiga irregularis). **Zoo Biology**, v. 22, n. 3, p. 227-238, 2003.

MATHIES, T.; CRUZ, J. A.; LANCE, V. A.; SAVIDGE, J. A. Reproductive biology of male brown treesnakes (Boiga irregularis) on Guam. **Journal of Herpetology**, v. 44, n. 2, p. 209-221, 2010.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R.D.; SEVER, D.M. **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**. Queensland. CRC Press, 2011. v. 9, cap. 12, p. 511-550.

MERCADANTE, O. A.; MOURA, L. F. H. A. **Serpentes ilhoas em Alcatrazes e Queimada Grande.** São Paulo. Magma Editora Cultural, 2005.

MONFORT, S. L. **Non-invasive endocrine measures of reproduction and stress in wild populations.** In: HOLT, W. V.; PICKARD, A. R.; RODGER, J. C.; WILDT, D. E. (Ed.). Reprocutiver science and integrated conservation. Camridge: Cambridge University Press, 2002. Pt. 3, p. 147-165. (Conservation Biology Series

MONTANHINI, A. M. **Avifauna da Ilha Queimada Grande, SP: Diversidade, estrutura trófica e sazonalidade**. 2010. 65f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de São Paulo. São José do Rio Preto. 2010.

NAULLEAU, G.; FLEURY, F.; BOISSIN, J. Annual cycles in plasma testosterone and thyroxine in the male aspic viper Vipera aspis L.,(Reptilia, Viperidae), in relation to the sexual cycle and hibernation. **General and comparative endocrinology**, v. 65, n. 2, p. 254-263, 1987.

NUNES KASPEROVICZUS, K.; MARIA DE ALMEIDA-SANTOS, S. Instituto Butantan e a jararaca-ilhoa: cem anos de história, mitos e ciência. **Cadernos de História da Ciência**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2012.

PALME, R. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 75-80, 2005.

PEREIRA, R. J. G. Métodos não-invasivos para análises hormonais aplicadas aos estudos de ecologia e etologia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 71-76, 2007.

POLEGATO, B. **Validação de método endócrino não-invasivo para o monitoramento da fisiologia reprodutiva e da atividade dos glicocorticóides em cervídeos neotropicais.** Trabalho de Graduação (Medicina Veterinária). 2004. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

RITTENHOUSE, C. D.; MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E.; HUBBARD, M. W. Effects of radiotransmitters on fecal glucocorticoid metabolite levels of three-toed box turtles in captivity. **Wildlife Society Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 706-713, 2005.

ROLDAN, E. R.; GOMENDIO, M.; GARDE, J.; ESPESO, G.; LEDDA, S.; BERLINGUER, F.; DEL OLMO, A.; SOLER, A. J.; ARREGUI, L.; CRESPO, C. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the organization of genetic resource banks. **Reproduction in domestic animals**, v. 41, n. s2, p. 82-92, 2006.

ROSS, R. A.; MARZEC, G. General Husbandry of Breeding Stock. In: ROSS, R. A.; MARZEC, G. **The reproductive husbandry of pythons and boas.** Stanford: Institute for Herpetological Research, 1990. cap. 1, p. 29-38.

SAINT GIRONS, H. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. **Herpetologica**, v. 38, n. 1, p. 5-16, 1982.

SCHUETT, G. W.; CARLISLE, S. L.; HOLYCROSS, A. T.; O'LEILE, J. K.; HARDY SR, D. L.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Mating system of male Mojave rattlesnakes (Crotalus scutulatus): seasonal timing of mating, agonistic behavior, spermatogenesis, sexual segment of the kidney, and plasma sex steroids. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H. W. **Biology of the Vipers.** Utah: Eagle Mountain Publishing, 2002**.** p. 515-532.

SCHUETT, G. W.; HARDY, D. L.; GREENE, H. W.; EARLEY, R. L.; GROBER, M. S.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Sympatric rattlesnakes with contrasting mating systems show differences in seasonal patterns of plasma sex steroids. **Animal Behaviour**, v. 70, n. 2, p. 257-266, 2005.

SCHUETT, G. W.; REPP, R. A.; TAYLOR, E. N.; DENARDO, D. F.; EARLEY, R. L.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Winter profile of plasma sex steroid levels in free-living male western diamond-backed rattlesnakes, Crotalus atrox (Serpentes: Viperidae). **General and comparative endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 72-80, 2006.

SCHWARZENBERGER, F.; MÖSTL, E.; PALME, R.; BAMBERG, E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. **Animal reproduction science**, v. 42, n. 1, p. 515-526, 1996.

SCHWARZENBERGER, F. The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. **International Zoo Yearbook**, v. 41, n. 1, p. 52-74, 2007.

SILVA, J. D. Dados climatológicos de Cananéia e Ubatuba (Estado de São Paulo). **Boletim Climatológico do Instituto Oceanográfico, São Paulo**, n. 6, p. 1-21, 1989.

SILVA, K.; ZOGNO, M.; CAMILLO, A.; PEREIRA, R.; ALMEIDA-SANTOS, S. Annual changes in seminal variables of golden lanchead pitvipers (Bothrops insularis) maintained in captivity. **Animal reproduction science**, v. 163, p. 144-150, 2015.

SWANSON, W. F. 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.; JENNINGS, D. H. Seasonal steroid hormone levels and their relation to reproduction in the western diamond-backed rattlesnake, Crotalus atrox (Serpentes: Viperidae). **General and comparative endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 328-337, 2004.

TAYLOR, E. N.; DENARDO, D. F. Hormones and reproductive cycles in snakes. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. **Hormones and reproduction of vertebrates**. London: Elsevier, 2010. v. 3, cap.13, p. 355-372.

VAZ GUIMARÃES, M. A. D. B. The importance of the application of non-invasive techniques in the study of wild animal reproduction. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 5, p. 29-37, 2003.

WASSER, S.; THOMAS, R.; NAIR, P.; GUIDRY, C.; SOUTHERS, J.; LUCAS, J.; WILDT, D.; MONFORT, S. Effects of dietary fibre on faecal steroid measurements in baboons (Papio cynocephalus cynocephalus). **Journal of reproduction and fertility**, v. 97, n. 2, p. 569-574, 1993.

WASSER, S. K.; VELLOSO, A. D. L.; RODDEN, M. D. Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. **The Journal of wildlife management**, v. 54, n. 4, p. 889-894, 1995.

WHITTEN, P.; BROCKMAN, D.; STAVISKY, R. Recent advances in noninvasive techniques to monitor hormone-behavior interactions. **American journal of physical anthropology**, v. 107, n. s 27, p. 1-23, 1998.

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

ZELANIS, A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; FURTADO, M. F. D. Ontogenetic changes in the venom of Bothrops insularis (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, n. 1, p. 43-50, 2008.