POLIANA GARCIA CORRÊA

**Monitoramento e estudos moleculares de ovos atrésicos de
serpentes do gênero *Bothrops*.**

São Paulo

2019

POLIANA GARCIA CORRÊA

Monitoramento e estudos moleculares de ovos atrésicos de serpentes do gênero *Bothrops*.

Tese 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 Título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr Durvanei Augusto Maria

Co-orientadora:

Prof. Dra Selma Maria de Almeida-Santos

São Paulo

2019

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. 3888
FMVZ

Corrêa, Poliana Garcia
Monitoramento e estudos moleculares de ovos atrésicos de serpentes do gênero
Bothrops / Poliana Garcia Corrêa. – 2019.
103 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

Coorientadora: Dra. Selma Maria Almeida-Santos.

1. Atresia. 2. Squamata. 3. *Bothrops*. 4. Citometria. 5. Apoptose. I. Título.

ERRATA

CORRÊA, P.G. **Monitoramento e estudos moleculares de ovos atrésicos de serpentes do gênero Bothrops**. 2019. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha Catalográfica		103 f	102 f
Resumo		104 f	102 f
Abstract		104 f	102 f

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Monitoramento e estudos moleculares de folículos atrésicos das serpentes criticamente ameaçadas de extinção *Bothrops insularis* e *Bothrops alcatraz*", protocolada sob o CEUA nº 9831120716, sob a responsabilidade de **Selma Maria de Almeida Santos e equipe; Poliana Garcia Corrêa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 17/08/2016.

We certify that the proposal "Molecular study and monitoring of atretic follicles in species of critically endangered snakes *Bothrops insularis* and *Bothrops alcatraz*", utilizing 20 Reptiles (20 females), protocol number CEUA 9831120716, under the responsibility of **Selma Maria de Almeida Santos and team; Poliana Garcia Corrêa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 08/17/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [02/2016](#) a [02/2019](#)

Área: [Lab. Especial de Ecologia E Evolução](#)

Origem: [Não se aplica](#)

Espécie: [Répteis](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [2 a 10 anos](#)

N: [20](#)

Linhagem: [Bothrops insularis](#)

Peso: [300 a 1000 g](#)

Resumo: As espécies em estudo, *Bothrops insularis* e *B. alcatraz*, criticamente ameaçadas de extinção apresentam alto índice de liberação natural de folículos ovarianos atrésicos ou ovos atrésicos pela cloaca. Estes folículos se caracterizam por uma massa amarelada, grande (~33mm), endurecida de vitelo que são expelidos naturalmente durante a parturição ou não. Com estes folículos serão feitos ensaios de imunofluorescência, histologia, análise de ciclo celular, análise morfológica, de expressão e atividade apoptótica uma vez que a atresia é um processo de morte celular por apoptose, assim, o método não será invasivo.

Local do experimento: Biotério Laboratório Especial de Ecologia e Evolução - Instituto Butantan protocolo SISBIO nº 25650-4

São Paulo, 15 de dezembro de 2017

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Monitoramento e estudos moleculares de folículos atrésicos de serpentes do grupo Bothrops.", protocolada sob o CEUA nº 6852010216 (ID 002595), sob a responsabilidade de **Selma Maria de Almeida Santos e equipe; Dr Durvanei Augusto Maria; POLIANA GARCIA CORRÊA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/08/2016.

We certify that the proposal "Molecular study and monitoring of atretic follicles of Bothrops group snakes.", utilizing 10 Reptiles (10 females), protocol number CEUA 6852010216 (ID 002595), under the responsibility of **Selma Maria de Almeida Santos and team; Dr Durvanei Augusto Maria; POLIANA GARCIA CORRÊA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/03/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2016** a **02/2019**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Répteis**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 10 anos**

N: **10**

Linhagem: **Bothrops insularis**

Peso: **300 a 1000 g**

Local do experimento: Biotério Laboratório Especial de Ecologia e Evolução - Instituto Butantan protocolo SISBIO nº 25650-4

São Paulo, 03 de maio de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CORRÊA, Poliana Garcia

Título: Monitoramento e estudos moleculares de ovos atrésicos de serpentes do gênero *Bothrops*.

Tese 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 Título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha base de tudo, meu lar, minha companhia, meu apoio, meu porto seguro. Aos meus pais por tamanha dedicação em nossa criação e educação que me ajudaram na luta em não desistir de chegar até aqui. Aos meus irmãos Rafael e Leonardo pela cía e carinho.

Á Deus, pela minha vida, a cada nova manhã, pela minha coragem, e minha fé diária. Gratidão.

Vou ter de agradecer à minha coorientadora primeiro, Dra Selma Maria de Almeida-Santos, que antes de tudo é uma grande amiga, e grande diretora, que me possibilitou fazer parte do seu grupo de pesquisa de Reprodução de Squamata desde 2015, assim como desenvolver este projeto durante a jornada de trabalho no Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan. Agradeço por todos os momentos bons, divertidos e até os momentos não tão bons, mas com certeza que somaram no meu aprendizado como ser humano e cientista. Por fim à gradeço por ter me apresentado ao meu orientador.

Agradeço à Deus por ter colocado no meu caminho um ser humano tão iluminado. Hiperativo, centrado, humilde, divertido, exigente mas nunca bravo. De um raciocínio ligeiro e uma genialidade incomparável. Uma pessoa muito humana, um ser de um coração imenso. Um orientador que sabe ensinar muito falando pouco. Mas o pouco é tão raro que vale a pena gravar todas informações passadas durante as curtas reuniões. Quem me ensinou que doutorando é quem faz pesquisa e se vira correndo atrás de parcerias, colaborações, revistas para publicações sem ninguém para pegar na mão. E apesar dele não saber quase nada de serpentes me mostrou o universo da biologia molecular que pôde somar muito em meu aprendizado. Professor Durvanei Augusto Maria, espero passar muito do que me foi passado de conhecimento, e que eu tenho muitos orientandos pela frente. Gratidão.

Depois destes só poderia agradecer aquele que mais me orientou, mais me apoiou, pegou no pé, cobrou, deu bronca, incentivou, papeou, apoiou nas publicações, nas participações de congressos, nos momentos de desânimo e fraqueza, em especial me incentivou a escrever de uma vez por todas a temida tese. E há 17 anos eu assistia à uma aula dele na faculdade em Mogi das Cruzes, e de tanto medo das cobras vim parar no Instituto Butantan, por teimosia e vontade de encarar as temidas serpentes. Meu grande amigo de todas as horas, o biólogo, pesquisador, diretor, conselheiro e professor, Giuseppe Puerto, minha gratidão.

À toda a equipe do LEEV, funcionários, alunos, terceirizados, que fazem o nosso dia a dia ser menos pesado, nos apoiam, colaboram, e também incentivam a não desistir do sonho de

fazer pesquisa. À Kelly, Adriano, Bruno, Cris, Cintia, Leonardo, Leo Sanches, Yago, dona Maria, Dona Vera, Darina, Regina, Marta, Fabiano, Lígia, Diego, Rebeca, Éliton, Serena, Eletra, Kalena, Regiane, Éster, Myriam, Gustavo, Reinaldo.

À toda a equipe do laboratório de Biologia Molecular do professor Durvanei, que sempre me acolheram, compartilharam do espaço no laboratório, me ajudaram nos experimentos e lembraram de mim nos dias de seminários, cursos, defesas, palestras e dias de festinha. À Rosely e ao Daniel em particular por me ajudarem nos momentos de desespero, de repetir várias vezes os experimentos e principalmente analisar os dados estatisticamente. A Myrela, Sérgio, Rosa, Laerty, Sueli, Reginaldo, Clarissa, Carla, Angelina, Thaís e Manu.

À todos os pesquisadores do LEEV.

Aos amigos Gisela, Alexandre, Regina, Francisca, Yago, Daniel e Paulo por todo carinho e amizade.

À amiga que mais me apoiou nos últimos anos a escrever por partes sem pensar no todo, que me deu coragem, afinal ela é pedagoga, à querida Gleicy Galvão, ou Kika.

A todos meus amigos que me ajudaram de certa forma, me animaram, me apoiaram, me fizeram encarar os desafios, em especial ao Fabiano Morezi de Andrade, pelos cafés, conversas, apoio psicológico, carinho, ombro amigo e broncas ao longo destes quatro anos.

Ao prof. Dr Rogério Bertani do LEEV e ao prof Carlos Jared Laboratório de Biologia Celular pelo uso de equipamentos de fotomicroscopia.

Ao Laboratório de Genética, profa Dra Adriana Neves e aos técnicos Dener e Eduardo pelo uso do micrótomo e banho-maria durante o preparo das lâminas histológicas.

À equipe do Museu Biológico pelas amostras de ovos, dados dos animais, troca de informações e amizade. Ao diretor Giuseppe Puerto, Marcelo, Adriana, Circe, Silvia e Kalena.

Ao Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e a profa Rose Eli e técnico Ronaldo por todo apoio na Microscopia Eletrônica de Varredura, Histologia e Historesina.

À Daura por todo apoio e carinho nos momentos de desespero e que mais precisamos.

Ao professor dr José Roberto Kfoury, profa dra Maria Angélica Miglino e ao prof dr Antônio Chaves de Assís Neto por terem me aceitado no Programa de Pós Graduação de Anatomia dos Animais e Silvestres da FMVZUSP.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. **(Marthin Luther King)**

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. **(Isaac Newton)**

Meus irmãos considerem como motivo de verdadeira alegria o fato de enfrentarem diversas provações, visto que vocês sabem que a qualidade provada da sua fé produz perseverança. Mas deixem que a perseverança complete a sua obra, para que vocês sejam completos e sãos em todos os sentidos, sem lhes faltar nada.

Portanto, se falta sabedoria a algum de vocês, que ele persista em pedi-la a Deus - pois ele dá a todos generosamente, sem censurar, e ela lhe será dada. Mas que ele persista em pedir com fé, sem duvidar de nada, pois quem duvida é semelhante a uma onda do mar, que o vento leva de um lado para o outro. **Tiago 1:1-4**

RESUMO

CORRÊA, P.G. **Monitoramento e estudos moleculares de ovos atrésicos de serpentes do gênero *Bothrops***. 2019. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os Squamatas são a única linhagem de répteis com espécies que dão à luz neonatos de vida livre (viviparidade), capazes de viver independente dos tecidos extraembrionários. Em muitas espécies de viperídeos a reprodução é sazonal, mas nem todas as fêmeas se reproduzem num dado ano. Também ocorrem variações intra e inter-específicas em relação ao acasalamento e atividade folicular, permitindo assim mudanças hormonais responsáveis por eventos fisiológicos. Rotineiramente é reportado o depósito, na natureza, de ovos inférteis e anormais tanto em espécies ovíparas quanto vivíparas de Squamatas. A atresia folicular é um processo degenerativo, hormonalmente controlado, pelo qual folículos ovarianos, em variados estágios de desenvolvimento e crescimento, de vertebrados mamíferos e não mamíferos, perdem sua integridade e são eliminados antes da ovulação. A apoptose, mecanismo fundamental de remoção de células germinativas, um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência. Com o objetivo monitorar e investigar o elevado número de ovos atrésicos liberados pelas serpentes do gênero *Bothrops* em cativeiro, investigamos possíveis processos de morte celular por apoptose com abordagens moleculares. Foram identificados os possíveis processos envolvidos na atresia de embriões de serpentes do gênero *Bothrops*. Os ovos atrésicos mostraram diferentes estádios de desenvolvimento, diferenciação e maturação dos precursores e de células-tronco envolvidos na organogênese destas espécies de serpente. A hipótese: “ovo atrésico é fecundado?”, neste estudo foi confirmada pela identificação de botões germinativos em diferentes fases de organogênese, que expressaram diferencialmente marcadores moleculares (CD-34, CD-44, CD-90, CD-117, Stro-1 e Caspase-3) envolvidos na cinética de crescimento e diferenciação celular, modulados pelo estresse oxidativo. Outros aspectos relevantes neste estudo envolvidos na atresia destes embriões foi o processo de partenogênese encontrado nas espécies *B. moojeni*, *B. leucurus* e *B. erythromelas*, nesta última foi inovador. *B. insularis* apresentou elevado número de ovos atrésicos não fecundados, a presença de intersexo entre fêmeas reprodutivas e as condições ambientais no cativeiro.

Palavras-chave: Atresia. Squamata. *Bothrops*. Citometria. Apoptose.

ABSTRACT

CORRÊA, P.G. "**Molecular study and monitoring of atretic eggs of *Bothrops* snakes**". 2019. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Squamatas are the only strain of reptiles with species that give birth to free-living neonates (viviparity), capable of living independently of extraembryonic tissues. In many Viperidae species reproduction is seasonal, but not all females reproduce in a given year. Intra and interspecific variations also occur in relation to mating and follicular activity, thus allowing hormonal changes responsible for physiological events. The routine deposit of infertile and abnormal eggs in both oviparous and viviparous Squamata species is routinely reported. Follicular atresia is a hormonally controlled degenerative process by which ovarian follicles, at various stages of development and growth, of mammalian and non-mammalian vertebrates, lose their integrity and are eliminated before ovulation. Apoptosis, a fundamental mechanism for germinal cell removal, a highly regulated and highly efficient cell death program. In order to monitor and investigate the high number of atretic eggs released by captive *Bothrops* snakes, we investigated possible apoptotic cell death processes with molecular approaches. Possible processes involved in the atresia of *Bothrops* snake embryos were identified. The atretic eggs showed different stages of development, differentiation and maturation of the precursors and stem cells involved in the organogenesis of these snake species. The hypothesis: "Is atretic egg fertilized?" In this study was confirmed by the identification of germinal discs in different stages of organogenesis, which differentially expressed molecular markers (CD-34, CD-44, CD-90, CD-117, Stro- 1 and Caspase-3) involved in growth kinetics and cell differentiation, modulated by oxidative stress. Other relevant aspects in this study involved in the atresia of these embryos was the parthenogenesis process found in *B. moojeni*, *B. leucurus* and *B. erythromelas* species, in the last one was innovative. *B. insularis* showed a high number of unfertilized atretic eggs, the presence of intersex between reproductive females and environmental conditions in captivity.

Keywords: Atresia. Squamata. *Bothrops*. Cytometry. Apoptosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 SERPENTES.....	14
1.2 GÊNERO <i>Bothrops</i> Wagler, 1824	15
1.3 ASPECTOS REPRODUTIVOS	15
1.4 ATRESIA FOLICULAR	16
1.5 MORTE CELULAR	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 <i>Bothrops jararaca</i> (WIED, 1824)	18
2.2 <i>Bothrops insularis</i> (AMARAL, 1921)	18
2.3 <i>Bothrops alcatraz</i> (MARQUES, MARTINS & SAZIMA, 2002).....	19
2.4 <i>Bothrops erythromelas</i> (AMARAL, 1923)	20
2.5 <i>Bothrops leucurus</i> (WAGLER IN SPIX, 1824).....	21
2.6 <i>Bothrops moojeni</i> (HOGE, 1966)	22
2.7 ASPECTOS REPRODUTIVOS	22
2.8 PARTENOGENÊSE	23
2.9 ESTRUTURAS DOS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DAS SERPENTES.....	24
2.10 VITELOGÊNESE.....	25
2.11 ATRESIA FOLICULAR	26
2.12 FOLÍCULOS INVIÁVEIS.....	28
2.13 MORTE CELULAR	29
2.14 STRESS OXIDATIVO	31
2.15 CICLO CELULAR.....	32
3 OBJETIVO GERAL	34
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3.2 JUSTIFICATIVA	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 MANUTENÇÃO DAS SERPENTES EM CATIVEIRO	36
4.2 COLETA E PRESERVAÇÃO DOS FOLÍCULOS OU OVOS ATRÉSICOS.....	39
4.3 PROCESSAMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ, BOUIN (1897)	39
4.4 PROCESSAMENTOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	39
4.5 PROCESSAMENTOS DE CÉLULAS DO BOTÕES GERMINATIVOS DOS OVOS ATRÉSICOS PARA CITOMETRIA DE FLUXO	40

4.6 ANÁLISES DAS FASES DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO	41
4.7 ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO	41
4.8 ENSAIO DE LIPOPEROXIDAÇÃO	42
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5 RESULTADOS	45
5.1 FOLÍCULOS LIBERADOS NO CATIVEIRO	45
5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	53
5.3 FOTOMICROGRAFIA DOS CORTES DOS EMBRIÕES	54
5.3 CICLO CELULAR.....	60
5.4 DNA FRAGMENTADO	66
5.5 ENSAIO DE LIPOPEROXIDAÇÃO	68
5.6 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	71
5.6.1 Marcador molecular CD-34	71
5.6.2 Marcador molecular CD-44	72
5.6.3 Marcador molecular Stro-1	73
5.6.4 Marcador molecular CD-117	74
5.6.5 Marcador molecular CD-90	75
5.6.4 Marcador molecular Caspase-3 fosforilada	76
6 DISCUSSÃO	82
6.1 OVOS ATRÉSICOS E CICLO REPRODUTIVO.....	82
6.2 PARTENOGENÊSE FACULTATIVA	83
6.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	85
6.4 CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA	85
6.5 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	86
6.6 DANO OXIDATIVO.....	87
6.7 MARCADORES MOLECULARES	88
7 CONCLUSÕES.....	90
8 REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 SERPENTES

A América Latina possui uma fauna rica e diversificada de serpentes, que tem sua distribuição nos diferentes países de acordo com fatores bióticos e abióticos específicos. Distribuem-se por uma grande variedade de habitats, desde ambientes áridos até florestas e ambientes alagadiços, exceto nas calotas polares (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

Pertencem à ordem Squamata, que inclui as serpentes, lagartos e anfisbenas e é a principal ordem da classe Reptilia com o maior número de répteis descritos. Das mais de 10.700 espécies de répteis no mundo, 3709 são espécies de serpentes (UETZ; HOŠEK, 2018; COSTA; BERNILS, 2018). No Brasil, atualmente foram descritas 795 espécies de répteis, sendo 753 Squamata, sendo 72 anfisbenas, 276 lagartos e 405 espécies de serpentes (UETZ, 2018; COSTA; BERNILS, 2018).

Dentre as serpentes brasileiras de importância médica destacam-se aquelas pertencentes às famílias Elapidae (corais verdadeiras) e Viperidae (Subfamília Crotalinae, das “pitivipers”), cujos representantes são todos peçonhentos, dotados de glândulas produtoras de veneno e dentição especializada para sua inoculação (CAMPBELL; LAMAR, 2004; MARQUES et al., 2001).

No Brasil, os viperídeos de importância para a saúde pública compreendem basicamente os gêneros: *Bothrops* (“jararacas”), *Crotalus* (“cascavéis”) e *Lachesis* (“surucucus”) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os viperídeos são caracterizados por apresentarem dentição do tipo solenóglifa (“soleno”= canal, “gliphé”= sulco) constituída de um par de dentes ou presas anteriores, bem desenvolvidos, com canal central e maxilar móvel; e presença de fosseta loreal (sistema termo-receptor bem desenvolvido que possibilita a percepção de animais de sangue quente) (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

Em relação ao número de acidentes ofídicos, no Brasil foram registrados 28601 acidentes por serpentes em 2017, sendo maior o número de casos nas regiões Norte (8830) e Nordeste (7234) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Segundo os dados do sistema de informação de agravo de notificação (SINAN) os acidentes botrópicos representam a maioria dos casos, 75% do total das notificações, enquanto que os

acidentes crotálicos representam 7%, laquéticos 3%, elapídicos 1% (gênero *Micrurus*, nome popular coral verdadeira), 4% não peçonhentas e 12% ignorados ou não identificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.2 GÊNERO *Bothrops* Wagler, 1824

O nome do gênero é derivado do grego *bothros*, significando fossa, e *ops*, significando olho ou face, em alusão à distinta fosseta loreal termo-sensível, localizada na face, entre o olho e a narina (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

Segundo a lista de espécies de répteis brasileiros (COSTA; BÉRNILS, 2018) os viperídeos Neotropicais da subfamília Crotalinae (“pitvipers”), gênero *Bothrops* (“lancehead”), compreendem 28 espécies e se distribuem amplamente pela América do Sul em uma grande variedade de habitats (MARTINS et al., 2001; CAMPBELL; LAMAR, 2004; COSTA; BÉRNILS, 2018).

1.3 ASPECTOS REPRODUTIVOS

Muitas manifestações ou eventos reprodutivos são usados para categorizar os ciclos reprodutivos de serpentes. Nas fêmeas, o padrão e sincronização de maturação folicular (como a vitelogênese primária e secundária) e a ovulação, estão entre os maiores importantes acontecimentos (ALDRIDGE, 1982). A vitelogênese secundária e sua duração variam com a espécie, o período do ano, a duração da estação ativa, a disponibilidade de presas e a quantidade de reserva de gordura (DILLER & WALLACE, 1984; NAULLEAU & BONNET, 1996).

Em muitas espécies de viperídeos a reprodução é sazonal, mas nem todas as fêmeas se reproduzem num dado ano. Também ocorrem variações intra e inter-específicas em relação ao acasalamento e atividade folicular, permitindo assim mudanças hormonais responsáveis por eventos fisiológicos. Em geral, as fêmeas têm 17- β -estradiol (E₂) plasmático elevado durante a vitelogênese e a progesterona (P₄) plasmática elevada durante a gestação, com efeito na manutenção da gravidez (TAYLOR; DE-NARDO, 2005).

Os Squamatas (lagartos e serpentes) são a única linhagem de répteis com espécies que dão à luz neonatos de vida livre (viviparidade), capazes de viver independente dos tecidos extraembrionários (STEWART, 2015).

Dados da literatura inferem que serpentes e lagartos teriam a capacidade de reabsorver ovos e embriões de seus ovidutos sob condições de stress fisiológico e infertilidade (SHINE, 1993; BLACKBURN, 1998) reciclando, assim, os nutrientes que as fêmeas investiram nos ovos. Porém, os ovos não desenvolvidos, poderiam simplesmente ser retidos nos ovidutos, com ou sem a expulsão.

Rotineiramente em Squamatas é reportado o depósito, na natureza, de ovos inférteis e anormais tanto em espécies ovíparas (FITCH, 1970; MURPHY et al., 1978) quanto vivíparas (BRANCH, 1973; RONNE 1996; GREGORY et al, 1992; MARQUES et al., 2002a; BLACKBURN et al., 1998; 2003; JANEIRO-CINQUINI, 2004; ALVES et al., 2014).

1.4 ATRESIA FOLICULAR

Inúmeros autores reportam que, o controle na produção da ninhada (o número e tamanho dos ovos) envolve dois mecanismos fisiológicos, a reabsorção ou a atresia folicular (LACK, 1947; 1954; JONES, 1978; DUELLMAN; TRUEB, 1986; GODFRAY et al., 1991). A reabsorção de embriões permite que as fêmeas possam manipular a razão sexual em mamíferos, e fatores como o estresse, provocado por más condições corporais ou doenças, podem induzir ao fim da gestação (BONNET et al., 2008).

A atresia folicular é um processo degenerativo, hormonalmente controlado, pelo qual folículos ovarianos, em variados estágios de desenvolvimento e crescimento, de vertebrados mamíferos e não mamíferos, perdem sua integridade e são eliminados antes da ovulação (GURAYA, 1973). Em mamíferos, a maioria dos folículos ovarianos sofrem atresia durante o desenvolvimento e são reabsorvidos pelo ovário antes de amadurecer (HUGHES; GOROSPE, 1991).

1.5 MORTE CELULAR

Vários estudos sugerem que a apoptose seja o mecanismo molecular fundamental para a remoção de células germinativas e somáticas no ovário de mamíferos e aves (TILLY et al., 1991; HUSSEIN, 2005).

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, caracterizada por uma série de eventos morfológicos típicos, como

encolhimento da célula, fragmentação em corpos apoptóticos ligados à membrana e fagocitose rápida pelas células vizinhas. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (SARASTE; POLKKI, 2000; GALLUZZI et al., 2018).

O presente trabalho visa investigar, com ferramentas bioquímicas e moleculares, processos envolvidos no elevado número de ovos atrésicos liberados em cativeiro por diferentes espécies de serpentes vivíparas, gênero *Bothrops*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90 % dos 20-30 mil acidentes ofídicos anuais no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A maioria das espécies do gênero são de dieta generalista embora cinco espécies sejam especialista e quatro insulares endêmicas: *Bothrops insularis*, *B. alcatraz* (MARQUES et al., 2002 a,b), *B. otavioi* (BARBO et al 2012) e *B. sazimai* (BARBO et al., 2016). Abordaremos a seguir apenas sobre a biologia das espécies utilizadas neste trabalho.

2.1 *Bothrops jararaca* (WIED, 1824)

Espécie mais comum da região Sudeste, habita desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, podendo ser encontrada em ilhas como Ilha dos Franceses, no Espírito Santo. Habita florestas tropicais decíduas e savanas preferindo regiões abertas, como áreas cultivadas e peri-urbanas. De hábito terrestre, crepuscular e noturno, porte médio, fêmeas com comprimento rostro cloacal (RC) de cerca de 108 cm. Seu padrão de escamas é bem caracterizado por desenhos dorsais em "V" invertido escuros bem destacados, margeado de cores mais claras. Há variação nas cores ao longo de sua distribuição geográfica, com indivíduos apresentando tons cinza, pardo-esverdeados, amarelados e marrons. A jararaca é ativa durante a maior parte do ano e as fêmeas tendem a serem maiores e mais pesadas do que os machos da espécie (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

As fêmeas são vivíparas, produzindo cerca de 12 a 18 filhotes por vez e os nascimentos ocorrem na estação das chuvas (SAZIMA, 1992; JANEIRO-CINQUINI, 2004; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; SILVA et al., 2013), resultado similar aos encontrados por BRENO et al. (1990), com uma média anual de ovos entre 9,4 a 16,3 para esta espécie.

2.2 *Bothrops insularis* (AMARAL, 1921)

Duas espécies endêmicas, do gênero *Bothrops*, habitam pequenas ilhas no Sudeste do Brasil – *B. insularis* (AMARAL, 1921) ou jararaca-ilhoa, da Ilha da Queimada Grande e *B. alcatraz* (MARQUES et al., 2002b), jararaca-de-Alcatrazes, do Arquipélago de Alcatrazes.

Estas espécies insulares são filogeneticamente relacionadas à jararaca do continente *B. jararaca*, compartilhando ancestral comum (MARQUES et al., 2002 a,b; FENWICK et al., 2009), sendo suas principais diferenças o tamanho do corpo reduzido e especializações na dieta (MARQUES et al., 2002 a, b; 2013). Comparando as duas espécies, as fêmeas de *B. insularis* tem menos tamanho corpóreo e menor massa, sendo uma vantagem para as serpentes arborícolas (LILLYWHITE; 1993; WUSTER et al., 2005).

A Ilha da Queimada Grande tem 430 mil m², está situada à 30 km da costa sul de São Paulo, entre Itanhaém e Peruíbe. Acredita-se que a ilha tenha se separado do continente há 11 mil anos. Quanto à fauna não existem mamíferos na ilha (DUARTE et al., 1995) e entre as poucas espécies de répteis, a *B. insularis* é uma de suas peculiaridades, com alta densidade na ilha, em cerca de 2100 exemplares, mas esta taxa vem decrescendo nos últimos 12 anos (MARTINS et al., 2008).

A espécie destoa do padrão da jararaca do continente apresentando coloração amarelada, hábito semi-arborícola sendo excelente predadora com atividades noturnas e diurnas, alimenta-se de lacraias, anfíbios e lagartos quando jovem, e quando adultas se alimentam de aves migratórias (ex.: *Platycida flavipes*, sabiá-una) (MARTINS et al., 2002).

A *B. insularis* apresenta uma rara variação sexual, sendo a população representada por machos, fêmeas e intersexos (fêmeas funcionais com hemipênis), refletindo profundas diferenças biométricas (HOGE et al., 1959).

Com relação à fecundidade, o número de folículos vitelogênicos nas fêmeas é baixo ($8,2 \pm 4,2$) em relação à *B. jararaca* do continente. Produz relativamente pequena ninhada de dois a 10 jovens, e exibe alta frequência de ovos atrésicos (HOGE et al., 1959; MARQUES et al., 2002a; MARQUES et al., 2013).

2.3 *Bothrops alcatraz* (MARQUES, MARTINS & SAZIMA, 2002)

B. alcatraz é uma jararaca anã (fêmeas com comprimento de 6,5–50 cm RC), de cor marrom escura, olhos proporcionalmente grandes, sendo este um caráter pedomórfico. Se diferencia da jararaca do continente pela coloração escura, menor tamanho dos adultos (nanismo), cauda mais curta, cabeça mais longa e diferenças nos padrões de escamas. É principalmente terrestre, mas pode ser encontrada sobre rochas e vegetação baixa sendo a maioria dos exemplares observados sob poleiros

de aves marinhas em mata baixa. Alimenta-se de lacraias e pequenos lagartos. É endêmica porém não é abundante. (Marques et al. 2002b).

O Arquipélago de Alcatrazes se localiza no litoral de São Paulo, há 35 km da costa do município de São Sebastião, SP. A ilha abriga o maior ninhal de aves marinhas do sudeste brasileiro, e não há relatos de mamíferos terrestres, apenas de morcegos (MARQUES et al., 2002b).

Marques et al. (2002b) relatou baixa fecundidade da espécie *B. alcatraz*, tendo encontrando um embrião e um a dois ovos vitelogênicos atrésicos numa fêmea.

As espécies *B. insularis* e *B. alcatraz* são espécies criticamente ameaçadas de extinção estando incluídas na “Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileiras Ameaçadas de Extinção” e na “Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN” (*International Union for Conservation of Nature*) (MARQUES et al., 2002b; IUCN, 2019), sendo essenciais estudos de sua biologia e reprodução para a conservação destas espécies.

2.4 *Bothrops erythromelas* (AMARAL, 1923)

Espécie terrestre e de hábito noturno é conhecida como jararaca-da-seca. De pequeno porte, em torno de 50 cm, cor castanho-avermelhada, habita ambientes áridos e úmidos da vegetação da caatinga nordestina, sendo responsável pela maioria dos acidentes no nordeste brasileiro (LIRA-DA-SILVA et al., 2009; BARROS et al., 2014a). De dieta generalista, se alimenta de sapos, lagartos, mamíferos e centopeias (MARTINS et al., 2002) e pertence ao grupo filogenético das *Bothrops neuwiedi* (WÜSTER et al., 2002).

Apresenta um padrão reprodutivo sazonal, como em outras espécies do gênero (BARROS et al., 2014a). A prenhez ocorre na estação mais quente do ano (verão), o melhor período para o desenvolvimento embrionário em vivíperos Squamatas (JI et al., 2007). Mas esse não é um fator limitante para *B. erythromelas* devido às altas temperaturas da caatinga ao longo do ano (BARROS et al., 2014a).

A baixa fecundidade da espécie é uma característica do grupo filogenético *B. neuwiedii* e que pode estar relacionado ao pequeno tamanho desta linhagem de serpente (VALDUJO et al., 2002; BARROS et al., 2014a).

Freitas et al. (1999) relatou que a espécie pode dar à luz de sete a 17 filhotes com cerca de 18 cm (RC), e Lira-da-Silva et al. (1994) relatou que a espécie pode dar

à luz a 11 jovens, na época do verão, de 19 cm (RC) em média. Mais recentemente, dados similares foram relatados em Barros et al. (2014a), onde observaram uma ninhada de 10 filhotes de comprimento (RC) de cerca de 15 cm ($15,78 \pm 0,4$).

2.5 *Bothrops leucurus* (WAGLER IN SPIX, 1824)

A espécie pertence ao grupo *atrox* (WÜSTER et al., 1997; 1999; 2002) e representa uma colonização de origem amazônica que teria ocorrido durante o Pleistoceno de acordo com Puerto et al. (2001). É conhecida ao longo da costa Atlântica do Brasil, do norte do Espírito Santo ao norte do Sergipe, Alagoas e Ceará até interior da Bahia (PORTO; TEIXEIRA, 1995; CAMPBELL; LAMAR, 2004; LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

Habita florestas primárias de Mata Atlântica e floresta decídua tropical. Possui hábito alimentar generalista, sua dieta inclui anfíbios, lagartos, serpentes, mamíferos e aves (MARTINS et al., 2002). Espécie de importância para a saúde pública no Brasil devido à alta incidência de envenenamento causado por picada (MISE et al., 2007; LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

De hábito noturno e terrestre podem alcançar 120 cm (RC) quando adultos. Dados sobre a biologia reprodutiva de *B. leucurus* disponíveis na literatura atualmente são sobre exemplares mantidos em cativeiro. Comportamentos de combate entre os machos e acasalamento foram observados durante o outono (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS et al., 2014b) e nascimentos ocorreram de dezembro (início do verão) a abril (início do outono) (LIRA-DA-SILVA et al., 1994; BARROS et al., 2014b).

Foram encontrados espermatozoides no aparelho reprodutor feminino de *B. leucurus* no outono, o que confirma que esta é a estação de acasalamento na natureza (BARROS et al., 2014b). A ovulação pode ocorrer durante o outono porque altas temperaturas são mantidas ao longo do ano e permite assim o desenvolvimento embrionário adequado em qualquer época do ano (VINEGAR, 1974; YAN et al., 2011). O ciclo das fêmeas pode ser considerado sazonal semi-sincrônico (MATHIES, 2011).

Melgarejo (2009) relata que a espécie é bastante prolífera, indicando registros de partos de até 42 filhotes, e nascimentos mais tardios, ocorrendo até o início de maio. Lira-da-Silva (1994) relatou que a espécie dá a luz de 5 a 20 filhotes, de tamanho

médio de 26,9 cm (rosto cloacal-RC) com exceção de um parto de 47 filhotes. Freitas (1999) relatou o nascimento de mais de 50 jovens de cerca de 23 cm (RC).

2.6 *Bothrops moojeni* (HOGE, 1966)

Conhecida como caíaca, a *B. moojeni* se distribui pelo Brasil central e sudoeste (estados do Distrito Federal, Piauí, Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás e Maranhão). Habita savanas semiáridas ou sazonalmente secas e terreno elevado de vegetação de cerrado (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

De grande porte, pode chegar a 160 cm (RC), seu dorso pode ser cinza escuro, castanho, com padrão de marcas pretas trapezoide e opostas (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

As fêmeas apresentaram vitelogênese primária ao longo do ano e um período prolongado de vitelogênese secundária, de fevereiro a novembro (do final do verão à primavera). A presença de embriões foi observada de agosto a março. Torção muscular uterina (UMT) foi observado com mais frequência no outono e inverno. Espermatozoides foram encontrados sendo armazenados na parte posterior do útero (submetido à UMT) das fêmeas, que apresentaram folículos vitelogênicos secundários durante o outono (ALMEIDA-SANTOS et al., 2017).

Batisitic et al. (1999) relatou partenogênese facultativa na espécie, ou seja, crescimento e desenvolvimento de um embrião sem que ocorra a fertilização; assim como os registros de Almeida-Santos e Salomão (2002). Freitas et al. (1999) reportou uma fêmea que deu à luz a mais de 30 filhotes.

2.7 ASPECTOS REPRODUTIVOS

Sobre os aspectos reprodutivos, membros do gênero *Bothrops* dão a luz a jovens vivos totalmente desenvolvidos, portanto se reproduzem por viviparidade. As fêmeas do grupo têm seus ciclos similarmente conservados (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002 a,b; NOGUEIRA et al, 2003; BARROS et al., 2014 a,b; ALMEIDA-SANTOS et al., 2017), embora a fecundidade possa variar de acordo com o tamanho do corpo do animal nas diferentes espécies do gênero (MARTINS et al., 2001), sendo

influenciada pela disponibilidade de recursos em diferentes regiões ou habitats (SHINE, 2004) (Tabela 1).

Espécie	Cópula	Vitelogênese secundária	Prenhez	Nascimento	Referência
<i>B. insularis</i>	março a agosto	março a novembro	outubro a abril	janeiro a abril	Amaral, 1921; Marques et al., 2013
<i>B. jararaca</i>	maio a julho	fevereiro a novembro	novembro a março	dezembro a fevereiro	Almeida-Santos; Orsi, 2002; Silva et al., 2013
<i>B. moojeni</i>	abril a maio	maio a julho	setembro a dezembro	outubro a janeiro	Nogueira et al., 2003; Almeida-Santos et al., 2017
<i>B. leucurus</i>	maio e junho	fevereiro a novembro	outubro a janeiro	dezembro a abril	Barros et al., 2014 b
<i>B. erythromelas</i>	abril e maio	junho a março	setembro a dezembro	dezembro a janeiro	Barros et al., 2014 a

Tabela 1. Ciclo reprodutivo de serpentes do grupo *Bothrops*

Legenda: Dados reprodutivos de serpentes brasileiras do gênero *Bothrops* de diferentes ecossistemas.

Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Serpentes maiores são mais prolíferas, podendo gerar mais de 50 filhotes por vez; entretanto, as de tamanho moderado a pequeno podem gerar 20 filhotes ou menos em uma ninhada (CAMPBELL; LAMAR, 2004; BARROS et al., 2014 a,b).

Forças seletivas podem agir em conjunto sobre o tamanho corpóreo de machos e fêmeas porque a fecundidade aumenta com o tamanho do corpo (SHINE, 1994) e machos maiores tendem a ser mais bem-sucedidos no combate entre machos para copular com a fêmea (SHINE, 1978; SHINE, 1980; MADSEN; SHINE, 1993). O comportamento de combate é mais comum em táxons onde há relações sexuais com dimorfismo de tamanho (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). No entanto, existe um dimorfismo claro do tamanho sexual de fêmeas em *B. moojeni* e *Bothrops* em geral (BARROS, 2016).

2.8 PARTENOGENÊSE

A palavra partenogênese vem do grego *παρθενος*, "virgem", e *γενεσις*, "nascimento", em alusão à deusa grega Atena, cujo templo era denominado Partenon, e refere-se ao crescimento e desenvolvimento de um embrião sem fertilização. São fêmeas que procriam sem precisar de machos que as fecundem (WATTS et al., 2006).

Em serpentes uma única espécie de escolecofídeos basal é conhecida por se reproduzir através de partenogênese obrigatória, a cobra cega *Indotyphlops braminus* (NUSSBAUM, 1980). A partenogênese facultativa (PF) é filogeneticamente generalizada em serpentes, tendo sido detectada na base da evolução em jiboias (Boidae) e pítons (Pythonidae), assim como em várias linhagens mais derivadas de serpentes (BOOTH et al., 2014).

O modo partenogenético é atribuído à fusão terminal automixis, um mecanismo onde o segundo corpúsculo polar, um produto meiótico que normalmente se degenera, essencialmente se comporta como um espermatozoide para ativar e fertilizar o óvulo e restabelecer a diploidia (LAMPERT, 2008). Sob esse modo de partenogênese, as descendências são essencialmente meios-clones da mãe devido à resultante homozigose do genoma (BOOTH, W. et al., 2014).

2.9 ESTRUTURAS DOS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DAS SERPENTES

Os órgãos reprodutivos em serpentes (assim como demais órgãos pareados) dispõem-se assimetricamente, sendo os do lado direito mais craniais e maiores em relação aos do lado esquerdo. Em fêmeas maduras de serpentes, os ovários apresentam folículos transparentes ou esbranquiçados, sem deposição de vitelo em fase quiescente (vitelogênese primária) (Figura 1b) e/ou amarelos com deposição de vitelo (vitelogênese secundária) (PIZZATTO et al., 2006) (Figura 1 A,B).

Nas fêmeas imaturas são encontrados apenas folículos em vitelogênese primária. Os ovidutos, paralelos aos ovários, são divididos em: infundíbulo, útero e vagina. O infundíbulo, localizado mais cranialmente, é uma estrutura fina em forma de funil com muitas dobras e recebe os folículos durante a ovulação (Figura 1D).

O útero é responsável pelo desenvolvimento embrionário e possui diversas câmaras onde permanece cada ovo/embrião. Estas câmaras são separadas por uma constrição, isolando cada ovo ou embrião e abaixo dela observa-se uma fina membrana corioalantóide (ALMEIDA-SANTOS & ORSI, 2002), que permite a

realização de troca gasosa, fornecimento de água e nutrientes para o embrião (BLACKBURN, 1998; MURPHY; THOMPSON, 2011).

Em alguns viperídeos (*Bothrops* e *Crotalus*) há uma região uterina anterior à vagina, longa e sem pregas, chamada útero posterior, que exhibe contração após a cópula e dilata-se durante a prenhez (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; 2002). Essa contração no útero posterior (conhecida como “UMT-uterine muscular twist”) permite a retenção e estocagem dos espermatozoides pelas fêmeas (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; BARROS et al., 2014; ALMEIDA SANTOS et al., 2017); (Fig. 1C), onde poderão permanecer viáveis durante o inverno e ascender provavelmente para o infundíbulo durante a fertilização.

Figura 1: Anatomia do sistema reprodutor de serpentes

(A). Fêmea de *Bothrops* sp., ovos em vitelogênese secundária (V2) (Fonte: Almeida-Santos et al., 2014). (B) Fêmeas de *Helicops* sp.: ovos em vitelogênese secundária (V2), vitelogênese primária (V1) e embriões no oviduto. Barra de escala = 1 cm. (Fotos: Camilla M. de Carvalho). (C) Torção muscular uterina (“uterine muscular twist” - UTM) de *Bothrops moojeni* onde apontam as setas. Barra = 3 cm (Fonte: Almeida-Santos, et al., 2017). (D) Útero de *B. jararaca* e sua camada delgada. Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

2.10 VITELOGÊNESE

Nos répteis, o crescimento e a maturação folicular envolvem tipicamente a deposição de grandes quantidades de vitelo. A massa de vitelo é derivada de uma molécula precursora Vtg (vitelogenina), uma lipofosfoglicoproteína de alto peso molecular (250-600kDa). Sintetizada no fígado sob influência de esteroides sexuais,

(principalmente o 17- β estradiol) carrega abundante quantidade de material lipídico, carboidratos, fosfatos e sais minerais (HO, 1991).

A vitelogênese é o processo de síntese hepática de Vtg e seu transporte para os oócitos. A Vtg sintetizada no fígado é liberada na corrente sanguínea e se liga aos receptores da membrana do oócito. O complexo é clivado proteoliticamente dando origem às proteínas vitelinas que são a principal reserva nutricional para o desenvolvimento embrionário (é acumulada como constituinte do vitelo). (HO, 1991).

A vitelogênese requer a mobilização de reserva de gordura maternal significativa e, por consequência, depende de um nível limiar de condição corpórea (BONNET; NAULLEAU; MAUGET, 1994). Esta exigência impede de ser anual o ciclo reprodutivo em fêmeas de algumas espécies vivíparas, como a *Vipera* spp. (BONNET, NAULLEAU; MAUGET, 1994) e o lagarto de língua azul *Tiliqua nigrolutea* (EDWARDS ET AL., 2002b).

A vitelogenina por si tem uma longa história evolutiva. É uma precursora de vitelo em uma gama de animais que botam ovos, como insetos, nematódeas e vertebrados (BRANDT ET AL., 2005). Promove o desenvolvimento do embrião com aminoácidos, lipídeos, fosfato, íons metálicos multivalentes, mas seu conteúdo lipídico (12-15%) não é suficiente para a completa necessidade de embriões amniotas. Em ovíparos, lipoproteínas de baixa densidade (VLDL), também sintetizadas no fígado materno, fornecem lipídeo vitelino adicional, enquanto uma variedade de outras proteínas também é incorporada ao vitelo, incluindo soro albumina, proteínas ligantes de vitaminas como colecalciferol, e imunoglobulinas (IgGs) (THOMPSON & SPEAKE, 2004; JANEIRO-CINQUINI et al., 1999).

2.11 ATRESIA FOLICULAR

A atresia folicular é um processo degenerativo, hormonalmente controlado, pelo qual folículos ovarianos de vertebrados recrutados para o desenvolvimento, não completam a maturação, perdem sua integridade e são eliminados antes da ovulação (MORAIS et al., 2012).

Em mamíferos, mais de 99% dos folículos ovarianos sofrem atresia durante o desenvolvimento e são reabsorvidos pelo ovário antes de amadurecer (HUGHES; GOROSPE, 1991; KAIPIA; HSUEH, 1997; JIANG et al, 2003).

Vários estudos sugerem que a apoptose seja o mecanismo molecular fundamental para a remoção de células germinativas e somáticas no ovário de mamíferos e aves (TILLY et al., 1991; HUSSEIN, 2005). Em peixes teleósteos a atresia ocorre em condições naturais, assim como no cativeiro, principalmente depois da desova. A autofagia pode ser um mecanismo de redução de massa celular antes da ativação da caspase e apoptose na atresia folicular de ovário de teleósteos. Neste grupo a atresia é maior quando os animais são expostos ao stress ambiental, resultando em queda da capacidade reprodutiva (JANZ et al., 2001; DREVNICK et al, 2006). “Zebrafishes” expostos a efluentes têxteis tiveram alterações nas gônadas como atresia dos oócitos (fêmea) e aumento da proporção de espermatogonia (machos), que pode levar a redução da fertilidade (TETA; NAIK, 2017).

Fatores intrínsecos e extrínsecos incluindo hipofisectomia, irradiação, substâncias anti-gonadotrópicas, stress térmico, confinamento e fome induzem a atresia em peixes e diminuem o potencial reprodutivo das espécies (MORAIS et al., 2012).

Em répteis, desde a década de 1970 têm sido apresentados estudos morfo-histológicos em folículos ovarianos em Squamatas. Trauth (1978) analisou e classificou os folículos atrésicos de lagarto de colar (*Crotaphytus collaris*), maduros e imaturos, em seis estágios de regressão: folículo imaturo em regressão inicial, tardia, completamente regredido e folículo acessório em regressão inicial, tardia e completamente regredido. Estudando a morfologia e histologia, pôde estimar o potencial reprodutivo do animal.

Guraya, desde a década de 1960, já estudava e comparava a atresia folicular de vertebrados mamíferos e não-mamíferos e relatou que os folículos vitelogênicos se tornam atrésicos devido à falta apropriada de estímulo gonadotrófico ou pelo balanço imperfeito de vários hormônios (GURAYA, 1965; 1966, 1969; 1973).

Em lagartos e serpentes ovos ou folículos atrésicos são considerados por muitos autores como um ovo vitelogênico que não foi fecundado, eliminado junto ou próximo ao parto em animais vivíparos (HOGE et al., 1959; ALVES et al., 1998; 2000; 2014; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; MARQUES et al, 2013).

Em aves a atresia é considerada um processo fisiológico normal. Em galinhas poentes é estimado que 90% de todos os folículos, primordiais e crescentes, irão eventualmente sucumbir à atresia. Em pássaros reprodutivos sazonalmente a atresia aumenta nas estações reprodutivas com picos durante o aninhamento, representando um mecanismo de ajuste do tamanho da ninhada e consequente reserva nutritiva para a fêmea (NORRIS; LOPEZ, 2010).

Estudos prévios indicam que a atresia folicular é iniciada ou causada por apoptose nas células da granulosa seguida por degeneração nas células da teca em ovários de mamíferos (MATSUDA-MINEHATA et al., 2006) e a morte por apoptose nas células da granulosa foi relatada em suínos, humanos, ratos, camundongos e galinhas (GUPTA et al., 1988; FENWICK; HURST, 2002; VASKIVUO; TAPANAINEN, 2003; MANABE et al., 2004; TAKAGI et al., 2007; RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010).

2.12 FOLÍCULOS INVIÁVEIS

Vários autores reportam que, o controle na produção da ninhada (número e tamanho dos ovos) envolve dois mecanismos fisiológicos, a reabsorção ou a atresia folicular (LACK, 1947; 1954; JONES, 1978; DUELLMAN; TRUEB, 1986; GODFRAY et al., 1991). A reabsorção de embriões permite que as fêmeas possam manipular a razão sexual em mamíferos, e fatores como o estresse, provocado por condições corporais pobres ou doenças, podem induzir ao fim da gestação (BONNET et al., 2008).

Blackburn et al. (2003) questionando sobre a reabsorção ou aborto de ovos anormais ou degenerados, encontrados no interior de útero e oviduto de fêmea de lagartos, propôs que fêmeas de *Pseudomoia pagenstecheri* retinham ovos maduros e embriões mortos por várias semanas, sem reabsorvê-los. Em análises histológicas evidenciaram a aparência de ovos em degeneração no início do estágio ontogenético, com manchas, aglomerado de células aparentemente mortas. Os embriões no útero também apresentaram degeneração e necrose, e as células embrionárias submersas no vitelo apresentaram massas de células com pequenos núcleos “piknoticos” e difusos “debris” celulares indicando morte celular.

Ovos inférteis ou mal formados podem ser expelidos pelo oviduto e liberados (expulsos) pela cloaca de Squamatas, sendo frequentemente reportados tanto em

espécies de ovíparos (FITCH, 1970; MURPHY et al., 1978) quanto vivíparos (BRANCH, 1973; RONNE 1996; GREGORY et al, 1992; MARQUES et al., 2002; BLACKBURN et al., 1998; 2003; JANEIRO-CINQUINI, 2004; ALVES et al., 2014).

No cativeiro, fêmeas de Squamatas podem ter maior incidência de ovos inférteis, tanto em espécies de ovíparos quanto vivíparos (MCEACHERN, 1991; RONNE, 1996). Uma questão que fica é porque ovos inférteis são depositados se a reabsorção pode ocorrer nas espécies em questão.

2.13 MORTE CELULAR

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Como consequência, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta seu volume e perde suas funções metabólicas (YU; CHOI, 2007). Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte programada como resposta a estímulos intra- e extracelulares (HENGARTNER, 2000).

A apoptose, uma forma regulada de morte celular, é um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento embrionário, homeostase de tecidos adultos e regulador do sistema imune (KYRYLKOVA et al., 2012).

No embrião em desenvolvimento, a apoptose disseminada ativamente esculpe a forma do corpo durante a organogênese (CLARKE, 1990). Em tecidos adultos também é comum, e sua ocorrência varia com a rotatividade dos tecidos. No sistema nervoso, coração, fígado e rim, onde é baixa a taxa de proliferação, reduzida apoptose é observada sob condições fisiológicas (BENNEDETTI et al., 1988). Em tecidos caracterizados por constante proliferação de células-tronco, como o sistema hematopoiético, epitélio intestinal e testículos, a taxa de apoptose é alta (BILLIG et al., 1995; WILLIE, 1987). No ovário, a alta taxa de apoptose da célula folicular ocorre durante a vida reprodutiva mas sem renovação da célula tronco, finalmente levando à senescência reprodutiva em mamíferos (HSUEH et al., 1994).

A morte celular se manifesta com alterações morfológicas macroscópicas. Segundo o comitê de nomenclatura de morte celular (GALLUZZI; VITALE, 2018) os

processos de morte celular regulada (RCD) podem ser classificados, de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em:

- autofagia: processo evolutivamente conservado e geneticamente controlado; ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares. Porções do citoplasma são encapsuladas originando autofagossomos que se fusionam aos lisossomos sendo degradados por hidrolases lisossomais (KELEKAR, 2005);

- necrose: quando as células sofrem uma lesão que resulta em aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. O conteúdo celular é liberado e ocorre danos às células vizinhas com reação inflamatória no local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; GALLUZZI; VITALE, 2018);

- mitose catastrófica: processo passivo, com regulação genética, envolve mitose aberrante, e segregação cromossômica errônea; não é morte mas sinalização irreversível para a morte (WEAVER; CLEVELAND, 2005);

- senescência: processo metabólico ativo essencial para o envelhecimento, ocorre por programação genética e envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores tumorais. As células perdem a capacidade proliferativa após determinado número de divisões celulares (MOOI; PEEPER; 2006);

- apoptose: fenômeno rápido, ocorre retração celular e perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas mantêm a morfologia, com exceção das mitocôndrias, que algumas vezes podem romper sua membrana externa. A cromatina sofre condensação (“pyknosis”), a membrana celular forma prolongamentos (“blebs”) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana. Os prolongamentos da membrana aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas com conteúdo celular, envoltas por membrana, denominados corpos apoptóticos, que serão fagocitados por macrófagos e removidos sem causar inflamação (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; GALLUZZI; VITALE, 2018) (figura 2). A marca registrada bioquímica da apoptose é a degradação do DNA por endonucleases, a qual produz fragmentos de fita dupla de DNA oligonucleossomal de cerca de 200 pares de base (KYRYLKOVA et al., 2012).

A apoptose é bem caracterizada via de morte celular programada que afeta as células desanexadas de células vizinhas e a membrana basal. Altamente conservada

durante a evolução, requer uma maquinaria especializada que envolve proteases conhecidas como caspases (DJAVAHERI-MERGNY et al., 2010) além de uma família de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bax e Bad) que regulam a apoptose por sinais de conexão.

Figura 2. Características celulares da necrose e apoptose

No esquema exemplificam como se desencadeiam a necrose (A) e a apoptose (B) num mesmo modelo celular.

Fonte: Kumar et al., 2013.

2.14 STRESS OXIDATIVO

Acredita-se que a apoptose induzida pelo estresse oxidativo seja uma das principais causas de atresia folicular (MURDOCH, 1998). Tem sido relatado que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) resultantes de mutações em diferentes complexos de cadeia de transporte de elétrons leva à falência ovariana prematura e à atresia folicular no ovário humano (KUMAR et al., 2010).

As EROs são grupos de oxigênio altamente reativos que danificam componentes celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios (ESSERS et al., 2004). Geralmente, as EROs são classificadas em três categorias: peróxido de hidrogênio não-ERO (H_2O_2), radicais livres de oxigênio (O_2^-) e radical hidroxila (OH) (STORZ, 2011). Esses radicais são gerados por fontes intracelulares, como metabolismo aeróbico normal, privação de nutrientes e isquemia, bem como estresse ambiental, como radiação ionizante ou radiação UV (STORZ, 2011; ESSERS et al., 2004).

2.15 CICLO CELULAR

Durante a evolução dos vertebrados diversos genes tem evoluído para desenvolver funções de carregadores de nutrientes sistêmicos. O desenvolvimento embrionário é complexo e influenciado por diversos fatores, sendo na sua totalidade dependente de um balanço adequado entre a proliferação (ciclo celular), diferenciação e morte celular (NURSE, 2000).

A proliferação celular é um mecanismo extremamente coordenado no qual a progressão pelas fases do ciclo é regulada de modo muito preciso, por uma rede bioquímica muito complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre G1, S, G2, M (SCHAFFER, 1998). O ciclo da divisão celular é coordenado e regulado por meio de eventos em que as células duplicam seu material genético (DNA) e posteriormente entram em divisão, formando células filhas. (NAKAJIMA, 2010). A ativação da divisão nuclear e o processo de separação das células filhas ocorrem na mitose (fase M).

O período entre uma mitose e outra é chamado de interfase. O processo de replicação do DNA nuclear ocorre na fase S (síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA, é chamada de fase G-1, e o intervalo entre o final da síntese e o início da mitose é a fase G-2. Essas fases propiciam um tempo adicional para o crescimento celular. (NAKAJIMA, 2010; SCHAFFER, 1998).

Esse processo é fundamental para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético. Proteínas como ciclinas e CDKs (quinases dependentes de ciclinas) são traduzidas nestes intervalos G-1 e G-2, podendo ser ativadas e controlando, positivamente, assim o ciclo celular (Figura 2).

Nestas fases ocorrem os pontos de checagem para a célula continuar a se dividir, entrar em senescência ou apoptose.

Figura 2. Fases do Ciclo celular.

Pontos de checagem com ativadores ou inibidores. Ciclinas, proteínas quinase dependentes de ciclinas (CDKs) e proteínas inibidoras de quinase (KIP).
Fonte: Adaptado de: MASCHIO, L. R. (2015).

3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo monitorar e investigar o elevado número de ovos atrésicos liberados pelas serpentes do gênero *Bothrops*, mantidas e monitoradas em cativeiro no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) e Museu Biológico, ambos do Instituto Butantan. Incluem-se as espécies insulares, cativas, criticamente ameaçadas de extinção: *B. insularis* e *B. alcatraz*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para realizar esta investigação e evidenciar possíveis processos de morte celular por apoptose com abordagens moleculares, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- Coleta e isolamento de células-tronco embrionárias dos discos germinativos de ovos atrésicos quando possíveis;
- Análise histológica dos folículos atrésicos (com microscopia: de luz e eletrônica de varredura);
- Análise das fases ou período do ciclo celular que as células se encontram (G_0/G_1 , S ou G_2) e monitoramento da fragmentação de DNA;
- Avaliação do stress oxidativo por ensaio de lipoperoxidação;
- Análise da expressão de marcadores moleculares do sistema hematopoiético; proliferação e de morte celular;
- Avaliação da atividade apoptótica;
- Avaliação da proporção de células mortas e viáveis.

3.2 JUSTIFICATIVA

As espécies em estudo têm apresentado alto índice de deposição de folículos atrésicos em cativeiro por longos anos de observação e em várias espécies de Squamatas, vivíparos e ovíparos, sem nenhum dado publicado até o momento sobre a investigação deste fenômeno sob o ponto de vista molecular.

Foram escolhidos animais de um grupo com parentesco (família Viperidae, subfamília Crotalinae, gênero *Bothrops*), cuja incidência de deposição de folículos

atrésicos no cativeiro tem sido mais frequente e abundante ao longo do ano em nosso laboratório (nos animais do grupo de pesquisa), em relação a outras espécies.

Duas espécies em estudo sofrem endemismo associado à condição de isolamento geográfico, e são criticamente ameaçadas de extinção - estão incluídas na “Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileiras Ameaçadas de Extinção” e na “Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da IUCN 2019” (International Union for Conservation of Nature). Há fortes indícios de que as populações estão diminuindo nas ilhas (Martins et al., 2008) sendo assim os estudos de sua biologia e reprodução essenciais para a conservação destas espécies em cativeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO DAS SERPENTES EM CATIVEIRO

Acompanhamos o comportamento com ênfase no ciclo reprodutivo e liberação de ovos atrésicos de 12 fêmeas vivíparas, adultas, cativas, de serpentes da espécie *Bothrops insularis*, e quatro animais da espécie *B. alcatraz*, mantidas no biotério de Conservação da Jararaca-ilhoa, localizado no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan (IB), sob a responsabilidade da pesquisadora Dra Selma Maria de Almeida Santos, sob licença do IBAMA 25650-1.

Também monitoramos animais que fazem parte do plantel do LEEV em biotério anexo: uma fêmea cativa da espécie *B. moojeni* e três animais da espécie *B. jararaca*.

Foram recebidas amostras de ovos atrésicos de uma fêmea da espécie *B. leucurus* e uma *B. erythromelas*, as quais eram mantidas em cativeiro em exposição ao público no Museu Biológico do Instituto Butantan e passaram a ser monitoradas.

Os animais do Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV), eram mantidas individualizadas em caixas plásticas transparentes (56,4 x 38,5 x 37,1cm) com tampa e laterais perfuradas (Figura 4), e forradas com papelão corrugado. Na sala onde são acondicionadas as caixas contendo esses animais foram mantidas as condições naturais de foto-período (latitude 23°S), temperatura e umidade, as quais são frequentemente monitoradas e anotadas. Nos dias mais frios um aquecedor a óleo com controle manual era utilizado para aquecer a sala. A dieta dos animais foi composta de camundongos (*Mus musculus*) provenientes do Biotério do IB que são oferecidos em intervalos regulares de 30 dias, respeitando-se a proporção de 10 a 20% do peso do indivíduo. Foi fornecida água fresca *ad libitum*.

Figura 4. Abrigo (caixas) dos animais em cativeiro

Caixa transparente, perfurada, com papelão corrugado e pote com água para o animal.
Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Dados biométricos (peso e comprimento) foram obtidos duas vezes ao ano. Dados referentes ao comportamento e sanidade foram diariamente repassados aos arquivos dos projetos de pesquisa.

No Museu Biológico, todas as serpentes foram mantidas individualizadas em recintos com área de 1m², com tela superior, e substrato de terra vegetal com cobertura de cascas de árvores (*Pinus* sp). (Figura 5). No recinto onde os animais ficam em exposição ao público foram mantidas as condições naturais de foto-período de 10-14h, controle manual de umidade, para adequação às condições próximas do ideal para a espécie, as quais são frequentemente monitoradas e anotadas. Em todos os recintos havia um bloco aquecedor (rocha aquecida) com temperaturas variando entre 28 e 35 °C, galhos para deslocamento e substrato. Os aquecedores permanecem num ponto focal do recinto, permitindo ao animal escolher locais com condições ideais para termorregulação, possibilitando assim, gradientes de temperatura. A dieta das serpentes foi composta de camundongos “swiss” (*Mus musculus*) e ratos “wistar” (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério do IB que são oferecidos em intervalos regulares de 30 dias, respeitando-se a proporção de 10 a 20% do peso do indivíduo. Foi fornecida água fresca “ad libitum”. Dados biométricos

(peso e comprimento) foram obtidos periodicamente. Medições corpóreas de comprimento rostro-cloacal (CRC), comprimento da cabeça (CA), comprimento da cauda (CC) e massa corporal foram realizadas duas vezes ao ano. Dados referentes ao comportamento e sanidade diariamente verificados.

Durante um período de três anos de monitoramento destes animais observou-se elevado número de ovos atrésicos liberados naturalmente, na ovipostura (ou parturição) natural em diferentes períodos do ano. Em outras espécies de serpentes e lagartos escamados cativos foi observado o mesmo fenômeno.

Figura 5. Animal em exposição no recinto enriquecido do Museu Biológico

Recinto com tela superior, e substrato de terra vegetal com cobertura de cascas de árvores (*Pinus* sp). Foto: Puerto, G.
Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

4.2 COLETA E PRESERVAÇÃO DOS FOLÍCULOS OU OVOS ATRÉSICOS

Uma vez que o folículo ou ovo atrésico é expelido/oviposto por alguma das fêmeas, o mesmo era colhido em condições estéreis, com luvas, evitando o contato das mãos com o mesmo. Eram medidos e pesados e logo processados para os ensaios experimentais ou estocados rapidamente em freezer (-20 °C ou -80 °C) em sacos plásticos com “zip” (10x7cm), de modo a preservar o conteúdo celular e umidade dos folículos.

4.3 PROCESSAMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ, BOUIN (1897)

Foram coletados, após morfometria, fragmentos dos folículos atrésicos de aproximadamente 1 cm, que eram identificados, fixados por 48 h em solução 10 % de formol, lavados em água e conservados em álcool 70%. Também utilizamos fixador Bouin (1897) por no máximo 8h de fixação, com outras amostras. Para a análise histológica os fragmentos passaram por desidratação em série em concentração crescente de etanol 70% a 100%, sendo diafanizadas em xilol e incluídos em parafina, obtendo-se blocos da amostra dentro da parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo (Leica®) em fitas de cerca de 5 µm de espessura e estas coladas em lâminas de vidro com albumina e glicerina (1:1), sendo coradas com Hematoxilina-Eosina (JUNQUEIRA et al., 1979), e analisadas em fotomicroscópio eletrônico Olympus BX51.

4.4 PROCESSAMENTOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia dos folículos atrésicos de serpentes foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura. As amostras foram fixadas por 96 h em solução 2,5 % de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1% pH 7,4 (KARNOVSKY, 1965, modificado por GUERREIRO, S.M.C apud KRAUS & ARDUIM, 1997). Após fixação, as células foram lavadas e fixadas em 1% tetróxido de ósmio, e desidratadas em concentrações progressivas de 10 a 100% de etanol por duas vezes de 5 minutos. As células foram secas por 2h30 com auxílio de um secador de ponto crítico (Balzers CPD 020),

utilizando dióxido de carbono líquido; e fixadas em porta espécie, com fita condutiva de cola de carbono e metalizadas com uma camada de prata de 35 nm em íon “sputter coater” (Emitech K 550) durante 2 minutos.

As amostras foram avaliadas no microscópio eletrônico de varredura me Leo 435 VP, operado em diversos aumentos (30-30000 vezes) sobre vácuo. A técnica foi realizada no Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem (CADI), NO Departamento de Cirurgia, setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.5 PROCESSAMENTOS DE CÉLULAS DO BOTÕES GERMINATIVOS DOS OVOS ATRÉSICOS PARA CITOMETRIA DE FLUXO

Os ovos atrésicos descongelados sobre banho de gelo (placa de Petri com gelo seco) tiveram o botão germinativo, embrião ou saco vitelino recortados quando presentes (Figura 6). Estes tecidos foram macerados na placa de Petri usando o fundo reto do êmbolo de uma seringa de 20 mL, e recuperados em 0,5 ml de solução tampão FACS Flow (PBS + 0,1 % BSA + 0,05% ázida sódica, Beckton Dickson®). As células foram ressuspensas com pipeta Pasteur descartável (de 5 mL) e filtradas em filtro de aço de 0,22 μ m de porosidade. As células foram lavadas, centrifugadas por 10 min a 1500 g, descartado o sobrenadante e ressuspensão o pelete, com cuidado, em 1 mL de tampão FACS (BD®). Este volume de células foi subdividido em dois microtubos de 1,5mL com 0,5mL cada.

Figura 6. Coleta de disco germinativo de ovo atrésico de serpente

(A) Em destaque botão germinativo recortado e utilizado para extrair células para citometria. O Vitelo foi utilizado para análise de lipoperoxidação. (B) Disco germinativo macerado, para extração de células, com fundo de êmbolo de seringa em placa de Petri.
Fonte: Correa, P.G., 2019.

4.6 ANÁLISES DAS FASES DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para esta análise, iniciamos com a fixação das células, portanto, adicionamos 0,5 mL de etanol 70% + RNase (0,3mg/mL, Invitrogen) em 0,5 mL de suspensão celular (do passo anterior), e armazenamos no freezer (-20 °C) por 2h. Depois centrifugamos 10 min, 2000 g, lavamos o pelete duas vezes com tampão FACS e ressuspendemos as células em 0,5 mL de tampão FACS Flow (Beckton Dickson®).

Como permeabilizante de membrana nuclear, para coloração intracelular, incubamos a suspensão com 10 µL de 0,1 % Triton X100 (Sigma-Aldrich) por 30 min. Em seguida adicionamos 200 µL de agente intercalante molecular, iodeto de propídeo (PI) (50µg/µL) (Sigma Aldrich, P4170), e incubamos 30 min, protegido da luz. Seguimos com centrifugação, 10 min 2000 g, e ressuspendemos o pelete em 300 µL de tampão FACS Flow (BD). As amostras em duplicata foram colocadas em tubo de citômetro e ficaram protegidas da luz até a leitura. No dia seguinte foi feita a análise de expressão em 10000 eventos em citômetro FACSCalibur (Beckton Dickson®), de acordo com sua intensidade de fluorescência (FECHER, 2009). Foram feitas aquisições quanto à morfologia *versus* tamanho da população celular, e dois histogramas, de detectores FL2H e FL2-A.

O perfil de fase do ciclo celular pré e pós mitóticas (haplides, G0-G1, fase-S e G2-M) e fragmentação de DNA foram analisado pelo software MODFIT LT v3.0 (Verity Software House, Topsham, ME, USA), e os dados analisados em software GraphPrism™® v5, e apresentados em porcentagem.

4.7 ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

A suspensão celular Injetada no citômetro de fluxo atravessa a câmara onde se dá a passagem célula a célula através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é obtida através da focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra, sendo injetada no seio de uma solução salina que também atravessa a câmara (SHAPIRO, 2001; 2003).

A diferença de velocidades entre os dois fluídos faz com que o fluxo se processe em regime laminar. Desta forma, podem detectar-se até 10000 células (eventos) por segundo. O feixe de radiação de excitação ao interceptar a partícula (célula) na

câmara, sofre dispersão quer na direção frontal (“forward scattering”), quer lateral (“side scattering”). A radiação assim dispersa é detectada diretamente por fotodiodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e focada em fotomultiplicadores.

A combinação destes tipos de radiação dispersa revela informações importantes tais como a dimensão celular, a granularidade/complexidade e a morfologia. Compostos intracelulares com fluorescência se ligam a corantes fluorescentes (fluorocromos), permitem a diferenciação seletiva de subpopulações com base na combinação de vários fluorocromos (SHAPIRO, 2003).

Para a análise da expressão dos marcadores moleculares foram utilizados anticorpos específicos para a determinação da origem das células-tronco, potencial proliferativo e morte celular:

- ✓ Anti-Caspase-3 fosforilada (1:100, mouse monoclonal SantaCruz), adiciona 0,1 % Triton X 100 como permeabilizante da membrana nuclear, fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC);
- ✓ Anti-CD117 (1:100, mouse monoclonal stemcell, SantaCruz), fluorocromo ficoeritrina (PE);
- ✓ Anti-CD90/Thy (1:100, mouse monoclonal Ab [MRC OX-7] SantaCruz), PE;
- ✓ Anti-CD34 (1:100, mouse monoclonal SantaCruz), FITC;
- ✓ Anti-CD44 (1:100, mouse monoclonal SantaCruz), FITC;
- ✓ Anti-Stro1 (1:100, mouse monoclonal SantaCruz), PE.

As células foram fixadas em paraformaldeído 4%, mantidas à -4° C, lavadas em tampão FACS e a leitura se deu em citômetro de fluxo (FACsCalibur BD®). Análises foram realizadas no software WINMDI© (TROTTER, 2000) e como Parâmetros utilizamos FSC (tamanho) no eixo y *versus* SSC (granulosidade/complexidade) no eixo x.

4.8 ENSAIO DE LIPOPEROXIDAÇÃO

O estresse oxidativo sobre os lipídios não saturados nas membranas celulares foi avaliado determinando a quantidade de malondialdeído (MDA), que é o produto final da peroxidação de ácidos graxos, que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo colorido (rosa). O teor de malondialdeído (MDA) foi quantificado utilizando o ensaio da substância reactiva TBA (TBARS) (OHKAWA et al., 1979).

Em resumo, de 10 a 20 folículos atresicos liberados no cativeiro pelas fêmeas do grupo *Bothrops*, foram pesados, medidos e congelados (-80 °C) para preservar a região do disco germinal (GDR) quando presente, para análise posterior no citômetro de fluxo. As amostras (150 mg/homogeneizado) foram maceradas, lavadas com PBS^{Na+} ou solução fisiológica (NaCl 0,9%). O sobrenadante foi colhido e misturado com solução de 20 % de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich) e solução aquosa de 0,86% de TBA (em solução 20% TCA) (Sigma-Aldrich). A mistura foi agitada e aquecida em um banho de água fervente durante 30 min seguido de resfriamento a 0°C por 30 min, centrifugação a 8000 g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação das TBARS. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (ThermoPlate) no comprimento de onda de 535 nm.

A diferença entre os resultados das duas determinações de densidade óptica foi tomada como valor de TBA e as quantidades de malondialdeído (MDA) produzidas foram calculadas e comparadas com os padrões de MDA e expressas em nmoles MDA/mL de amostra.

Figura 7. Experimento TBARS simplificado.

Extração de massa de vitelo, maceração em tubo de fundo cônico. Soluções adicionadas reagem na lipoperoxidação e o MDA é visível na cor rosa.
Fonte: Correa, P.G., 2019.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores numéricos serão expressos em média $\pm$ desvio padrão. A análise de variância (ANOVA one-way) não paramétrico seguido de teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer para identificar as diferenças estatísticas entre dados dos grupos estudados (Ex. produção de MDA x peso dos folículos; ou na fase de ciclo celular como G1, para duas diferentes populações celulares). Os gráficos foram obtidos através do GraphPrism versão 5.0 e versão 3.2 ModFit softwares. O grau de significância estatística (valor- p) se deu por: * $p < 0.05$ (pouca significância), ** $p < 0.01$ (média significância) e *** $p < 0.001$ (alta significância).

5 RESULTADOS

Os resultados apresentados foram distribuídos da seguinte maneira: uma planilha é apresentada informando os eventos de atresia pelo qual as serpentes estudadas passaram, dados dos ovos e das fêmeas prenhes, e cálculo da massa relativa (MRN) quando obtidos. Em seguida são apresentados os animais e dados de morfologia macroscópica de alguns ovos atrésicos evidenciando diferenças entre ovos fertilizados e não fertilizados. Também algumas imagens possíveis de microscopia de luz e por varredura. Em seguida os dados de citometria, com gráficos e estatísticas para formação de lipoperóxido malonaldeído (MDA) relacionada ao stress oxidativo; as fases do ciclo celular e DNA fragmentado; e por último a expressão dos marcadores de células tronco embrionárias. Finalizando com as discussões, considerações e conclusões.

5.1 FOLÍCULOS LIBERADOS NO CATIVEIRO

Na tabela 2 são apresentados dados das fêmeas progenitoras utilizadas nos experimentos, a massa antes e após o parto e a massa da ninhada (filhotes + ovos atrésicos). Com estes dados foi possível calcular a massa relativa da ninhada (MRN) pela razão da massa da ninhada sobre a massa da progenitora pós parto, segundo Shine et al. (1980).

Na tabela 3 são apresentados dados de cópula: se as fêmeas progenitoras chegaram prenhes da natureza ou se tiveram cópula no cativeiro (estocagem de sêmen). Em três espécies houve parto virgem, ou seja, as fêmeas nasceram no cativeiro, foram monitoradas e nunca tiveram contato com machos, mas vieram a produzir filhotes (um a dois) e vários ovos atrésicos, alguns com botão germinativo. Neste caso trata-se de partenogênese facultativa, num esforço de perpetuar a espécie as fêmeas de *B. moojeni*, *B. erythromelas* e *B. leucurus* entram em vitelogênese secundária e chegam a produzir embriões pela fusão de automixis, ou seja, o segundo corpúsculo polar, que normalmente se degenera, se comporta como um espermatozoide para ativar e fertilizar o óvulo e restabelecer a diploidia. Neste caso nascem tanto machos quanto fêmeas, homozigotos, uma vez que a fêmea em serpentes é a heterogamética (cromossomo sexual ZZ/ZW).

Espécies	Procedência	Ano	Peso (g)		Tamanho	Ninhada	
			Prenhe	Pós parto	CRC (cm)	Peso (g)	MRN*
<i>B. insularis_1</i>	Ilha Q. Gde SP	2010	220	200	69,7	17	0,08
		2014	502	420	94	42	0,1
		2016	518	482	99	55,4	0,11
<i>B. insularis_2</i>	Ilha Q. Gde SP	2010	410	225	81,3	100	0,44
		2013	494	-	90	-	-
		2014	586	492	97	55,4	0,12
<i>B. jararaca</i>	St. Parnaíba, SP	2016	694	411	117	200	0,48
<i>B. moojeni</i>	Dianópolis, TO	2015	960	940	100	-	-
		2016	1290	895	-	107	0,12
<i>B. leucurus</i>	Salvador, BA	2015	1112	-	127	-	-
		2016	958	-	-	92	0,096
<i>B. erythromelas</i>	Juazeiro, BA	2013	380	-	86	-	-
		2014	425	-	-	-	-
		2015	411	385	-	22	0,06
		2016	393	-	-	39	0,11
		2017	421	339	-	81,6	0,24
		2017	340	-	-	-	-
		2017	543	-	-	294	0,5
<i>B. alcatraz</i>	I. Alcatrazes, SP	2014	60	-	47,5	2,96	

Tabela 2. Cálculo de massa relativa da ninhada (MRN)

Os dados da fêmea progenitora (ano do parto, massa antes e pós parto) e dados da ninhada (massa dos filhotes e ovos atrésicos), quando possíveis, permitiram calcular a massa relativa da ninhada segundo Shine (1980). *Ano que a fêmea nasceu no cativeiro.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Algumas serpentes do grupo de estudo vieram prenhes da natureza, enquanto outras nasceram no recinto (cativeiro) e nunca foram colocadas para copular. Observa-se que apesar do ciclo reprodutivo das *Bothrops* ser bienal as serpentes quando cativas entram em vitelogênese e liberam ovos atrésicos anualmente na época coincidente com a parturição. A porcentagem de folículos com botão germinativo entre ovos atrésicos é em torno de 19 %, e foi maior em *B. jararaca* (45%).

Os animais que não copularam apresentaram menor tamanho dos folículos (± 15 mm), mais duros e mais amarelados. Aqueles que tiveram filhotes junto com os folículos atrésicos tinham aspecto mais mole e mais esbranquiçado, de maior tamanho (± 33 mm).

Espécies	Ano	Teve Cópula	Ovos atrésicos		Filhote
			Com botão	Sem botão	
<i>B. insularis_1</i>	2010	já prenhe			2
	2014	não		4	5
	2016	não	1	7	
<i>B. insularis_2</i>	2010	já prenhe		1	10
	2013	sim			
	2014	não	2	6	
<i>B. jararaca</i>	2016	não	5	5	11
<i>B. moojeni</i>	2006	não			
	2015	não		24	0
	2016	não	5	34	1
<i>B. leucurus</i>	2015	não	-	-	-
	2016	não	2	24	
<i>B. erythromelas</i>	2013	não		3	1
	2014	não		23	1
	2015	não		16	
	2016	não		24	
	2017	não	4	22	
	2017	sim		13	17
<i>B. alcatraz</i>	2014	não		1	

Tabela 3. Dados dos ovos atrésicos por espécie

Informações como presença de botão germinativo nos ovos atrésicos contribuem para purificação de células a serem analisadas por citometria. Dados das fêmeas progenitoras que nunca tiveram cópula permitiram inferir partenogênese facultativa.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Curiosamente a espécie *B. erythromelas* apresentou alto índice de ovos atrésicos e anualmente. Porém, ao copular no verão/outono em 2017 ficou prenhe e no final da primavera veio a parir filhotes (17) e ovos atrésicos (11), aumentando sua massa relativa da ninhada.

Do total de ovos atrésicos liberados de 2015 a 2018, utilizamos como amostras experimentais:

- ✓ *B. erythromelas* 12 ovos sendo quatro com botão germinativo;
- ✓ *B. jararaca* 11 ovos sendo cinco com botão;
- ✓ *B. insularis* 17 ovos de duas fêmeas sendo dois ovos com botão;
- ✓ *B. leucurus* 12 ovos e dois com botão e
- ✓ *B. moojeni*, 39 ovos utilizamos 12 sendo que 5 tinham botão germinativo.

Figura 8. Amostras de serpentes do gênero *Bothrops* utilizadas nos experimentos.

(A) *B. insularis*, (B) *B. jararaca*, (C) *B. alcatraz*, (D) *B. erythromelas*, (E) *B. leucurus* (Fonte: Puerto, G. 2019) e (F) *B. moojeni* (Fonte: Costa, B.M.).
Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Figura 9. Amostras de ovos atrésicos da espécie *B. insularis* utilizados nos experimentos

(A) Dissecação de ovo atrésico não fecundado. (B) Embrião em ovo atrésico com vitelo de consistência bem mole. (C) Embrião retirado de ovo atrésico para análise histológica, destaque para os olhos bem desenvolvidos. (D) Ovo atrésico de consistência dura e aparentemente sem botão. (E) Embrião bastante desenvolvido em ovo atrésico de consistência mole. (F) Parturição de filhotes e ovos atrésicos de *B. insularis* em caixa plástica no cativeiro (Fonte Silva, K. B.).
Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Figura 10. Ovos atrésicos da espécie *B. erythromelas*

(A) Ovos liberados no cativeiro do Museu Biológico sobre as cascas de madeira do recinto (Fonte Puerto, G.); (B) Ovo atrésico evidenciando o botão germinativo; (C, D) Ovos dissecados sob gelo seco, com presença de disco germinativo, utilizados para análises histológicas e citometria.

Fonte: Corrêa, P.G. (2019)

Figura 11. Ovos atrésicos de *B. leucurus*

(A) Ovo atrésico dissecado para análise histológica, presença de botão germinativo. (B) Ovo atrésico bastante desidratado e com forma irregular.

Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Figura 12. Ovos atrésicos da espécie *B. jararaca*

(A) Provável aborto de *B. jararaca* recém chegada da natureza. Liberou ovos atrésicos fecundados sendo a maioria em avançados estágios de desenvolvimento e um natimorto. (B) Embrião em estágio mais precoce de desenvolvimento, e (C) embrião mais desenvolvido, em estágio mais maduro, ambos bastante desidratados. (D) Botão germinativo dissecado a fresco para processamento das células e análises por citometria. (E) Pequeno botão germinativo do ovo congelado encontrado por dissecação sob gelo seco.

Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Figura 13. Ovos atrésicos da espécie *B. moojeni*

(A) Parturição de dois filhotes e 39 ovos atrésicos de *B. moojeni* em 2016 (Fonte Costa, B. M.). (B) Dissecção de um pequeno ovo atrésico, da mesma ninhada, com botão germinativo amostrado. (C) Parto virgem da mesma fêmea em cativeiro, no ano de 2018; liberou no recinto 31 ovos atrésicos e teve (D) um único filhote com mutações e calosidades ósseas na coluna vertebral (setas escuras), similar à mãe, mas viveu apenas três horas em cativeiro. Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Nas imagens por microscopia eletrônica de varredura ficou difícil analisar os tecidos em processo de morte celular. De qualquer forma apresentamos as MEVs como resultados uma vez que estão presentes tecidos e células organizados (figura 14).

Figura 14. Fotomicrografia eletrônica de varredura (MEV) com amostras de ovos atrésicos de serpentes do gênero *Bothrops*

(A) Ovo atrésico de *B. insularis* com botão. (B, C e D) Imagens coletadas do ovo em (A) Presença de hemácias ou células além de tecido lipídico. (E) Ovo atrésico de *B. insularis* sem botão germinativo usado para MEV. (F, G e H). Imagens coletadas do ovo (F). Nota-se muito teor lipídico, denso, sem tecido organizado.
Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

5.3 FOTOMICROGRAFIA DOS CORTES DOS EMBRIÕES

As amostras dos ovos contendo botão embrionado foram fixadas, processadas, cortadas e coradas por técnicas de rotina (Hematoxilina/Eosina).

Os cortes histológicos dos embriões de *B. erythromelas* apresentados na figura 15, mostram a organização dos tecidos embrionários nos quais podemos identificar pâncreas primitivo, células acinares do pâncreas primitivo, observa-se no interior do citoplasmas destas células grânulos densos (#) e células em divisão mitótica (*). Demais espécies são apresentadas fotomicrografias nas figuras 16 a 20.

Figura 15 Fotomicrografias representativas de ovos atrésicos embrionados de serpentes da espécie *B. erythromelas*

Observam-se células acinares do pâncreas primitivo (A). (B) Em detalhe, e no interior do citoplasma das células acinares (C), grânulos densos (#) e células em divisão mitótica (*).
Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Figura 16 Fotomicrografias representativas de ovos atrésicos embrionados de serpentes da espécie *B. jararaca*

Observam-se Córioalantóide (a) e Intestino primitivo (b) em (A). Destaque, maior aumento, para o córioalantóide em (B).

Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Figura 17 Fotomicrografias representativas de ovos atrésicos embrionados de serpentes da espécie *B. jararaca*

Observam-se intestino primitivo (a) e células hematopoiéticas (b) em (A). Mesmas estruturas em maior aumento em (B e C).

Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Figura 18 Fotomicrografias representativas de ovos atrésicos embrionados de serpentes da espécie *B. jararaca*

Observam-se células acinares do pâncreas primitivo (A) e (B) em detalhe. (C) Tecido muscular e (D) intestino primitivo.

Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Figura 19 Fotomicrografias representativas de ovos atresicos embrionados de serpentes da espécie *B. moojeni*

(A) embriões espelhados de *B. moojeni* com intestino e rim primitivos.

(B) as setas indicam melanossomos, responsáveis pelo transporte de melanina.

(C) tecidos em necrose,

Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

Figura 20 Fotomicrografias representativas de ovos atrésicos embrionados de serpentes da espécie *B. insularis*

Observam-se Somitos no círculo descontínuo (A), em maior aumento as células que dão origem às vertebrae (B), e células formadoras de escamas da serpente nas setas negras (C). Células hematopoiéticas em (D).

Fonte: Corrêa, P.G. (2019).

5.3 CICLO CELULAR

As análises das fases do ciclo celular (sub-G1/DNA fragmentado, G0/G1, S e G2/M) das populações celulares das amostras dos embriões das diferentes espécies foram apresentadas em histogramas da distribuição do conteúdo do DNA por célula, e em gráficos de barras representando a média $\pm$ desvio padrão (dp). Além disso, as diferentes populações foram separadas e analisadas em Gates denominados de Gate 1 e Gate 2 e para cada uma analisado seu ciclo celular (figuras 21 à 25).

Nas amostras de *B. insularis* as populações de células obtidas no Gate 1 e Gate 2 mostraram diferenças significativas, as células estão aumentadas na fase S e diminuída significativamente na fase G2/M no Gate 2, como apresentado na figura 21, demonstrando sua diferença no potencial proliferativo.

Figura 21. Ciclo celular populações celulares de *B. insularis*

(A) Histograma expressa células de ovo atresico com botão germinativo em fases do ciclo celular. Analisado em citômetro FACS Calibur com fluorocromo marcador iodeto de propídeo referente à população 1 (Gate 1) de células em gráfico do tipo “dotplot” (B). Em (C) histograma referente à população 2 (Gate 2) de células em gráfico do tipo “dotplot” (D). Em (E) Média por população celular $\pm$ desvio padrão da porcentagem do ciclo celular das células. Cálculos estatísticos por teste “one way” ANOVA gerados no software GraphPrism v5.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Nas amostras da *B. jararaca* os Gates 1 e 2 não tiveram diferenças significativas, como também na distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular.

Figura 22. Ciclo celular populações celulares de *B. jararaca*

(A) Gráfico do tipo “dotplot” expressa células de ovo atresico com botão germinativo em fases do ciclo celular. Analisado em citômetro FACS Calibur com fluorocromo marcador iodo de propídeo referente à população 1 (Gate 1) de células (B). Em (C) histograma referente à população 2 (Gate 2) de células (D). Em (E) Média por população celular $\pm$ desvio padrão da porcentagem do ciclo celular das células. Cálculos estatísticos por teste “one way” ANOVA gerados no software GraphPrism v5.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Nas amostras de *B. erythromelas* as populações de células obtidas no Gate 1 e Gate 2 mostraram diferenças significativas, as células estão diminuídas na fase S e aumentadas significativamente na fase G0/G1 no Gate 2, como apresentado na figura 23, demonstrando sua diferença no potencial proliferativo.

Figura 23. Ciclo celular populações celulares de *B. erythromelas*

(A) Modelo de histograma de amostra de ovo atresico com botão germinativo analisado em citômetro FACS Calibur com fluorocromo marcador iodeto de propídeo referente à população 1 (Gate 1) de células (B). Em (C) histograma referente à população 2 (Gate 2) de células (D). Em (E) gráfico com média de todos os ovos da espécie *B. erythromelas* e cálculos estatísticos por teste “one way” ANOVA gerados no software GraphPrism v5. ** $p < 0,01$.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Nas amostras de *B. moojeni* as populações de células obtidas no Gate 1 e Gate 2 mostraram diferenças significativas, as células estão diminuídas na fase S e aumentadas significativamente na fase G0/G1 no Gate 2, como apresentado na figura 14, demonstrando sua diferença no potencial proliferativo.

Figura 24. Ciclo celular populações celulares de *B. moojeni*.

(A) Modelo de histograma de amostra de ovo atresico com botão germinativo analisado em citômetro FACS Calibur com fluorocromo marcador iodeto de propídeo referente à população 1 (Gate 1) de células (B). Em (C) histograma referente à população 2 (Gate 2) de células (D). Em (E) gráfico com média de todos os ovos da espécie *B. moojeni* e cálculos estatísticos por teste “one way” ANOVA gerados no software GraphPrism v5. Ns= não significativo.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Nas amostras de *B. leucurus* as populações de células obtidas no Gate 1 e Gate 2 não mostraram diferenças significativas, as células estão diminuídas na fase G2/M e aumentadas significativamente na fase S no Gate 2, como apresentado na figura 15, demonstrando sua diferença no potencial proliferativo.

Figura 25. Ciclo celular populações celulares de *B. leucurus*.

(A) Modelo de histograma de amostra de ovo atresico com botão germinativo analisado em citômetro FACS Calibur com fluorocromo marcador iodeto de propídeo referente à população 1 (Gate 1) de células (B). Em (C) histograma referente à população 2 (Gate 2) de células (D). Em (E) gráfico com média de todos os ovos da espécie *B. leucurus* e cálculos estatísticos por teste “one way” ANOVA gerados no software GraphPrism v5. Ns= não significativo.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Quando comparamos todas as espécies somando os Gates 1 e 2 de cada espécie, apenas houve diferenças significativas entre as espécies *B. jararaca* e *B. insularis* nas fases G2/M e S do ciclo celular, conforme gráfico de média $\pm$ dp na figura 26.

Figura 26. Estatística do ciclo celular *B. jararaca* e *B. insularis*

Diferenças significativas entre as células das espécies com grau de parentesco *B. insularis* e *B. jararaca*. ***= $p < 0,001$ entre fase G2/M e e fase S (síntese de DNA e proteínas).
Fonte: Correa, P.G., 2019.

5.4 DNA FRAGMENTADO

A porcentagem de DNA foi obtida durante o experimento de ciclo celular. As células em Gate 1 teve maior porcentagem de DNA fragmentado indicando morte celular. Estatisticamente houveram diferenças significativas no Gate1 das espécies *B. insularis* e *B. jaracaca* quando comparados ao Gate-2 (Figura 27).

Figura 27. Porcentagem de DNA fragmentado entre Gate-1 e Gate-2 das espécies *B. insularis* e *B. jararaca*

Teste t-Mann Whitney: DNA fragmentado, comparação por população celular (Gate 1 e 2), por espécie. Graph Pad Prism v7. * $p < 0.05$.
Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Figura 28. Porcentagem de DNA fragmentado entre Gate-1 e 2 das espécies *B. leucurus* e *B. jerythromelas*

Teste t-Mann Whitney: DNA fragmentado, comparação por população celular (Gate 1 e 2), por espécie. Graph Pad Prism v7. * $p < 0.05$.
Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Figura 29. Porcentagem de DNA fragmentado por espécie e por população celular

(A) Pelo teste t-Mann Whitney: porcentagem de DNA fragmentado entre Gate 1 e 2 em *B. moojeni* com Graph Pad Prism v7.

(B) Teste ANOVA pós teste Tukey (múltiplas comparações): diferenças significativas no Gate 2 entre *B. insularis* e *B. erythromelas* (#); *B. jaranaca* e *B. moojeni* (\$): $p < 0,05$. Entre *B. insularis* e *B. moojeni* (@): $p < 0,01$.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

5.5 ENSAIO DE LIPOPEROXIDAÇÃO

A peroxidação lipídica nas membranas celulares e a formação de radicais livres foram quantificadas pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da lipoperoxidação formado pela decomposição primária ou secundária de produtos intermediários, e reage com o ácido tiobarbitúrico, sendo amplamente utilizado na determinação do estresse oxidativo. Estas substâncias produzem uma coloração rosa característica, medida por espectrofotômetro.

Na figura 30 apresentamos estes resultados da leitura espectrofotométrica. Dados de média $\pm$ dp da concentração de MDA em nmol/mL de amostra. No gráfico são apresentados dados individuais de cada ovo atrésico e circulamos aqueles que apresentaram botão germinativo para enriquecer os dados investigativos.

Análises estatísticas permitiram correlacionar se a concentração de MDA produzida tinha relação com a presença de botão germinativo ou mesmo com o peso total do ovo amostrado. Não houve relação com o peso do ovo mas houveram diferenças significativas nas espécies *B. leucurus* ($p < 0,001$) e *B. moojeni* ($p < 0,01$) entre ovos com e sem botão germinativo (figura 31).

Figura 30 Estatística GraphPrism do Ensaio de lipoperoxidação

Concentrações de MDA expressas em nmol/mL de amostra. Temos concentração de MDA por ovo atrésico individualmente e em círculo os ovos com presença de botão germinativo. Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

Figura 31 Determinação do perfil de produção de MDA em ovos atrésicos de espécies de *Bothrops* com e sem botão germinativo

Teste de variância de Anova seguido do pós-teste Tukey: diferenças estatísticas significativas entre as médias dos valores de MDA (nmoles/mL) dos animais com ou sem disco germinal. (A) *B. erythromelas*; (B) *B. insularis*; (C) *B. jararaca*; (D) *B. leucurus*; (E) *B. moojeni*. Não houve diferença na produção de MDA em relação ao peso total do ovo.

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ e ns, não significativo.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

5.6 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS

A expressão dos marcadores de células tronco embrionárias foi determinada por citometria de fluxo e as análises são apresentados a seguir por gráficos do tipo *dotplot* e a média $\pm$ dp. Foram utilizados marcadores para as populações de células tronco (“stem cells”) e de morte celular programada. Dentre os marcadores selecionamos aqueles cuja marcação se dá nos folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme), CD-90, CD-117 e Stro-1. Cada um tem sua função e estão comissionados à produção de diferentes tecidos, além da manutenção do embrião, maturação, diferenciação e organogênese.

5.6.1 Marcador molecular CD-34

O marcador CD-34 é uma glicoproteína transmembrana, marcador de células troncos e células progenitoras hematopoiéticas. Sua expressão, nas células obtidas de embriões mostraram aumento significativo nas espécies *B. leucurus* e *B. jararaca*. Quando as amostras foram comparadas com as amostras de *B. leucurus* todas apresentaram diferenças altamente significativas, ($p < 0.001$) (Figura 32).

Figura 32 Diferenças estatísticas na expressão do marcador CD-34 em amostras dos ovos embrionados de serpentes

Teste de variância de ANOVA seguido de teste múltiplo de Tukey-Kramer GraphPadPrism v5
 +++ $p < 0.001$: *B. jararaca* x *B. leucurus*; &&& $p < 0.001$: *B. insularis* x *B. leucurus*; @@@ $p < 0.001$: *B. leucurus* x *B. erythromelas*; ### $p < 0.001$: *B. leucurus* x *B. moojeni*.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019

5.6.2 Marcador molecular CD-44

O marcador CD-44 é um receptor de membrana de ácido hialurônico, expresso nos primeiros estágios da embriogênese. Tem papel na implantação do embrião, formação de células hematopoiéticas, morfogênese e é expresso na superfície de células tronco embrionárias diferenciadas. Influencia a motilidade, sobrevivência e proliferação das células sendo modelo de migração de células mesenquimais para tecidos danificados. Houve aumento significativo da expressão nas espécies *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. leucurus*. Quando todas as amostras foram comparadas houveram diferenças significativas das amostras de *B. leucurus* com *B. moojeni* e *B. erythromelas* ($p < 0,05$) (figura 33).

Figura 33 Diferenças estatísticas na expressão do marcador CD-44 em amostras dos ovos embrionados de serpentes

Teste de variância de ANOVA seguido de teste múltiplo de Tukey-Kramer GraphPadPrism v5
 # $p < 0,05$: diferenças entre *B. leucurus* x *B. moojeni*; @ $p < 0,05$: diferenças entre *B. leucurus* x *B. erythromelas*.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019.

5.6.3 Marcador molecular Stro-1

O marcador Stro-1 é um marcador de diferenciação celular, anticorpo para: identificação, isolamento e caracterização funcional de precursores de células estromais hematopoiéticas da medula óssea (CEM). As CEM têm potencial clonogênico e em cultura, são capazes de se diferenciar em células de diferentes linhagens mesenquimais, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

Houve aumento significativo da expressão nas espécies *B. jararaca* e *B. moojeni*. Quando as amostras foram comparadas houveram diferenças significativas de *B. leucurus* com *B. jararaca* e *B. moojeni* ($p < 0,05$) (figura 34).

Figura 34 Diferenças estatísticas na expressão do marcador STRO-1 em amostras dos ovos embrionados de serpentes

Teste de variância de ANOVA seguido de teste múltiplo de Tukey-Kramer no GraphPadPrism v5. @ $p < 0,05$: diferenças entre *B. jararaca* x *B. leucurus*; # $p < 0,05$: diferenças entre *B. leucurus* x *B. moojeni*.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019

5.6.4 Marcador molecular CD-117

O marcador CD-117 é um receptor de tirosina-quinase codificado pelo gene c-kit e seu ligante é o fator de célula estaminal (FCE). Membro da família de receptores de tirosina quinase, esta molécula é expressa pela maioria das células progenitoras hematopoiéticas caracterizadas na medula óssea. Marcador de célula multi- e pluripotente teve aumento significativo da expressão apenas em *B. jararaca*. Quando as amostras foram comparadas apresentaram diferenças significativas *B. jararaca* e *B. erythromelas* ($p < 0,05$) (figura 35).

Figura 35 Diferenças estatísticas na expressão do marcador CD-117 em amostras dos ovos embrionados de serpentes

Teste de variância de ANOVA seguido de teste múltiplo de Tukey-Kramer no Graph Pad Prism v5. # $p < 0,05$: entre *B. jararaca* x *B. erythromelas*.
 Fonte: Corrêa, P.G., 2019

5.6.5 Marcador molecular CD-90

O marcador CD-90 ou Thy-1 (antígeno de células tronco do timo-1) é um marcador de sistema hematopoiético, expresso em timócitos, células estaminais hematopoiéticas, neurônios, um pequeno subconjunto de células do fígado fetal humano, células do sangue do cordão e células da medula óssea.

Não houve aumento significativo da expressão de CD-90 nas amostras das serpentes estudadas e quando comparadas não apresentaram diferenças significativas (figura 36).

Figura 36 Diferenças estatísticas na expressão do marcador CD-90 em amostras dos ovos embrionados de serpentes

Teste de variância de ANOVA seguido de teste múltiplo de Tukey-Kramer no GraphPadPrism v5. Ns: diferenças não significativas.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019

5.6.4 Marcador molecular Caspase-3 fosforilada

Caspases são proteases do tipo cisteína que desempenham um papel fundamental nas clivagens proteolíticas do processo apoptótico. São sintetizadas na forma inativa como pró-caspases e são ativadas após sinal de morte celular como caspases (CHANG; YANG, 2000). Há 14 tipos de caspases em mamíferos. A caspase-3, assim como a 6 e 7, são do tipo efetoras, após a ativação destas proteínas o mecanismo de ativação da apoptose se torna irreversível. A caspase-3 participa também da clivagem de várias proteínas envolvidas no reparo do DNA, ciclo celular e organização celular

Houve aumento significativo da expressão apenas da amostra *B. jararaca*. Quando comparadas houveram diferenças significativas entre *B. jararaca* e *B. insularis* (figura 37).

Figura 37 Diferenças estatísticas na expressão do marcador caspase-3 fosforilada em amostras dos ovos embrionados de serpentes

Teste de variância de ANOVA seguido de teste múltiplo de Tukey-Kramer no GraphPadPrism v5. # $p < 0,05$: entre *B. jararaca* x *B. insularis*.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019

Para termos ideia da expressão de todos os marcadores utilizados por espécie de serpente, além da morfologia das células, apresentamos os gráficos de “dotplot” e de média $\pm$ dp (figuras 38 a 42).

Figura 38 Gráfico das médias $\pm$ dp e dots plots da expressão dos marcadores em células embrionadas de *B. insularis*

Dados representativos dos dots plots, onde o eixo X representa o volume celular e o eixo Y a intensidade de fluorescência, obtidos no citômetro de fluxo da população de células embrionadas de *B. insularis* e média das amostras analisadas, n=2 experimentos independentes.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019

Figura 39 Gráfico das médias $\pm$ dp e dots plots da expressão dos marcadores em células embrionadas de *B. jararaca*

Dados representativos dos dots plots, onde o eixo X representa o volume celular e o eixo Y a intensidade de fluorescência, obtidos no citômetro de fluxo da população de células embrionadas de *B. jararaca* e média das amostras analisadas, n= 5 experimentos independentes.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019

Figura 40 Gráfico das médias $\pm$ dp e dots plots da expressão dos marcadores em células embrionadas de *B. moojeni*

Dados representativos dos dots plots, onde o eixo X representa o volume celular e o eixo Y a intensidade de fluorescência, obtidos no citômetro de fluxo da população de células embrionadas de *B. moojeni* e média das amostras analisadas, $n = 5$ experimentos independentes.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019

Figura 41 Gráfico das médias $\pm$ dp e dots plots da expressão dos marcadores em células embrionadas de *B. leucurus*

Dados representativos dos dots plots, onde o eixo X representa o volume celular e o eixo Y a intensidade de fluorescência, obtidos no citômetro de fluxo da população de células embrionadas de *B. leucurus* e média das amostras analisadas, n=2 experimentos independentes.

Figura 42 Gráfico das médias $\pm$ dp e dots plots da expressão dos marcadores em células embrionadas de *B. erythromelas*

Dados representativos dos dots plots, onde o eixo X representa o volume celular e o eixo Y a intensidade de fluorescência, obtidos no citômetro de fluxo da população de células embrionadas de *B. erythromelas* e média das amostras analisadas, n=4 experimentos independentes.

Fonte: Corrêa, P.G., 2019

6 DISCUSSÃO

6.1 OVOS ATRÉSICOS E CICLO REPRODUTIVO

Todas as serpentes liberaram ovos atrésicos de tamanho médio (~25 mm), de cor amarelo esbranquiçada ou castanho amarelada de aspecto as vezes mais rígido as vezes mais amolecido, mas sempre coincidentes com a época de parto (final da primavera e início do verão). Os ovos com embrião ou botão germinativo que tinham aspectos mais mole apresentavam material bastante preservado. Já aqueles mais desidratados, ressecados, e rígidos os embriões estavam com aspecto de tecido em processo de degeneração celular, reabsorção ou até mesmo mumificação.

As serpentes que apresentaram maior liberação de ovos atrésicos coincidiram com as fêmeas que nunca copularam desde que vieram da natureza, como que numa tentativa desesperada de perpetuar a espécie produziram bastante ovos de tamanho bem pequeno e poucos com sinal de botão germinativo.

Curiosamente a espécie *B. alcatraz* do plantel do Laboratório de Ecologia e Evolução liberou um único ovo atrésico em 2016, porém este foi fixado em formol e inviabilizou as análises moleculares. Até a presente data não houveram mais eventos de atresia ou parturição na espécie.

Observamos que o número de ovos atrésicos aumentou após as fêmeas serem mantidas em cativeiro em relação aquelas fêmeas que chegaram da natureza prenhes (ou vitelogênicas). Estes dados já foram relatados em outros trabalhos, como Alves et al. (2000), estudando o aspecto reprodutivo de *B. jararaca* em cativeiro observaram que do total de ovos paridos (515), 67 eram atrésicos (13,12%). Os dados apresentados para *B. jararaca* recém-chegadas da natureza mostraram que do total de ovos analisados, 7,89% eram atrésicos.

Alves et al. (1998), relataram diferença no número de ovos atrésicos em *B. neuwiedi* mantidas em cativeiro (28,46%) e recém-chegadas da natureza (22,96%). Alves et al. (2014) relatou a expulsão de 11 ovos atrésicos em *B. leucurus* cativa em 2004 e 16 ovos em 2006, sendo que o animal nunca havia mantido contato com macho desde o seu nascimento.

Alves et al. (2014) relatou uma fêmea de *B. neuwiedi* que expeliu 10 ovos em 1998, após quatro anos de cativeiro e a outra expeliu 12 ovos em vitelogênese

secundária em março de 1990, após 10 anos de cativeiro. As fêmeas de *B. neuwiedi* não mantiveram contato com qualquer macho desde sua entrada em cativeiro. Mas, não foram realizadas avaliações histológicas para testar se os ovos não estavam férteis, ou se foram fertilizados e os embriões morreram no início da embriogênese.

O período de cortejo e acasalamento de *B. insularis* de março a agosto (Amaral, 1921b) parece mais atrasado e longo do que outras serpentes do gênero (Almeida-Santos; Salomão, 2002). Almeida-Santos (2002) reportou um caso de uma fêmea de *B. insularis* que produziu ovos inférteis após oito anos mantida sozinha em cativeiro, sendo que dois anos depois deu à luz a um filhote normal, completamente desenvolvido e mais 13 ovos não fertilizados. Assim, ficou registrado que esta espécie pode se reproduzir por partenogênese facultativa, mas a estocagem de esperma também é uma hipótese plausível (BOOTH; SCHUETT, 2011).

Fêmeas de *B. jararaca*, filogeneticamente grupo irmão de *B. insularis* (GRAZIOTIN et al., 2006; FENWICK et al., 2009), atinge maior tamanho do que a segunda espécie, cuja ninhada é menor devido ao desenvolvimento desproporcional de seu corpo (SHINE, 1994B), adaptado ao hábito arborícola (WÜSTER et al., 2005). Além disso, geralmente as fêmeas de *B. insularis* tem um maior número de ovos atrésicos, diminuindo ainda mais a sua fecundidade, como já relatado há alguns anos por Hoge et al., (1959).

Segundo Wuster et al. (2005) a desigualdade no esforço reprodutivo da jararaca ilha é, provavelmente, resultado de restrições fisiológicas nas fêmeas grávidas ou efeito de prolongada endogamia. A flutuação anual no suprimento alimentar das serpentes na ilha (aves migratórias) também influencia na proporção de fêmeas reprodutoras (MADSEN et al., 2006). Estas informações também podem estar relacionadas ao estresse oxidativo, tendo as nossas fêmeas adultas sido expostas ao baixo suprimento alimentar na ilha. No cativeiro, mesmo quando ocorre a cópula as fêmeas ainda apresentam alto número de folículos atrésicos.

6.2 PARTENOGENESE FACULTATIVA

A vitelogênese secundária e a ovulação em fêmeas do gênero *Bothrops* sem contato com machos pode estar relacionada à partenogênese facultativa em cativeiro ou a estocagem de esperma a longo prazo, conforme indicam os registros de Almeida-

Santos e Salomão (2002). Os autores registraram partenogênese facultativa em um espécime de *B. moojeni* nascido em cativeiro e estocagem de esperma em *B. leucurus* e várias outras espécies de viperídeos.

Observamos uma fêmea de *B. moojeni* liberou 39 folículos atrésicos em 2016 e apenas um filhote, idêntico à mãe, mostrando uma anomalia congênita no pescoço (torcida) o que parece ser um caso de partenogênese facultativa. Em 2018 outra vez, 21 ovos atrésicos e um filhote com calos ósseos similar à mãe. O jovem estava disponível para análise citogenética, mas os dados não foram apresentados. As espécies *B. erythromelas*, *B. moojeni* e *B. leucurus* não tiveram nenhum contato prévio com machos da mesma espécie e liberaram ovos atrésicos anualmente sendo pelo menos um deles com presença de botão germinativo, portando depois de nossos testes inclusive com marcadores de células tronco, ensaio de ciclo celular e DNA fragmentado, podemos sim afirmar que os ovos estavam fecundados, portanto se trata de mais novos casos de partenogênese facultativa (PF).

A fêmea de *B. erythromelas* do Museu Biológico, em 2017 se mostrou bastante prolífera, quando copulou em cativeiro pela primeira vez com macho de mesma espécie e veio a parir 17 filhotes mais alguns ovos atrésicos (10).

Segundo dados de literatura, várias questões sobre a partenogênese facultativa permanecem sem respostas, mas as condições de cativeiro podem interferir no desenvolvimento folicular. Em outros viperídeos como *Crotalus durissus collilineatus* e *C. durissus terrificus* a presença de machos não foi obrigatória para a ovulação (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

Booth e Schuett (2011) esclarecem que se vários filhotes forem produzidos por partenogênese, eles não serão geneticamente idênticos entre si nem com a mãe. Uma vez que todas as espécies de serpentes têm o sistema de determinação genética sexual ZZ/ZW com heterogamia feminina (ZW), os filhotes resultantes da PF serão machos (ZZ) (BOOTH; SCHUETT, 2011; BOOTH et al., 2012; REYNOLDS et al., 2012) ou fêmeas (WW) homogaméticos (BOOTH et al., 2011a, b). Na PF, a condição de ZW (fêmea) é teoricamente possível em outros modos que não a fusão automática de terminais (LAMPERT, 2008); no entanto, evidências convincentes desses indivíduos ainda não foram relatadas.

6.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Em nosso trabalho estamos considerando como ovos fertilizados aqueles que apresentaram embrião, disco germinativo ou qualquer sinal de tecido com sangue no interior dos mesmos. Estes puderam ser utilizados para ensaios de ciclo celular e testes de marcadores moleculares. Apesar da dificuldade em se obter lâminas com qualidade e sem artefatos - o material rico em vitelo é gorduroso e se desprende da lâmina com facilidade - foi muito importante apresentar dados histológicos de ovos atrésicos, sendo este um dado inovador.

Devido à falta de dados histológicos com qualidade que evidenciem a formação de tecido embrionário, mesmo para comparação com imagens de MEV, não podemos afirmar, apenas inferimos os tipos de estruturas e tecidos histológicos analisados. Estes resultados podem ser mais conclusivos com a conciliação de outras técnicas de histologia como o crio-seccionamento, investigações por ensaios de imunohistoquímica, preparo de novos ensaios por MEV e citometria com outros marcadores celulares de células-tronco.

6.4 CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA

A formação de muitas células, a partir de um único ovo fertilizado, envolve uma série de processos complexos e altamente coordenados que incluem a proliferação celular, quiescência, apoptose e células latentes. Sob condições normais a célula quiescente, sem divisão celular, encontra-se em G0. Algumas continuam se dividindo na medida da necessidade e a apoptose assegura que não haja acúmulo excessivo de células nos tecidos. Assim, muitas proteínas de checagem são necessárias para induzir ou cessar a proliferação celular, mantendo ou impedindo ciclos de divisão celular, iniciando ou inibindo a apoptose. Como é o caso das ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fator promotor de mitose, que atuam como controladores positivos e fundamentais do ciclo celular.

As duas populações de células de *B. insularis* apresentaram diferenças significativas em porcentagem de DNA fragmentado, sendo maior no Gate-1 ($p < 0,05$). Porém as duas populações existentes nos Gates 1 e 2 apresentaram maior

porcentagem de células nas fases de checagem, G1/M e G2 quando comparamos com demais espécies.

O stress oxidativo é um dos fatores capazes de alterar ou inibir proteínas dos pontos de checagem do ciclo celular. As fases mais importantes de observarmos se as células estão proliferando ou não é verificando as fases de ponto de checagem, G1 e G2.

Podemos dizer que, de um modo geral, a síntese de ciclinas e a consequente ativação de CDKs resultam na fosforilação de proteínas específicas que promovem a progressão do ciclo celular. E as alterações no microambiente celular levam a danos internos que geram sinais intracelulares que influenciam o ciclo celular, justamente porque exercem controle sobre os complexos CDK acoplados às ciclinas. Os altos valores de porcentagem de células em fase S podem indicar a expressão de proteínas, além da síntese de DNA. Podemos ter altas porcentagens de células nas fases G1 e G2 mas por defeito de expressão ou na própria verificação as células não entram em divisão, portanto não sofrem mitose.

Ter células em G1 indica que elas estão crescendo, dobrando todo seu conteúdo celular antes de dividir. A divisão ocorrerá após G2/M, onde se dá a mitose propriamente dita.

6.5 LIPOPEROXIDAÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) afetam múltiplos processos fisiológicos na reprodução e fertilidade, desde a maturação dos ovócitos até a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a gravidez (CHANDRA, et al., 2000).

Na peroxidação lipídica existe uma perda de seletividade na troca iônica e liberação do teor de organelas, como enzimas hidrolíticas lisossômicas e formação de produtos citotóxicos, como na formação de malondialdeído (MDA), capaz de induzir à morte celular. O malondialdeído é um aldeído reativo com baixa estabilidade e amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo (PILZ et al., 2000). O desequilíbrio entre sistemas antioxidantes e pró-oxidantes, com predominância de ação oxidante e consequentes danos, resulta em estresse oxidativo. Ele promove mudanças como a peroxidação lipídica, a fragmentação do DNA e a oxidação de diferentes moléculas, levando à morte celular (apoptose).

No entanto, a geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, necessário para que funções como sinalização celular, diferenciação e morte celular ocorram adequadamente. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas diversas reações bioquímicas.

Enquanto os radicais de superóxido são produzidos pela cadeia respiratória mitocondrial ou pela atividade de oxidases, como xantina oxidase, aldeído oxidase e NADPH oxidase, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado principalmente por dismutação de O_2^- (CADENAS et al., 1995). Para neutralizar o efeito oxidativo dos EROs, todos os organismos aeróbicos desenvolveram defesas bioquímicas, incluindo os eliminadores de radicais livres de baixo peso molecular e os sistemas antioxidantes enzimáticos (YU, 1994).

Quando a geração de ERO excede a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante, o estresse oxidativo ocorre na célula. Muitos organismos tendem a experimentar grandes variações na disponibilidade de oxigênio para seus tecidos quando enfrentam condições naturais como nascimento, exercício, hibernação e inverno (BRUZADIC et al., 1990; HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVIN, 2002).

6.6 DANO OXIDATIVO

Principais moléculas biológicas, notadamente DNA, proteínas, lipídios, podem ser afetadas negativamente por EROs. Além disso, a reação com essas macromoléculas gera EROs adicionais numa cascata de danos se não for controlada. Estima-se que as EROs seja responsável por 10.000 modificações da base de DNA por célula por dia (AMES et al., 1991). A oxidação ou a metilação das bases nitrogenadas leva à consequências fenotípicas mais graves (FALNES et al., 2007).

A oxidação de proteínas produz pontes de dissulfureto reversíveis, altera sua formação e, eventualmente, prejudica sua função. A magnitude do dano dependerá, em parte, da localização das proteínas em relação ao site da geração de EROs, e sua composição e estrutura (DRÖGE, 2002). Alguns aminoácidos, nomeadamente triptofano, tirosina, histidina e cisteína, são muito mais suscetíveis à oxidação do que outros, e ERO pode alterar a estrutura secundária e terciária das proteínas (DRÖGE, 2002; SURAI, 2002).

O acúmulo de dano oxidativo ao DNA mitocondrial, proteínas e lipídios nos oócitos velhos pode ser um fator predominante que reduz a viabilidade dos oócitos

logo afetam o potencial de desenvolvimento embrionário das serpentes. O dano oxidativo aos lipídios no oócito tem sido implicado como causa de uma persistente qualidade de oócito persistente após o avanço da idade dos animais. Ainda que as serpentes tenham mais de 10 anos a *B. erythromelas* se mostrou bastante prolífera quando copulou pela primeira vez em 2017. Portanto mesmo que haja a formação de EROs existe o sistema antioxidante atuando nas células e reparando os erros bioquímicos e possíveis danos.

6.7 MARCADORES MOLECULARES

A expressão conjunta de marcadores moleculares de células tronco (CD-34, CD-44, CD-90, CD-117, Stro-1) mostraram que as células embrionadas de serpentes promoveram positividade diferencial para todos os marcadores expressos neste trabalho.

O marcador CD-44, um receptor glicoproteico que é ativado pelo ácido hialurônico, que auxilia no recrutamento das células tronco-mesenchimais (CTM) durante o desenvolvimento e regeneração tecidual do tecido e especificamente de forma intrínseca em diferentes nichos de células tronco (WILLIAMS et al., 2013), foi menor nas amostras de *B. moojeni* e *B. erythromelas*, o que pode estar relacionado ao grau de especificação destas espécies cujo processo de fecundação foi partenogenético.

Outro fato, essas amostras demonstraram que provavelmente apresentam distintos estágios de diferenciação e maturação embrionárias o que refletiu na expressão de seus marcadores e na apresentação histológica de tecidos embrionários prematuros.

A expressão do marcador Stro-1, marcador de diferenciação celular e precursores de células estromais hematopoiéticas da medula óssea, foi extremamente menor em *B. leucurus* em relação aos marcadores CD-34 e CD-44, quando comparado às outras espécies.

Esta diminuição sugere que há uma elevação no processo de hematopoese, enquanto que as amostras que apresentaram um aumento na expressão de Stro-1 revelam grau de maturidade menor e que este processo está relacionado à formação

e vasculogênese endotelial. Isto foi observado quando analisamos os tecidos pela histologia que nesta espécie não há tecidos organizados.

Os dados da expressão do marcador CD-34, uma glicoproteína transmembrana, marcador de células troncos e células progenitoras hematopoiéticas, por sua vez, teve aumento significativo da expressão apenas na espécie *B. leucurus*, quando comparado às demais espécies de serpentes. Este dado sugere que este aumento pode ter ocorrido pelo grau de maturação do embrião, e suas análises histológicas mostraram tecidos em processos de organização sem característica de organogênese terminal, há uma tendência na organização dos vasos sanguíneos.

O CD-90 ou Thy-1 (antígeno de células tronco do timo-1) é um marcador de sistema hematopoiético, expresso em timócitos, células estaminais hematopoiéticas, neurônios, um pequeno subconjunto de células do fígado fetal humano, células do sangue do cordão e células da medula óssea.

Em conjunto à positividade da expressão dos marcadores CD-90 e CD-117 demonstrou o potencial das células obtidas de todas as espécies em produzir células progenitoras do tecido hematopoiético. A imaturidade e organogênese observadas nas análises histológicas evidenciam tal fato.

As análises das fases do ciclo celular demonstraram a presença na população no Gate-1 de células com DNA fragmentado ou sub-G1 em particular nas amostras *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. erythromelas*, o que pode estar correlacionada à presença nas amostras histológicas de áreas de necrose, além disso a expressão de caspase-3 fosforilada em amostras de *B. jararaca* demonstra a morte celular programada nesta espécie.

No aspecto de fecundação e reprodução em *B. jararaca*, em nosso estudo, foi observado maior número de ovos atrésicos fecundados que apresentavam no seu interior botões germinativos ou embriões em estágios finais de desenvolvimento. O aumento da expressão de caspase-3 fosforilada nesta espécie pode estar relacionada ao estágio de diferenciação e maturação dos embriões.

A fosforilação da caspase-3 ou de outras cisteína-proteases envolvidas na morte celular programada podem ser ativadas por subprodutos do metabolismo celular provenientes das EROs que medeiam os processos de apoptose, fagocitose e desintoxicação (LI et al., 2001). O aumento excessivo das EROs induz dano ao DNA, o

que causa modificações mutagênicas em sequências alvo de nucleotídeos, oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica.

As espécies oxidantes produzidas por este processo, em geral produzem modificações em várias moléculas, como em proteínas, promovendo alterações na sua estrutura, na permeabilidade, diferenciação e maturação.

A peroxidação lipídica pode desencadear o processo de apoptose ativando a via intrínseca presente em todas as células de vertebrados mamíferos e não-mamíferos dependente ou não da fosforilação da via das caspases (CHANDRA et al., 2000). Esta hipótese pode corroborar com a presença do DNA fragmentado na população de células embrionadas presentes no Gate-1 e a presença da caspase-3 fosforilada em todas as amostras estudadas.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo concluem-se:

- foram identificados os possíveis processos envolvidos na atresia de embriões de serpentes do gênero *Bothrops* mantidas em cativeiro.
- Os ovos atrésicos mostraram diferentes estádios de desenvolvimento, diferenciação e maturação dos precursores e de células-tronco envolvidos na organogênese destas espécies de serpente.
- A hipótese: “ovo atrésico é fecundado?”, neste estudo foi confirmada pela identificação de botões germinativos em diferentes fases de organogênese, que expressaram diferencialmente marcadores envolvidos na cinética de crescimento e diferenciação celular, modulados pelo estresse oxidativo.
- Outros aspectos relevantes neste estudo envolvidos na atresia destes embriões foi o processo de partenogênese encontrado nas espécies *B. moojeni*, *B. leucurus* e *B. erythromelas*, sendo nesta última um fenômeno inovador.
- Particularidades na espécie *B. insularis* relacionadas à atresia dos ovos foram relevantes neste estudo: elevado número de ovos atrésicos não fecundados, a presença de intersexo entre fêmeas reprodutivas e as condições ambientais no cativeiro.

8 REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, R. D. Female reproductive cycles in the snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, Chicago, (35):256-261. 1979.
- ALDRIDGE, R. D. The ovarian cycle of the watersnake *Nerodia sipedon* and effects of hypohysectomy and gonadotropin administration. *Herpetologica*, Chicago, (38):71-79. 1982.
- ALMEIDA-SANTOS, S.M., SALOMÃO, M.G. Long term sperm storage in the female neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Japanese Journal of Herpetology** 17: 46-52. 1997.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M., SALOMÃO, M. G. Reproduction in Neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In G. Schuett, M. Höggren, and H. W. Greene (eds.), **Biology of the Vipers**. Biological, Sciences Press, Carmel, IN. p. 445–462, 2002a.
- ALMEIDA-SANTOS, S.M., ORSI, A.M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 26(2): 109-112. 2002b.
- ALMEIDA-SANTOS, S.M., BRAZ, H.B., SANTOS, L.C., SUEIRO, L.R., BARROS, V.A., ROJAS, C.A., KASPEROVICZUS, K.N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira** 3(1): 14-24. 2014.
- ALMEIDA-SANTOS, S.M., BARROS, V.A., ROJAS, C.A., SUEIRO, L.R., NOMURA, R.H.C. Reproductive Biology of the Brazilian Lancehead, *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae), from the State of São Paulo, Southeastern Brazil. **South American Journal of Herpetology** 12(2):174-181. 2017.
- ALVES, F., JESUS, J., ARGÔLO, A., 2014. Postura de folículos vitelogênicos em cativeiro por serpentes *Bothrops* (Serpentes, Viperidae). **Biotemas**, 27(2), 213-216.
- AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ophídios do Brasil. Parte 1 Biologia da nova espécie, *Lachesis insularis*. Anexos **Memória do Instituto Butantan**, v. 1, n. 1, p. 39-44, 1921.
- AMARAL, A. New genera and species of snakes **Proc. N. Engl. Zool. Club**, 8, pp. 85-105. 1923.
- AMES, B.N. Oxygen radicals and 8-hydroxyguanine in DNA. **Jpn. J. Cancer Res.** 82(12):1460-1461.1991. 49
- 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**. 68 (3). p. 418-429. 2012.

BARBO, F.E., GASPARINI, J.L., ALMEIDA, A.P., ZAHER, H., GRAZZIOTIN, F.G., GUSMÃO, R.B., FERRARINI, J.M.G., SAWAYA, R.J. "Another new and threatened species of lancehead genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil". **Zootaxa** 4097 (4): 511–529. 2016.

BARROS, V.A., ROJAS, C.A., ALMEIDA-SANTOS, S.M. Reproductive Biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. **Advances in Zoology** 2014: 1-11. 2014a.

BARROS, V.A., ROJAS, C.A., ALMEIDA-SANTOS, S.M. Is rainfall seasonality important for reproductive strategies in viviparous neotropical pit vipers? A case study with *Bothrops leucurus* from the Brazilian Atlantic Forest. **Herpetological Journal** 24: 69-77. 2014b.

BARROS, V.A. Reprodução no gênero *Bothrops* (Serpentes, Viperidae). **Ph.D. Dissertation**, São Paulo State University, Brazil. 2016.

BATISTIC, R.F., FEDERSONI, Jr P.A., CALIXTO, S.C.R., VITIELLO, N. Partenogênese facultativa em *Bothrops moojeni*: um caso. **Publicação Extra do Museu Nacional de História Natural Montevideo**. 50 (36). 1999.

BENEDETTI, A., JEZEQUEL, A.M., ORLANDI, F. A quantitative evaluation of apoptotic bodies in rat liver. **Liver** 8:172–77. 1988.

BILLIG, H., FURUTA, I., RIVIER, C., TAPANAINEN, J., PARVINEN, M., et al. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. **Endocrinology**, 136:5–12. 1995.

BLACKBURN, D.G. Resorption of oviductal eggs and embryos in squamate reptiles. **Herpetological Journal**, 8, 65–71. 1998.

BLACKBURN, D.G., WEABER, K.K., STEWART, J.R., THOMPSON, M.B. Do pregnant lizards resorb or abort inviable eggs and embryos? Morphological evidence from an Australian skink, *Pseudemoia pagenstecheri*. **Journal of Morphology**, 256, 219–234. 2003.

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

BONNET, X., AKOKA, S., SHINE, R., POURCELOT, L. Disappearance of eggs during gestation in a viviparous snake (*Vipera aspis*) detected using non-invasive techniques. **Acta Herpetol.** 3:129–137. 2008.

BOOTH, W., SCHUETT, G.W. Molecular genetic evidence for alternative reproductive strategies in North American pitvipers (Serpentes, Viperidae): long-term sperm storage and facultative parthenogenesis. **Biological Journal of the Linnean Society** 104:934–942. 2011.

BOOTH, W. et al. New insights on facultative parthenogenesis in pythons. **Biological Journal of the Linnean Society**. 112, 461–468. 2014.

BRANCH, W.R. Birth in the mole snake, *Pseudaspis cana*. **J. Herpetol. Assoc. Africa**, 10(1): 24-29. 1973.

BRANDT, B.W., ZWAAN, B.J., BEEKMAN, M., WESTENDORP, R.G.J., SLAGBOOM, P.E. Shuttling between species for pathways of lifespan regulation: A central role for the vitellogenin gene family? **Bioessays** 27:339–346. 2005.

BRENO, M. C.; YAMANOUYE, N. et al. Maintenance of the snake *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) in captivity. **The Snake, Nugata** (22):126-130. 1990.

BUZADIC, B., SPASIC, M., SAICIC, Z.S., RADOJICIC, R., PETROVIC, V.M., HALLIWELL, B. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation, **Free Radic. Biol. Med.** 9:407–413. 1990.

CADENAS, S., ROJAS, C., PEREZ-CAMPO, R., LOPEZ-TORRES, M., BARJA, G. Vitamin E protects guinea pig liver from lipid peroxidation without depressing levels of antioxidants, **Int. J. Biochem.Cell. Biol.** 27:1175–1181. 1995.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. (Eds) In: **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca, New York: Cornell University Press., v. 2, p.687-689, 2004.
CHANDRA, J., SAMALI, A., ORRENIUS, S. Triggering And Modulation Of Apoptosis By Oxidative Stress. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 29, Nos. 3/4, pp. 323–333, 2000.

CHANG. H.Y., YANG, X. Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**. Vol. 64, No. 4, p. 821–846. 2000.

CLARKE, P. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat. Embryol.** 181, 195-213. 1990.

COSTA, H.C., BÉRNILS, R.S. (org.). **Répteis brasileiros: Lista de espécies 2018**. Herpetologia Brasileira - 4(3):75-93. Disponível em <<http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2014.03-07-MudancasTaxonomicas.pdf>>. Acesso em 01/12/2018.

DILLER, L.V., WALLACE, R.L. Reproductive biology of the northern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis oreganus*) in northern Idaho **Herpetologica**, 40, 182-193.1984.

DJAVAHERI-MERGNY, M., MAIURI, M. KROEMER, G. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. **Oncogene**, 29, 1717–1719. 2010.

DREVNICK, P.E., SANDHEINRICH, M.B., ORIS, J.T. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. **Aquat Toxicol.** 79:49–54.2006.

- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, 82: 47–95. 2002.
- DUARTE, M. R., PUORTO, G.; FRANCO, F.L. A biological survey of the pitvipers *Bothrops insularis* Amaral (Serpentes, Viperidae): an endemic and threatened offshore island snake of southeastern Brazil. **Studies of Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, p. 1–13, 1995.
- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. Biology of amphibians. **John Hopkins University press**, Baltimore. 1986.
- EDWARDS, A., JONES, S.M., DAVIES, N.W. A possible alternative to 17 β -estradiol in a viviparous lizard, *Tiliqua nigrolutea*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 129, 114–121. 2002.
- ESSERS, M.A.G. et al. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. **EMBO J**, 23: p.4802–4812. 2004.
- FALNES, P.O., KLUNGLAND, A., ALSETH, I. Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. **Neuroscience**, 145: 1222–1232. 2007.
- FECHER B, LAKSHMI S, CHEH C Ti, et al., Expansion and preservation of multipotentiality of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells in dextran-based microcarrier spin culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v 22, nº5, p 1343–1356, 2009.
- FENWICK, A. M., GUTBERLET, R. L., EVANS, J. A. AND PARKINSON, C. L., et al. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 156, p. 617–640, 2009.
- FENWICK, M.A., HURST, P.R. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: Growth and atresia of small follicles. **Reproduction** 124:p. 659–665. 2002.
- FITCH, HS. Reproductive cycles in lizards and snakes. **Univ Kansas Mus Nat Hist Misc Publ** 52:1–247.1970.
- FREITAS, M.A. de. **Serpentes da Bahia e do Brasil**. Editora Dall, Bahia, Brasil. p.79. 1999.
- GALLUZZI, L., VITALE, I., AARONSON, S. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ** 25, 486–541. 2018.
- GODFRAY, H.C.J., PARTRIDGE, L., HARVEY, P.H. Clutch size. **Ann. Rev. Ecol.** 22: 409–429. 1991.
- GRAZZIOTIN, F.G., MONZEL, M., ECHEVERRIGARAU, S., BONATO, S.L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past

fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Mol. Ecology**, 15, 3969–3982. 2006.

GREGORY, P.T., LARSEN, K.W., FARR, D.R. Snake litter size = live young + dead young + yolks. **Herpetol. J.** 2: 145-146. 1992.

GUPTA, S.K., GILBERT, A.B., WALKER, M.A. Histological study of follicular atresia in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). **J Reprod Fertil** 82:p. 219–225. 1988.

GURAYA, S. S. A histochemical study of follicular atresia in the snake ovary. **J. Morphol.**, 117: 151–169. 1965.

GURAYA, S.S. A histochemical study of the rhesus monkey ovary. **Acta Morphol Neerl Scand.** 6(4):395-406. 1966.

GURAYA, S.S. Histochemical observations on the corpora atretica of amphibian ovary. **Gen. Comp. Endocr.** 12(1): 165-167. 1969.

GURAYA, S.S. Follicular atresia. Proceedings of the Golden Jubilee Symposium on Perspectives in Reproductive Physiology of the Female, **Proc. Indian Natl. Sci. Acad., Delhi University.** 3 (39b): 311-332. 1973.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature.** 407:770-776. 2000.

HERMES-LIMA, M., ZENTENO-SAVIN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress, **Comp. Biochem. Physiol. C** 133:537–556. 2002.

HO, S.M. Vitellogenesis. In: K.T. Pang, M.P. Schreibman (Eds.), **Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications**, Academic Press, San Diego. 91-126. 1991.

HOGUE, R. A, H. E. BELLUOMINI, G. SCHREIBER, AND A. M. PENHA. Sexual abnormalities in *Bothrops insularis*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 29, p.17–88, 1959.

HOGUE, A. R., Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes, Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, 32:109-184. 1966.

HSUEH, A.J.W., BILLIG, H., TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocr. Rev.** 15: p. 1–18. 1994.

HUGHES, F.M., GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology.** 129: 2415–22. 1999.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Hum Reprod Update** 11,162–177. 2005.

IUCN. International Union for Conservation of Nature, Red List of Threatened Species. Available at: www.iucnredlist.org. (Accessed: 02 Dezembro 2019). 2019.

JANEIRO-CINQUINI, T.R.F., RIBOLLA, P.E.M., DE L. CAPURRO, M., WINTER, C.E. Vitellogenin and yolk protein processing in *Bothrops jararaca* (Wied), a tropical venomous snake. **Comp Biochem Physiol** 122B: 189–198. 1999.

JANEIRO-CINQUINI, T.R.F. Capacidade reprodutiva de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). **Iheringia, Série Zoologia** 94(4):429-431, 2004.

JANZ, D.M., MCMASTER, M.E., WEBER, L.P., MUNKITTRICK, K.R., VAN DER KRAAK, G. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent. **Can J Fisher Aquat Sci.** 58, 620–625. 2001.

JI, X; LIN, C.X.; LIN, L.H.; et al. Evolution of viviparity in warm-climate lizards: an experimental test of the maternal manipulation hypothesis. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 20 (3), p. 1037–1045. 2007.

JIANG, J.Y., CHEUNG, C.K., WANG, Y &, TSANG, B.K. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. **Front Biosci**, v.8, p. 222-237, 2003.

JONES, R.E. **Control of follicular selection**. In: The vertebrate ovary: comparative biology and evolution, p. 827-840. Jones, R.E., Ed, Plenum press, New York. 1978.

JUNQUEIRA L.C.V., BIGNONAS G. & BRETAN R.P. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in the tissue sections. **Histochem. J.**, v 11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9ª. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1999.

KAIPA, A. HSUEH, A. J. W. Regulation of ovarian follicular atresia. **Annu Rev Physiol**, v. 59, p. 349-363, 1997.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**.27:137-138. 1965.

KELEKAR, A. Autophagy. **Ann NY Acad Sci.** 1066:259-271. 2005.

KUMAR, M., PATHAK, D., KRIPLANI, A., AMMINI, A. C., TALWAR, P., AND DADA, R. Nucleotide variations in mitochondrial DNA and supraphysiological ROS levels in cytogenetically normal cases of premature ovarian insufficiency. **Arch Gynecol Obstet.** 282 (6), 695-705. 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. 9º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 928p. 2013.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Rio de Janeiro: EDUR.198p. 1997.

KYRYLKOVA, K., KYRYACHENKO, S., LEID, M., KIOUSSI, C. Detection of Apoptosis by TUNEL Assay. In: Kioussi C. (eds) **Odontogenesis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**, Humana Press. 887:41-47. 2012.

LACK, D. The significance of clutch size. **Ibis** 89: 309-352. 1947.

LACK, D. **The natural regulation of animal numbers**. Clarendon, Oxford. 1954.

LAMPERT, K.P. Facultative parthenogenesis in vertebrates: reproductive error or chance? **Sexual Development** 2: p. 290–301. 2008.

LI, Y.; WATKINS, B.A. Analysis of fatty acids in food lipids. In **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**; John Wiley & Sons: New York, p D1.2.1–D1.2.15. 2001.

LILLYWHITE, H.B. Subcutaneous compliance and gravitational adaptation in snakes. **Journal of Experimental Zoology**. v.267 (6): p.557-562. 1993.

LIRA-DA-SILVA, R.M., CASAIS-E-SILVA, L.L., QUEIROZ, I.B., Nunes, T.B. Contribuição à biologia de serpentes da Bahia, Brasil. 1. Vivíparas. **Rev. Brasil. Zool.** 11 (2): 187-193. 1994.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; MISE, Y.F.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; ULLOA, J.; HAMDAN, B. & BRAZIL, T.K. Serpentes de Importância Médica do Nordeste do Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, 79:7-20, 2009.

MADSEN, T., UJVARI, B., SHINE, R., OLSSON, M. Rain, rats and pythons: climate driven population dynamics of predators and prey in tropical Australia. **Austral Ecology** 31:30–37. 2006.

MADSEN, T., SHINE, R. Temporal variability in sexual selection acting on Reproductive tactics and body size in male snakes. **American Naturalist**, 141. p. 167-171. 1993.

MANABE, N., GOTO, Y., et al Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. **J Reprod Dev** 50: p. 493–514. 2004.

MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A.; SAZIMA, I. **Serpentes da Mata Atlântica: Guia Ilustrado para Serra do Mar**. Ribeirão Preto: Holos, v. 1, p.184, 2001.

MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M. & SAZIMA, I. A jararaca da Ilha da Queimada Grande. **Ciência Hoje**, v. 31, p. 56-59, 2002a.

MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M. & SAZIMA, I. A new insular species of pitvipers from Brazil, with comments on evolutionary and conservation of the *Bothrops jararaca* group. **Herpetologica**, v. 58, p. 303-312, 2002 b.

- MARQUES, O.A.V.; KASPEROVICZUS, K.; 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, p. 529-538, 2001.
- MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V. & SAZIMA, I. Ecological and Phylogenetics Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers of the Genus *Bothrops*. In: 54 **Biology of the vipers**. Schuett, G., Höggren, M., Douglas, M. E., Greene, H. W. (Org.). Eagle Mountain Publishing, L.C., p. 307-328, 2002.
- MARTINS, M., R. J. SAWAYA, AND O. A. V. MARQUES. A first estimate of the population size of the critically endangered lancehead, *Bothrops insularis*. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, p. 168–174, 2008.
- MASCHIO, L. R. **Ciclo Celular: controle e Mecanismos de Divisão**. Disponível em: <<http://slideplayer.com.br/slide/3524606/>> 2015.
- MATHIES, T. 2011. Reproductive cycles of tropical snakes. In: Aldridge, R.D. & Sever, D.M. (eds). **Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes**, Enfield: Science Publishers. p. 511-550. 2011.
- MATSUDA-MINEHATA, F., INOUE, N., GOTO, Y., MANABE, N. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. **J Reprod Dev**. 52(6): p. 695-705, 2006.
- MCEACHERN, M. J. **Keeping and breeding corn snakes. Advanced Vivarium Systems**, Lakeside. pp. 60. 1991.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Málaque, C.M.S., Haddad Jr, V. (Eds.), **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Sarvier, pp. 42-70. 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2017. Acidentes por Animais Peçonhentos - Serpentes. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/profissional/area.cfm?id_area=1539. Acesso em: 04/06/2019.
- MISE, Y.F.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; CARVALHO, F.M. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40, p. 569–573. 2007.
- MOOI, W.J., PEEPER, D.S. Oncogene-induced cell senescence -halting on the road to cancer. **N Engl J Med**.355:1037-1046. 2006.

MORAIS, R.D.V.S et al. Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. **Cell and Tissue Research**. v.347 (2), p. 347- 467. 2012.

MURDOCH, W. J. Inhibition by oestradiol of oxidative stress-induced apoptosis in pig ovarian tissues. **J. Reprod. Fertil.**, 114, 127–130. 1998.

MURPHY, J.B., BARKER, D.G., TRYON, B.W. Miscellaneous Notes on the Reproductive Biology of Reptiles. 2. Eleven Species of the Family Boidae, Genera *Candoia*, *Corallus*, *Epicrates* and *Python*. **Journal of Herpetology**. 12(3): 385-390. 1978.

MURPHY, B.F.; THOMPSON, M.B. A review of the evolution of viviparity in squamate reptiles: the past, present and future role of molecular biology and genomics. **Journal of Comparative Physiology B**, 181, p. 574-594, 2011

NAKAJIMA, K. Avaliação do ciclo celular de células tronco progenitora hematopoiéticas da célula óssea de camundongos. **Tese de doutorado**. Faculdade de Ciência farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2010.

NAULLEAU, G., BONNET, X. Body condition threshold for breeding in a viviparous snake. **Oecologia** 107:301–306. 1996.

NOGUEIRA, C; SAWAYA, R.J., MARTINS, M. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, 37:653-659. 2003.

NORRIS, D.O., LOPEZ, K.H. (Eds). Follicular Atresia. In: Hormones and Reproduction of Vertebrates. Burlington, USA. **Elsevier Science**. (4):151-158. 2010.

NUSSBAUM, R. The Brahminy blind snake (*Ramphotyphlops braminus*) in the Seychelles archipelago: distribution, variation, and further evidence for parthenogenesis. **Herpetologica** 36: 215–221. 1980.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**. 1979;95:351–8.

PILZ, J., MEINEKE, I., GLEITER, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 55 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **J. of Chromatography B**, 742, 315–325. 2000.

PIZZATTO, L., ALMEIDA-SANTOS, S.M., MARQUES, O.A.V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In: Nascimento LB, Oliveira ME (eds.). **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia. 201-221. 2007.

PORTO, M.; TEIXEIRA, D.M. Geographic distribution: *Bothrops leucurus* (White-tailed lancehead). **Herpetological Review** 26, 156. 1995.

PUERTO, G., SALOMÃO, M G., THEAKSTON, R.D.G., et al. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries:

phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). **J . Evol. Biol.** 14, 527-538. 2001.

REYNOLDS, R.G. BOOTH, W. et al. Successive virgin births of viable male progeny in the checkered gartersnake, *Thamnophis marciatus*, **Biol. J. of the Linnean Society**, V.107, (3), p. 566–572. 2012.

RODGERS, R.J., IRVING-RODGERS, H.F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Reproduction** 139: p. 309–318. 2010.

RONNE, J. Revelations of a boa breeder. **Reptiles** 4:24–43. 1996.

SARASTE, A.; POLKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v 45 (3), p. 528–537, 2000.

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in Southeastern Brazil. In: Campbell JA, Brodie ED (eds) **Biology of the pitvipers**. Selva Publ, Tyler, Texas, p.199-216, 1992.

SCHAFFER, K.A. The cell cycle: a review **Vet. Pathol.** 35:461-478. 1998.

SHAPIRO, H.M. Estimation of Membrane Potencial by Flow Cytometry. In: (ED.). **Book title**: John Wiley & Sons, Inc, 2001.

SHAPIRO, H.M. **Practical Flow Cytometry**. New Jersey: Wiley-Liss. 2003 681p.

SHINE, R. "Costs" of reproduction in reptiles. **Oecologia** (Berl.) 46: 92-100, 1980.

SHINE, R. Sexual size dimorphism in snakes revisited. **Copeia**. 325-346. 1994.

SHINE, R. Life-history evolution in reptiles. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 36:23–46. 2004.

SILVA, K.M.P; SUEIRO, L.R.; et al. Reprodução de *Bothrops* spp. (Serpentes, Viperidae) em criadouro conservacionista. **Veterinária e Zootecnia** 20(4): 632-642. 2013.

STEWART, J.R. Placental specializations in lecithotrophic viviparous squamate reptiles. **J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)** 324B: 549–561, 2015.

STORZ, P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal.** 14, p. 593-605. 2011.

SURAI, P.F. Natural Antioxidants in **Avian Nutrition and Reproduction**. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 305-306. 2002.

TAKAGI, K., YAMADA, T., MIKI, Y., UMEGAKI, T., NISHIMURA, M., SASAKI, J. Histological observation of the development of follicles and follicular atresia in immature rat ovaries. **Acta Med Okayama** 61:283–298. 2007.

TAYLOR, E.N., DENARDO, D.F. Sexual size dimorphism and growth plasticity in snakes: an experiment on the Western Diamond-backed Rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Reproductive Biology**. V. 303A:(7), p. 598-607. 2005.

TETA, C., NAIK, Y.S. Vitellogenin induction and reduced fecundity in zebrafish exposed to effluents from the City of Bulawayo, Zimbabwe. **Chemosphere**, 167,282-290. 2017.

THOMPSON M.B., SPEAKE, B.K. Egg morphology and composition. In: Deeming DC (ed) **Reptilian incubation: environment, evolution and behaviour**. Nottingham University Press, Nottingham. 45–74. 2004.

TILLY, J.L., KOWALSKI, K.I., JOHNSON, A.L., HSUEH, A.J. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. **Endocrinology**. 129,2799-801. 1991. 56

TRAUTH, S.E. Ovarian cycle of *Crotaphytus collaris* from Arkansas with emphasis on corpora albicantia, follicular atresia, and reproductive potential. **J. Herpetol**.

TROTTER, J. WINMDI©. Version 2.8. La Jolla: The Scripps Research Institute, 2000. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 10 setembro 2018.

UETZ, P. et al. (eds.) **The Reptile Database**. Disponível em < <http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser>>. Acesso em 04/11/2018

VASKIVUO, T.E., TAPANAINEN, J.S. Apoptosis in the human ovary. **Reprod Biomed Online**, 6: p. 24–35. 2003.

VINEGAR, A. Evolutionary implications of temperature induced anomalies of development on snake embryos. **Herpetologica**. 30, p. 72–74. 1974.

WAGLER, J. **Serpentum brasiliensium species novae...** Franc. Seraph. Hubschmann, Monachii. 1824.

WATTS, P.C.; et al. Parthenogenesis in Komodo dragons. **Nature**. 444(7122). p. 1021–1022. 2006.

WEAVER, B.A., CLEVELAND, D.W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell**.8:7-12. 2005.

WILLIAMS K, MOTIANI K, GIRIDHAR PV, KASPER S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. **Exp Biol Med** (Maywood) 238:324–338. 2013.

WYLLIE, A.H. Apoptosis: cell death in tissue regulation. **J. Pathol**. 153:313–316. 1987.

WÜSTER, W., GOLAY, P., WARREL, D.A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics **Toxicon**, 35 (3) pp. 319-340. 1997.

WÜSTER, W., M. G. SALOMÃO, G. J. DUCKETT, R. S. THORPE, AND BBBSP. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the *Bothrops atrox* species complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Kaupia** 8: 135-144. 1999.

WÜSTER, W. et al. Butantan-British *Bothrops* systematics project. Origin and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence data. In: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.), **Biology of the Vipers**. Salt Lake City,: Eagle Mountain Publishing, p.111-128. 2002.

WÜSTER, W., DUARTE, M.R., SALOMÃO, M.G. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. **Journal of Zoology** 266:1–10. 2005.

YAN, X., TANG, X., YUE, F., ZHANG, D., et al. Influence of ambient temperature on maternal thermoregulation and neonate phenotypes in a viviparous lizard, *Eremias multiocellata*, during the gestation period. **Journal of Thermal Biology**. 36, p. 187–192. 2011.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, **Physiol. Rev.** 74:139–162. 1994.

YU, S.P., CHOI, D.W. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA**.97:9360-9362. 2000.

ZIEGLER, U., GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**.19:124-128. 2004.