KALENA BARROS DA SILVA

**Avaliação de técnicas de diluição, preservação seminal e inseminação artificial
em jararacas-ilhoas (*Bothrops insularis*)**

SÃO PAULO

2018

KALENA BARROS DA SILVA

**Avaliação de técnicas de diluição, preservação seminal e inseminação artificial
em jararacas-ilhoas (*Bothrops insularis*)**

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 a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Selma Maria Almeida Santos

SÃO PAULO

2018

ERRATA

SILVA, K. B. **Avaliação de técnicas de diluição, preservação seminal e inseminação artificial em jararacas-ilhoas** (*Bothrops insularis*). 2018. 73 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Página	Onde se lê	Leia-se
Resumo	71 f.	73 f.
Abstract	71 f.	73 f.

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. 3704
FMVZ

Silva, Kalena Barros da
Avaliação de técnicas de diluição, preservação seminal e inseminação artificial em
jararacas-ilhoas (*Bothrops insularis*) / Kalena Barros da Silva. – 2018.
73 f. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Almeida Santos.

1. Répteis. 2. Serpentes. 3. Reprodução. 4. Espermatozoide. 5. Conservação. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE DILUIÇÃO, PRESERVAÇÃO SEMINAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM JARARACAS-ILHOA (*Bothrops insularis*)", protocolada sob o CEUA nº 2530180714 (00.001566), sob a responsabilidade de **Selma Maria de Almeida Santos** e equipe; Kalena Barros da Silva; Ricardo José Pereira Garcia - 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 19/08/2015.

We certify that the proposal "EVALUATION OF DILUTION TECHNIQUES, SEMINAL PRESERVATION AND ARTIFICIAL INSEMINATION IN GOLDEN LANCEHEAD PITVIPERS (*Bothrops insularis*)", utilizing 28 Reptiles (16 males and 12 females), protocol number CEUA 2530180714 (00.001566), under the responsibility of **Selma Maria de Almeida Santos** and team; Kalena Barros da Silva; Ricardo José Pereira Garcia - 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 08/19/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 2014 a 2016

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

Origem:

Espécie: **Répteis**

sexo: **Machos**

Idade: **a**

N: **16**

Linhagem: **Bothrops insularis**

Peso: **a**

Origem:

Espécie: **Répteis**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **a**

N: **12**

Linhagem: **Bothrops insularis**

Peso: **a**

Local do experimento:

São Paulo, 16 de setembro de 2018

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

São Paulo, 04 de setembro de 2018

CEUA N 2530180714

Irmô(s). Sr(a).

Responsável: Selma Maria De Almeida Santos

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE DILUIÇÃO, PRESERVAÇÃO SEMINAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM JARARACAS-ILHOA (Bothrops insularis)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 002790)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 14/agosto/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Vimos por meio desta emenda fazer as seguintes solicitações: 1- Alteração do título da tese de "Determinação de técnicas de diluição e resfriamento do sêmen para inseminação artificial em Bothrops insularis mantidas em cativeiro" para "AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE DILUIÇÃO, PRESERVAÇÃO SEMINAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM JARARACAS-ILHOA (Bothrops insularis)", pois acreditamos que desta forma estará melhor adequado aos experimentos realizados e à conclusão do trabalho de maneira geral. 2- Inclusão de cinco (5) animais ao N experimental de machos, que era de 16 animais, e agora é de 21 animais, tendo vista que alguns dos animais que já participavam do N experimental vieram a óbito e que estes cinco novos animais não haviam ainda entrado na maturidade sexual, condição essencial para participação neste trabalho, razão pela qual ainda não haviam entrado no experimento. Ressaltamos que os animais incluídos estão alojados no mesmo biotério, sob as mesmas condições de manutenção e possuem a mesma licença SISBIO (nº25650-3) dos outros animais."

Comentário da CEUA: "Foi solicitado Alteração do título da tese de "Determinação de técnicas de diluição e resfriamento do sêmen para inseminação artificial em Bothrops insularis mantidas em cativeiro" para "AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE DILUIÇÃO, PRESERVAÇÃO SEMINAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM JARARACAS-ILHOA (Bothrops insularis)", para melhor adequação aos experimentos realizados e à conclusão do trabalho de maneira geral, e a Inclusão de 5 machos que entraram em maturidade sexual, substituindo outros 5 que vieram a óbito."

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: SILVA, Kalena Barros

Título: **Avaliação de técnicas de diluição, preservação seminal e inseminação artificial em jararacas-ilhoas** (*Bothrops insularis*)

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 a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a).: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a).: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a).: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a).: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a).: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais. Marlene, que todos os dias me ensina o significado do que é o amor, do que é ser mãe e do que é ser mulher. Nela encontro meu porto seguro, meu refúgio e minha amiga mais leal. Antônio Carlos, minha base e minha referência. Agradeço pelo apoio, incentivo, zelo e carinho constantes em toda minha vida. Vocês são exemplo para todos os pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cada dia, por cada oportunidade, por cada bênção e livramento dados a mim e a todos aqueles que amo. Graças a Ele foi possível chegar até aqui.

À minha querida orientadora e amiga Dra. Selma Almeida Santos, por ter acreditado e confiado em mim ao longo de quase uma década de parceria. Pelo carinho e pelo cuidado sempre demonstrado desde que eu cheguei “pequeninha” no Butantan. Que essa parceria nunca tenha fim e que venham muitos outros trabalhos!

Aos Profs. Drs. Ricardo Pereira e Marcílio Nichi pela orientação e colaboração fundamental no delineamento e execução desse trabalho. Pelo tempo e recursos investidos e por terem aberto seus laboratórios e colaborado com sua equipe em toda parte experimental. MUITÍSSIMO obrigada, esse trabalho também é de vocês!

Ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP por ter recebido tão bem as cobrinhas! Em especial a equipe do LA e GEMA pela prontidão no auxílio com os experimentos! Sem a ajuda de vocês nada disso teria sido possível! E Diego, muitíssimo obrigada pela super ajuda com a famigerada estatística!

Ao Diego, Dri e Kelly pela parceria e colaboração indispensáveis nas análises, coletas e no manejo com os animais! Pela seriedade e comprometimento que tiveram ao longo de todo esse trabalho, e também por deixarem tudo mais leve e divertido! Muito obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar sem reclamar (muito)!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos animais domésticos e silvestres, a FMVZ e a USP e todo corpo de professores e funcionários que compõe esse programa acolhedor e diversificado que dá suporte a pesquisas e sonhos como este.

A CAPES, pela bolsa que me foi concedida, subsidiando esta pesquisa e por estar subsidiando tantas outras. Espero que nossos governantes reconheçam a importância de fundações como esta, que fomentam o desenvolvimento científico, social e econômico do nosso país.

Aos meus amigos queridos do LEEV! Miguel, pela disposição infalível na ajuda com os bichos, Kaka pela ajuda nas análises e considerações muito enriquecedoras e Rafa, pelo incentivo e por sempre estar disposta a ouvir e discutir as coisas mais mirabolantes. E se não bastasse tudo isso, agradeço ainda pela amizade e apoio que nunca falharam ao longo de todos esses anos de Butantan!!

Ao Giuseppe Puerto, Diretor do Museu Biológico do Instituto Butantan, por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar com o que amo e por acreditar e incentivar meu desenvolvimento profissional e científico! Muito obrigada!

Á Circe, pela enorme ajuda com a formatação da tese!!!! Obrigada pela dedicação e atenção a cada detalhe! Pela ajuda, paciência e compreensão na reta final desse trabalho! Valeu meixmo!

As queridas do Museu Biológico, Sil, Dan, Hana, Rô e Rê, obrigada pelo trabalho em equipe, pelo apoio e compreensão ao longo dessa jornada! E a toda a equipe do Museu, obrigada pelo apoio!

À Bianca, pelo companheirismo sistemático! Pelo apoio e incentivo cotidianos! Pela convivência leve e harmoniosa que enche meus dias de amor e alegria! Pela energia boa e contagiante e pelo cuidado em todos os momentos, e principalmente, pela paciência nessa reta final! <3

A todos colegas do GERES, pela companhia e incentivo nessa jornada. Pelo conhecimento gerado e compartilhado dentro e fora do nosso grupo! Desejo ao GERES todo sucesso reprodutivo do mundo!

A todos os funcionários e colaboradores que fazem o LEEV funcionar, por manterem e sustentarem esse laboratório onde tenho desenvolvido minha pesquisa desde que cheguei a São Paulo. Espero que nosso laboratório, nossa linha de pesquisa e nosso trabalho nunca pare de crescer e seja cada vez mais reconhecido social e cientificamente!

A todos que contribuíram, incentivaram e acreditaram neste trabalho. Muito obrigada!

“Quando promovemos o empoderamento das mulheres, estamos promovendo uma série de mudanças. A luta é constante e diária, e começa com um NÃO. Não calar, não aceitar, não abaixar a cabeça. Não podemos esquecer de onde tudo começa: dentro de cada um de nós!”

Flávia Queiroz

RESUMO

SILVA, K. B. **Avaliação de técnicas de diluição, preservação seminal e inseminação artificial em jararacas-ilhoas (*Bothrops insularis*)**. [Semen preservation and artificial insemination protocols in golden lancehead (*Bothrops insularis*)]. 2018. 71 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2018.

A jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) é uma serpente endêmica e criticamente ameaçada de extinção que atualmente possui uma população estimada de 2.100 indivíduos restritos a uma única ilha no Estado de São Paulo, a Ilha da Queimada Grande. Esta vulnerabilidade levou à criação de um programa de reprodução em cativeiro para a espécie que, entre outras ações, propõe o desenvolvimento e aplicação de biotécnicas reprodutivas, tais como avaliação e preservação seminal e inseminação artificial. Este trabalho teve como objetivos: (1) avaliar três diluidores (HAM F-10, ACP-120® e BWW) em três diluições diferentes (1:100, 1:200 e 1:500 µL) e determinar qual o melhor protocolo de incubação para o sêmen de *B. insularis*; (2) avaliar um protocolo de inseminação artificial na espécie e (3) avaliar três diferentes sistemas de refrigeração (geladeira, banho-maria em geladeira e isopor tipo BotuFLEX®) a fim de determinar qual deles é capaz de preservar melhor a motilidade do sêmen da jararaca-ilhoa por um período de até 48 h. Verificamos que as amostras de sêmen diluídas com o meio HAM F-10 na diluição 1:100 µL apresentaram os melhores resultados para motilidade e motilidade progressiva e, desta forma, foi o protocolo de diluição seminal eleito para a inseminação artificial realizada. O protocolo de inseminação artificial foi realizando de maneira segura e minimamente invasiva nos animais, no entanto, até o momento não houve detecção de prenhez nas fêmeas inseminadas. A refrigeração se mostrou um método eficiente para a manutenção da motilidade e motilidade progressiva do sêmen de *B. insularis* por até 48 h pois, no período de duração do experimento, não foi verificada queda significativa nos parâmetros avaliados em nenhum dos sistemas de refrigeração. Foi observada, ao longo deste trabalho, uma alta incidência de decapitações nos espermatozoides de boa parte dos machos, o que pode comprometer seriamente a

fertilidade do plantel estudado. Acreditamos, com os resultados deste projeto, ter elucidado questões fundamentais acerca do melhor diluidor e diluição a ser utilizada na manipulação do sêmen de *B. insularis*, assim como ter demonstrado que protocolos de refrigeração seguros e versáteis são capazes de manter a motilidade seminal por até 48 h, permitindo a troca de material genético entre diferentes plantéis no Brasil ou até mesmo com a população nativa da Ilha da Queimada Grande. O conhecimento gerado a partir deste estudo também servirá como base para estudos que visem o estabelecimento e aprimoramento de outras biotécnicas reprodutivas e a criação, em um futuro breve, de um banco de germoplasma da espécie.

Palavras-chave: Répteis. Serpentes. Reprodução. Espermatozoide. Conservação.

ABSTRACT

SILVA, K. B. **Semen preservation and artificial insemination protocols in golden lancehead** (*Bothrops insularis*). [Avaliação de técnicas de diluição, preservação seminal e inseminação artificial em jararacas-ilhoas (*Bothrops insularis*)]. 2018. 71 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2018.

The golden lancehead (*Bothrops insularis*) is a venomous pitviper endemic from Ilha da Queimada Grande, a small island located 40 miles off the coast of southeastern Brazil. Due to its small population (about 2000 individuals), highly restricted range, continuous decrease in habitat quality and illegal trading, *B. insularis* is currently listed as critically endangered in the IUCN Red List. As a consequence, efforts have been directed towards the development of a captive breeding program that involves both natural and assisted reproduction. Nonetheless, successful application of assisted reproductive technologies such as artificial insemination and semen cryopreservation in *B. insularis* requires a clear understanding of the reproductive physiology of this species, particularly aspects of sperm quality and production, and conservation. Thus, this study aims on: (1) determining which extenders (ACP-120, BWW and HAM-F10) and dilutions are better suited for maintenance of sperm motility; (2) testing an artificial insemination protocol in *B. insularis* maintained in captivity; (3) evaluating three different cooling systems (refrigerator, water bath on refrigerator and BotuFLEX®) to determine which one is able to preserve the semen motility of the golden lancehead for a period up to 48 hours. We found that semen samples diluted with HAM F-10 medium at a 1: 100µL dilution had the best motility and progressive motility results. To date, no pregnancies have been detected in inseminated females. Therefore, further studies and the improvement of this protocol for the species are required. We observed that all three cooling methods work successfully, maintaining the motility and progressive semen motility without significant changes for 48h, which demonstrates versatility in the preservation and transportation of this material, including from field work. With our results, we have elucidated fundamental questions about both the best diluent and dilution to be used, as well as refrigeration systems that ensure the maintenance of semen motility up to

48 hours. This is crucial for allowing the exchange of genetic material between different Brazilian Institutions and the income of material from Ilha da Queimada Grande, what may minimize problems due to consanguinity, besides serving as a basis for future studies on seminal cryopreservation protocols and the creation of germplasm banks.

Key words: snakes, reproduction, preservation, semen, reptile.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DE DILUIDORES E TAXA DE DILUIÇÃO PARA PRESERVAÇÃO SEMINAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM <i>Bothrops insularis</i>	20
2.1	INTRODUÇÃO	20
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.3	RESULTADOS.....	26
2.4	DISCUSSÃO.....	30
3	CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE REFRIGERAÇÃO PARA PRESERVAÇÃO SEMINAL EM <i>Bothrops insularis</i>	36
3.1	INTRODUÇÃO.....	36
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.3	RESULTADOS.....	42
3.4	DISCUSSÃO.....	50
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO: Short-term cold storage of seminal samples of the golden lancehead pitviper (<i>Bothrops insularis</i>).....	65

1 INTRODUÇÃO GERAL

A jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) é uma serpente endêmica da Ilha da Queimada Grande, situada a 30 km da costa sul do estado de São Paulo, próxima aos municípios de Itanhaém e Peruíbe. Considerada uma espécie criticamente ameaçada de extinção segundo a *IUCN Red List of Threatened Species* (MARQUES et al., 2004), estima-se que existam aproximadamente 2.100 jararacas-ilhoas em vida livre, porém esta população pode sofrer uma acentuada diminuição devido à ação de traficantes que visam atender colecionadores e biopiratas (MARTINS et al., 2008).

O ciclo reprodutivo das jararacas-ilhoas é considerado sazonal e algumas estratégias reprodutivas, tais como estocagem de sêmen e corte e cópula outonal, são similares àquelas apresentadas por sua parente continental, a jararaca (*Bothrops jararaca*). As fêmeas apresentam a vitelogênese no outono/inverno, porém a ovulação e fertilização ocorrem somente na primavera, com a época de nascimento dos filhotes se estendendo desde a metade do verão até o início do outono (MARQUES et al., 2013). Os machos exibem espermatogênese a partir do início do outono, indo até a metade da primavera, época na qual as células germinativas começam a entrar em dormência, permanecendo assim até o final do verão (KASPEROVICZUS, 2009).

A anatomia do sistema reprodutivo de *B. insularis* é semelhante ao descrito para outras serpentes do gênero *Bothrops*. As fêmeas apresentam os ovários localizados próximos aos ovidutos, que possuem formato alongado e são contíguos às vaginas, presentes neste grupo em número par. Os ovidutos recebem e mantêm os embriões após a ovulação e fecundação e algumas de suas funções, dentre outras, são a placentação e a estocagem de espermatozoides (ALMEIDA-SANTOS; ORSI, 2002). Os machos possuem testículos ovoides localizados na cavidade celomática, e os ductos deferentes os ligam à papila genital localizada na cloaca, por onde o sêmen é liberado. Em machos de serpentes, os ductos deferentes são os locais de estocagem do sêmen (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004), e, diferente do que acontece em mamíferos, o epidídimo não participa do processo de maturação e estocagem dos espermatozoides (SEVER et al., 2002). Os répteis não possuem

uretra peniana, desta forma, o sêmen entra no trato reprodutor feminino percorrendo os sulcos presentes na superfície do órgão copulatório masculino, chamado de hemipênis, que também estão presentes em número par (VASSE, 1994).

Quando em cativeiro, grande parte dos animais selvagens exhibe taxas reprodutivas mínimas ou até mesmo inatividade reprodutiva, resultado das condições artificiais e/ou do manejo inadequado (SNYDER et al., 1996). De maneira semelhante, a eficiência reprodutiva das populações cativas de jararacas-ilhoas encontra-se longe de alcançar índices satisfatórios. Em um estudo realizado no laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, Almeida-Santos et al. (2017) observaram que 70% dos produtos das parturições de fêmeas cativas era constituído de ovos atrésicos, filhotes natimortos ou malformados, e apenas 30% eram filhotes viáveis. Em contraste, um levantamento semelhante com jararacas (*Bothrops jararaca*) em cativeiro verificou que 82,6% dos filhotes eram viáveis, ao passo que apenas 13,1% e 3,5% eram compostos por ovos atrésicos e natimortos, respectivamente (ALVES et al., 2000). Além disso, o estresse decorrente do cativeiro pode ocasionar algumas alterações no sistema reprodutivo, como prolapsos de hemipênis, já relatados nesta espécie (SILVA et al., 2013).

Outro obstáculo ao programa de reprodução em cativeiro da *B. insularis* é o baixo contingente de machos e fêmeas para manutenção da variabilidade genética da população cativa. Atualmente, o número de machos e fêmeas distribuídos em pouquíssimas instituições no Brasil é bem inferior ao mínimo necessário para minimizar problemas como perda de diversidade genética, depressão endogâmica, adaptações genéticas ao cativeiro e acúmulo de alelos deletérios (BALLOU et al., 2010). A inseminação artificial (IA), por exemplo, pode ser empregada tanto em projetos *in situ*, capturando fêmeas por um breve período para que sejam inseminadas, utilizando sêmen de machos de outras localidades ou até mesmo de cativeiro, ou ainda coletar sêmen de machos de vida livre e inseminar fêmeas mantidas em cativeiro (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004).

A IA foi fundamental no sucesso de programas de conservação de aves selvagens, como é o caso do falcão-peregrino (HOFFMAN, 1998), da abetarda da Houbara (SAINT JALME et al., 1994) e do grou americano (ELLIS et al., 1996). O sucesso de programas como estes, sem dúvida, também foi sustentado por

sistemáticas pesquisas multidisciplinares, envolvendo comportamento, genética, criação em cativeiro e clínica (ELLIS et al., 1996).

Por essa razão, o emprego de biotécnicas reprodutivas se mostra indispensável para a continuidade e sucesso de programas de conservação, possibilitando, a longo prazo, o intercâmbio de material genético das populações de jararacas-ilhoas *in situ* e *ex situ*.

Pesquisas sobre biotecnologias de preservação do sêmen vêm sendo realizadas ao longo do último século, tanto em espécies de interesse comercial quanto em espécies de interesse conservacionista, sempre movidas pela necessidade de se obter o máximo rendimento dos reprodutores pelo maior tempo possível e em diferentes épocas do ano. Seu objetivo principal, independente da espécie em questão, é prolongar a viabilidade *in vitro* e o poder fertilizante dos espermatozoides armazenados (FOOTE; PARKS, 1993).

Fitch (1960) foi pioneiro na colheita de sêmen em serpentes vivas por meio da compressão do terço final do animal, porém, frequentemente obtinha amostras contaminadas por fezes e urato. Nas décadas seguintes, métodos de colheita envolvendo massagens digitais, introdução de probes plásticas na cloaca, eletroejaculação e até a remoção cirúrgica dos ductos deferentes foram também investigados. Entretanto, devido à diversidade morfológica e reprodutiva (p. ex. conformação corporal, sazonalidade) presente no grupo, ainda não foi possível estabelecer um método que seja eficiente para todos os gêneros (MENGDEN et al., 1980; QUINN et al., 1989; TOURMENTE et al., 2007; ZACARIOTTI et al., 2007; TOURMENTE et al., 2011).

Para jararacas-ilhoas, Silva et al. (2015) utilizaram a técnica de massagem digital aliada à anestesia local, e obtiveram 80,5% de eficácia na colheita, conseguindo amostras viáveis de sêmen ao longo de todo o ano, o que possibilitou a descrição dos parâmetros seminais da espécie. Segundo os autores, a morfologia do o espermatozoide da jararaca-ilhoa segue o padrão geral de Squamata descrito por Oliver, Jamieson e Schelting (1996) e por Jamieson (1999), possuindo formato filiforme e dividido em três regiões: cabeça, peça intermediária e cauda. Sua cabeça é alongada, fina e possui formato pontiagudo, sendo ligeiramente curva. Em sua extremidade é possível visualizar o acrossoma (Figura 1)

Figura 1- Espermatozoide morfologicamente normal de *B. insularis*.

Fonte: SILVA et al., 2015

Segundo Hafez e Hafez (2004), a sobrevivência dos espermatozoides no plasma seminal é limitada somente a algumas horas. Para manter o sêmen viável por um período de tempo maior e para resfriá-lo e ou criopreservá-lo, faz-se necessária a adição de soluções protetoras. Os diluentes permitem ainda o aumento do volume total do ejaculado para sua distribuição adequada em doses inseminantes.

O primeiro estudo referente à conservação de espermatozoides de serpentes cita ser possível manter a motilidade espermática por até 96 h usando um meio de cultivo celular (McCoy modificado) a 5°C, ou obter 30% de células móveis após o descongelamento, porém, sem descrever detalhes dos protocolos utilizados. (MENGDEN et al., 1980). Outros meios diluidores já utilizados no sêmen de serpentes são: TL Hapes para *Pantherophis guttatus* (MATTSON et al., 2007), Ham F-10 para *Crotalus durissus* (ZACARIOTTI et al., 2007) e *Bothrops insularis* (SILVA et al., 2015), e Ham F-10 acrescido de albumina e Test Gema para *Pantherophis guttatus* (FAHRIG et al., 2007).

Generalizações no uso dos protocolos de preservação do sêmen parecem ser pouco aplicáveis em serpentes devido às diferenças interespecíficas nos espermatozoides e plasmas seminais. Essa heterogeneidade tem levado pesquisadores a investigar diluidores e protocolos específicos para cada espécie ou gênero a fim de maximizar o aproveitamento dos gametas preservados.

Assim, o objetivo desta proposta é testar e avaliar diferentes diluidores para o resfriamento do sêmen de jararacas-ilhoas, avaliar a aplicabilidade de um protocolo

de inseminação artificial na espécie e também testar diferentes sistemas de refrigeração visando a preservação seminal. Esperamos que o conhecimento gerado aqui sirva de base para o delineamento de planos de conservação que de reprodução que envolvam o uso de biotécnicas, contribuindo com o Plano Nacional de Ação para Conservação da Herpetofauna Insular Ameaçada de Extinção, no qual a jararaca-ilhoa está inserida. Pretendemos também contribuir com a criação de um banco de germoplasma e possibilitar futuramente a troca de material genético entre indivíduos da Ilha da Queimada Grande e instituições mantenedoras.

CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DE DILUIDORES E TAXAS DE
DILUIÇÃO PARA PRESERVAÇÃO SEMINAL E INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM *Bothrops insularis*

2 CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO DE DILUIDORES E TAXAS DE DILUIÇÃO PARA PRESERVAÇÃO SEMINAL E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM *Bothrops insularis*

2.1 INTRODUÇÃO

Em condições de cativeiro animais selvagens normalmente exibem taxas reprodutivas mínimas ou até mesmo inatividade reprodutiva, resultado das condições artificiais e/ou do manejo inadequado (SNYDER et al., 1996). Almeida-Santos et al. (2017) relatam que 70% dos produtos das parturições de fêmeas da jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) cativas eram constituídos de ovos atrésicos, filhotes natimortos ou malformados, e apenas 30% eram filhotes viáveis. Em contraste, um levantamento semelhante com jararacas (*Bothrops jararaca*) em cativeiro verificou que 82,6% dos filhotes eram viáveis, ao passo que apenas 13,1% e 3,5% eram compostos por ovos atrésicos e natimortos, respectivamente (ALVES et al., 2000).

O baixo contingente de machos e fêmeas para manutenção da variabilidade genética da população cativa é outro obstáculo ao programa de reprodução em cativeiro da *B. insularis*, por essa razão, o emprego de biotécnicas reprodutivas se mostra indispensável para a continuidade e sucesso de programas de conservação de espécies ameaçadas, como é o caso da jararaca-ilhoa. A inseminação artificial (IA), por exemplo, pode ser empregada tanto em projetos *in situ*, capturando fêmeas por um breve período para que sejam inseminadas, utilizando sêmen de machos de outras localidades ou até mesmo de cativeiro, ou ainda coletar sêmen de machos de vida livre e inseminar fêmeas mantidas em cativeiro (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004).

Em serpentes, o uso da IA ainda possui caráter experimental, e as informações sobre a aplicabilidade desta metodologia são ainda incipientes. A literatura aponta apenas três casos bem-sucedidos no uso da IA até o momento, que tiveram como modelo experimental as espécies *Thamnophis marciatus* (QUINN et al., 1989), *Pantherophis guttatus* (MATTSON et al., 2007; OLIVERI et al., 2018) e *Corallus hortulanus* (OLIVERI et al., 2018).

O processamento adequado e a preservação de amostras seminais são pré-requisitos fundamentais para o sucesso na aplicação de biotécnicas como a IA. Segundo Hafez e Hafez (2004), para manter o sêmen viável por um período de tempo maior e para resfriá-lo e/ou criopreservá-lo, faz-se necessária a adição de uma solução protetora, o diluidor, que permite ainda o aumento do volume total do ejaculado para sua distribuição adequada em doses inseminantes.

Já foram utilizados como diluidores para o sêmen de serpentes meios de cultura celular, como PBS (TOURMENTE et al., 2007), HAM F-10 para *Crotalus durissus* (ZACARIOTTI, 2008), HAM F-10 acrescido de albumina e Test Gema para *Pantherophis guttatus* (FAHRIG et al., 2007) e a solução TL Hepes também para *Pantherophis guttatus* (MATTSON et al., 2007). Dentre estes, o meio HAM F-10 se destaca por ter sido utilizado com bons resultados em *Bothrops insularis* (SILVA et al., 2015).

O meio BWW (BIGGERS et al., 1971) já foi extensivamente utilizado em mamíferos, como o garanhão (BROMFIELD et al., 2014) e em aves, como o periquito-australiano (SAMOUR et al., 1988) trazendo bons resultados, se tornando uma opção viável para testes em outras classes, como os répteis.

A busca por diluidores seminais alternativos e de baixo custo levou ao desenvolvimento de meios diluidores em pó à base de água de côco (ACP® - ACP Biotecnologia, Fortaleza, CE, Brasil), que já foram testados em diversas espécies domésticas e silvestres, obtendo resultados satisfatórios, segundo os autores, para cães (CARDOSO et al., 2005), suínos (TONIOLLI et al., 2010), macacos-prego (OLIVEIRA et al., 2010), cutias (SILVA et al., 2011), peixes (CARVALHO et al., 2014) e aves (RONDON et al., 2008). Como vantagens, o uso deste tipo de diluidor oferece a possibilidade de confecção segundo as características do sêmen da espécie em questão e a praticidade na preparação, pois o soluto precisa ser diluído somente em água destilada, facilitando o trabalho de campo.

Desta forma, visando maximizar o aproveitamento dos gametas masculinos e melhorar o índice de fecundidade da espécie, este trabalho teve como objetivos testar diferentes diluidores (HAM F-10, ACP-120 e BWW) afim de determinar o melhor protocolo para diluição seminal e testar um protocolo de inseminação artificial em *Bothrops insularis*.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Animais

Foram utilizados 21 machos e 12 fêmeas adultas e sexualmente maduros (comprimento rostro-cloacal (CRC) >435 e 555 mm, respectivamente) (MARQUES et al., 2013; SILVA et al., 2015) de *B. insularis*, mantidos no biotério da sede do Projeto de Conservação da Jararaca-ilhoa, localizado no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan (latitude 23°S). O biotério é mantido sob condições naturais de fotoperíodo e umidade, e a temperatura em cerca de 25°C com uso de climatizador. Os animais são mantidos em cativeiro desde outubro de 2009 (licença SISBIO n. 25650-1), acomodados individualmente em caixas plásticas transparentes (564 x 385 x 371mm) com tampa e laterais perfuradas, e forradas no piso com papelão corrugado. A dieta dos animais é composta de camundongos (*Mus musculus*) que são oferecidos em intervalos regulares de 30 dias, respeitando-se a proporção de 10 a 20% da massa do indivíduo. É fornecida água fresca *ad libitum*.

2.2.2 Coleta, processamento do sêmen e formação de *pools*

O sêmen foi colhido segundo metodologia de Silva et al. (2015) com modificações. Os animais foram contidos fisicamente em tubo plástico para a limpeza da região cloacal com soro fisiológico. Posteriormente, cada macho recebeu anestesia local na região pericloacal em quatro pontos distintos, visando o relaxamento e exposição da papila urogenital (Lidocaína 1%, 15 mg/kg, via subcutânea). Após aproximadamente 10 minutos, foi iniciada a coleta do sêmen com a realização de massagens na região ventral do terço final do indivíduo para que o sêmen fosse expelido. O mesmo foi colhido diretamente da papila genital com tubos capilares de vidro para micro-hematócrito. O sêmen colhido foi então acondicionado em microtubos de 0,2 mL para as devidas manipulações.

Para a realização do experimento referente ao teste de diluidores foi necessária a formação de *pools* de sêmen, tanto para evitar o efeito individual quanto para que o volume final de sêmen fosse suficiente para realizar o

fracionamento das amostras de acordo com os grupos experimentais. Desta forma, as amostras de sêmen de cada grupo formado por quatro indivíduos foram misturadas imediatamente após a coleta sem o acréscimo de nenhum diluidor, de maneira que se obtivesse um volume mínimo total de 7,0 μ L por *pool*.

2.2.3 Avaliação da motilidade seminal

Análise computadorizada do movimento espermático: As avaliações de motilidade total (MOT) e motilidade progressiva (MOT PROG) foram realizadas utilizando o CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer – CASA; Hamilton Thorne IVOS), no qual 7,0 μ L da amostra de sêmen são colocados entre lâmina e lamínula de vidro e inseridos no aparelho, que avaliará quatro campos aleatórios para obtenção da média dos parâmetros avaliados.

2.2.4 Inseminação artificial

Matrizes: Para a seleção das fêmeas que foram utilizadas neste experimento e posterior detecção e acompanhamento das gestações, as mesmas foram submetidas a exames ultrassonográficos. Para tanto, foram contidas fisicamente em tubo plástico transparente de modo que o terço médio e final do animal estivesse livre para passagem ventral e lateral do transdutor. Foi utilizado aparelho de ultrassonografia dinâmico, bidimensional – Modelo GE Logic Pro 100, com transdutor linear de frequência 7,5 MHz.

Reprodutores: Foi realizado espermograma nos machos do plantel e aqueles que possuíram motilidade seminal igual ou superior a 40% foram selecionados como reprodutores neste experimento. Após a coleta, o sêmen foi diluído de acordo com os resultados do Experimento 1 e sua motilidade foi avaliada subjetivamente em microscópio óptico sob aumento de 100x, considerando a porcentagem (0-100%) de células móveis no campo. Para as amostras dos reprodutores selecionados, foi retirada ainda uma alíquota (20,0 μ L) para avaliação da concentração espermática em câmara hemantimétrica de *Neubauer*.

Inseminação artificial: Após a contenção física da fêmea em tubo plástico, foi realizada a higienização da cloaca (soro fisiológico - solução de 0,9% de NaCl em água destilada) e o animal foi então posicionado em formato de “U”, mantendo a cabeça e cauda erguidas (Figura 2). Em seguida, foi introduzido um espéculo na cloaca a fim de permitir a visualização da entrada das vaginas, no interior das quais foi depositado o sêmen com o uso de uma pipeta. O animal permaneceu nesta posição por um período de 5 a 10 minutos afim de que houvesse a completa contração da cloaca, evitando assim o refluxo do material seminal.

Figura 2 - Inseminação artificial em *Bothrops insularis*.

Fonte: (PUORTO, G., 2016).

2.2.5 Delineamento Experimental

Foram realizados dois experimentos neste capítulo. O Experimento 1 teve como objetivo avaliar a influência do grau de diluição e do diluidor utilizado sobre a motilidade seminal de jararacas-ilhoas. Para isso, *pools* de sêmen compostos por quatro indivíduos (volume mínimo de 7,0 μL) foram divididos em três alíquotas, as quais foram diluídas utilizando cada um dos três diluidores a serem testados: HAM-F10 (Nutricel Nutrientes celulares Ltda, Campinas, SP, Brasil), ACP-120® (ACP Biotecnologia, Fortaleza, CE, Brasil) e BWW (BIGGERS et al., 1971), em três diferentes diluições (1:100, 1:200 e 1:500 μL) (Figura 3). Feitas as diluições, todas as amostras foram avaliadas quanto à sua motilidade (MOT) e motilidade progressiva (MOT PROG) por meio de um sistema computadorizado.

Figura 3 – Delineamento do experimento 1: Teste de diluidores e diluições para o sêmen de *B. insularis*.

Fonte: (SILVA, K. B., 2016).

O Experimento 2 teve como objetivo avaliar uma técnica de inseminação artificial em *B. insularis*. Para tanto, oito fêmeas sexualmente maduras foram inseminadas no período de cópula da espécie (março a agosto) (MARQUES et al., 2013). Os machos do plantel foram selecionados por possuir motilidade seminal igual ou superior a 40%. O sêmen dos reprodutores foi então coletado e diluído,

segundo os resultados do Experimento 1, para que fossem realizadas as inseminações com sêmen fresco.

2.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados com uso do programa do SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). A análise de interação entre os fatores diluidor e diluição foram realizadas por meio do PROC GLM. Além disso, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o teste LSD, tanto para comparar as diferentes diluições quanto os diferentes diluidores. O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram descritos através da média e erro padrão da média.

2.3 RESULTADOS

Em março de 2016, foram coletadas amostras de sêmen de 20 machos de *B. insularis* com CRC médio de $622 \pm 65,2$ mm (440-760 mm máximo-mínimo) e massa de $121,4 \pm 27,9$ g (37-158 g máximo-mínimo). O volume médio das amostras foi de $3,54 \pm 0,8$ μ L de sêmen, variando de 1,05 a 4,2 μ L. O sêmen de *Bothrops insularis* apresentou coloração variando de branca a levemente amarelada e consistência leitosa e espessa. Foram então formados cinco *pools* de sêmen, sendo cada *pool* constituído por amostras de quatro animais escolhidos aleatoriamente. O volume médio dos *pools* foi de 9,24 μ L e a concentração média foi de $0,3 \times 10^9$ spz/mL. Em seguida, cada *pool* foi dividido de acordo com os tratamentos experimentais já descritos (Figura 3).

2.3.1 Experimento 1 – Efeito do diluidor e da diluição na motilidade total e progressiva

A avaliação da motilidade total e progressiva do sêmen (*pools*) nos diferentes protocolos de incubação foi realizada em até 45 minutos após a colheita.

Para verificar se existiu influência da diluição em cada diluidor ou vice-versa, primeiramente foram realizadas análises de interação entre as variáveis, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de interação (*p*) para os parâmetros avaliados (motilidade e motilidade progressiva) e grupos (diluidor e diluição), e suas interações no sêmen de *B. insularis*.

Tempos	Diluidor	Diluição	Diluidor*Diluição
MOT T0	0,0248	0,0594	0,0994
MOT PROG T0	0,0370	0,0150	0,0293

Fonte: (SILVA, K. B., 2016)

Legenda: Considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

Na Tabela 2, apresentamos os valores médios de motilidade e motilidade progressiva considerando o efeito das diferentes diluições em cada um dos diluidores.

Tabela 2 - Tempo 0 - Valores (média e erro padrão) dos parâmetros motilidade (MOT) e motilidade progressiva (MOT PROG) considerando o efeito da diluição em cada diluidor utilizado.

	ACP-120®			BWW			HAM F-10		
	1:100 µL	1:200 µL	1:500 µL	1:100 µL	1:200 µL	1:500 µL	1:100 µL	1:200 µL	1:500 µL
MOT	28,40 ^a ±8,28	24,00 ^a ±10,11	11,60 ^a ±5,97	1,60 ^a ±0,97	13,0 ^a ±10,33	4,80 ^a ±4,09	28,66 ^a ±3,61	7,6 ^b ±3,05	3,75 ^b ±259
MOT PROG	17,60 ^a ±3,24	9,80 ^a ±5,13	7,80 ^a ±4,06	1,0 ^a ±0,77	7,80 ^a ±5,86	2,60 ^a ±2,35	20,1 ^a ±3,81	5,0 ^b ±1,78	1,0 ^b ±1,0

Fonte: (SILVA, K. B., 2016)

Legenda: Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Observamos que para os diluidores BWW e ACP-120® não existe diferença significativa nas médias de motilidade e motilidade progressiva independente da diluição utilizada (1:100, 1:200 ou 1:500 μL). Porém, para o diluidor HAM F-10, observou-se que a diluição 1:100 μL apresenta médias significativamente maiores para ambos os parâmetros avaliados quando comparadas às outras diluições.

2.3.2 Experimento 2 – Avaliação de um protocolo de inseminação artificial em *Bothrops insularis*.

Em junho de 2016, oito fêmeas sexualmente maduras com CRC médio de $895 \pm 169,1$ mm (630-1090 mm máximo-mínimo) e massa de $403,5 \pm 178$ g (596-144g máximo-mínimo), sadias e em processo vitelogênico normal (vitelogênese primária ou secundária) foram inseminadas com amostras seminais provenientes de cinco machos. As características seminais das amostras utilizadas para inseminação estão descritas na Tabela 3. Após avaliadas, as amostras de sêmen obtidas foram diluídas no meio HAM F-10 na diluição 1:100 μL e o volume total inseminado variou de 60,0 a 100,0 μL por vagina.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão (Média $\pm$ DP) e valores mínimos e máximos das amostras seminais utilizadas na inseminação artificial de *Bothrops insularis* (n=5).

Parâmetros seminais	Média $\pm$ DP	Mínimo e Máximo
Volume (μL)	4,65 $\pm$ 2,68	2,1 – 7,35
Motilidade Total (%)	68 $\pm$ 17,8	40 – 80
Concentração ($\times 10^9$ sptz/mL)	0,98 $\pm$ 0,43	0,46 – 1,48

Fonte: (SILVA, K. B., 2016)

Todas as fêmeas inseminadas foram acompanhadas por exames ultrassonográficos. Até o final deste trabalho, nenhuma gestação foi detectada.

2.4 DISCUSSÃO

Embora a reprodução por cópula natural seja desejável em qualquer programa de conservação, é importante que se possa lançar mão de biotécnicas reprodutivas sempre que a cópula natural não for praticável, seja pelo estresse ao qual os animais estão submetidos quando em cativeiro ou por problemas físicos que limitem a cópula ou até mesmo pela própria distância entre o macho e a fêmea em questão. Neste trabalho, buscamos fornecer informações básicas que são fundamentais para o desenvolvimento e aplicação de biotécnicas reprodutivas em *Bothrops insularis*, como é o caso da diluição e processamento adequado do material seminal e avaliação de um protocolo de inseminação artificial.

2.4.1 Experimento 1 – Efeito do diluidor e da diluição na motilidade total e progressiva

O volume médio das amostras de sêmen foi semelhante ao encontrado por Silva et al. (2015) (3,21 μ L) ao trabalhar também com *B. insularis*, utilizando a mesma técnica de coleta. Demais características macroscópicas também foram semelhantes, como a coloração variando de branca a levemente amarelada e a consistência leitosa e espessa.

Para que o volume de sêmen obtido pudesse ser utilizado em todos os grupos experimentais, foi necessária a formação de *pools*. Alguns pesquisadores afirmam que a utilização de *pools* de sêmen minimiza o efeito do indivíduo e, conseqüentemente, melhora as características do sêmen, os parâmetros estatísticos e a confiabilidade dos resultados, mas, por outro lado,

corre-se o risco de perder informações individuais relevantes (PONGLOWHAPAN et al., 2004; MASCARENHAS et al., 2014).

A concentração média dos *pools* de sêmen formados para a realização deste experimento foi aproximadamente quatro vezes menor que o encontrado por Silva et al. (2015) ($1,26 \times 10^9$ sptz/mL). Acreditamos que a concentração espermática tão baixa pode estar associada à época em que a coleta foi realizada, no mês de março, correspondente ao verão no hemisfério sul, pois, segundo Kasperoviczus (2009), nessa estação, os testículos encontram-se quiescentes e os resultados obtidos nesta época do ano podem refletir a queda na atividade reprodutiva dos machos, que se inicia já na metade do inverno.

A motilidade e a motilidade progressiva obtidas com todos os diluentes e em todas as diluições, foi considerada baixa se comparada aos dados obtidos por Silva et al. (2015) (64,37%). Acreditamos que a formação de *pools* pode ter interferido na motilidade dos espermatozoides, ou mesmo não nos permitiu identificar se, em meio ao grupo, havia algum indivíduo com a motilidade muito baixa. Segundo Mascarenhas et al. (2014), na formação de *pools* de sêmen, mais do que agrupamento de espermatozoides, são agrupadas proteínas e outros componentes, cujas interações ainda não são bem esclarecidas e que eventualmente podem prejudicar a avaliação final da amostra.

Fonseca (1999) relata que, dentre os aspectos físicos do sêmen, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático são as características mais avaliadas para predizer a qualidade da amostra. Segundo o autor, estes parâmetros são de grande importância e podem revelar, por si só, a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen, associados ou não a alterações da espermiogênese. Quando avaliamos o meio ACP-120 (Tabela 2), observamos que não há diferença significativa entre as diluições testadas, seja em relação à motilidade ou motilidade progressiva. O mesmo acontece quando avaliamos o meio BWW (Tabela 2). Porém, vale ressaltar a diferença notória nos valores médios dos parâmetros avaliados, visto que a motilidade e a motilidade progressiva das amostras diluídas com o meio BWW foram muito inferiores às médias obtidas com os meios HAM-F10 e ACP-120. Quanto ao meio HAM-F10, foi possível observar que a diluição 1:100 μ L apresentou

médias de motilidade e motilidade progressiva significativamente maiores que nas outras diluições testadas (Tabela 2).

O meio HAM F-10 já foi utilizado em diversas espécies de répteis e em diferentes concentrações, como por exemplo iguanas (ZIMMERMAN et al., 2013 - 1:10 μ L), cascavéis (ZACARIOTTI et al., 2007- 1:500 μ L) e a própria jararaca-ilhoa (SILVA et al., 2015 –1:1000 μ L), sempre com resultados satisfatórios. Neste trabalho, verificamos que a diluição 1:100 μ L pode oferecer melhores resultados para parâmetros relacionados à motilidade espermática. O meio ACP-120 apresentou médias de motilidade muito próximas às do meio HAM-F10, o que sugere que mais estudos podem ser realizados utilizando este meio, que é barato e de fácil preparo, inclusive em expedições a campo.

2.4.2 Experimento 2 – Avaliação de um protocolo de inseminação artificial em *Bothrops insularis*.

O protocolo de IA realizado neste trabalho foi semelhante ao descrito por Mattson et al. (2007) ao trabalhar com a corn snake (*Pantherophis guttatus*), obtendo uma taxa de ovipostura de 30% e uma taxa de eclodibilidade de 19,6% (10/51 ovos). Recentemente, Oliveri et al. (2018), ao testarem um protocolo de inseminação artificial guiada por endoscopia em diferentes espécies de serpentes, obtiveram sucesso com corn snake e suaçuboa (*Corallus hortulanus*), porém, as fêmeas de jiboia-de-Madagascar (*Sanzinia madagascariensis*) e de surucucu-do-pantanal (*Hydrodynastes gigas*) não apresentaram prenhez.

O resultado sobre a eficiência do protocolo de inseminação artificial em *B. insularis* testado neste trabalho não pode ser verificado até o momento. O fato de nenhuma gestação ter sido confirmada até o término da coleta de dados deste projeto não indica, necessariamente, que a inseminação artificial não foi bem-sucedida, uma vez que as fêmeas desta espécie são capazes de estocar espermatozoides (KASPEROVICZUS, 2009). Além disso, Booth e Schuett (2011) comprovaram geneticamente que serpentes podem estocar espermatozoides também na região infundibular por um período de até cinco anos. Devido a isto, é imprescindível que em serpentes que estocam

espermatozoides sejam feitos exames genéticos a fim de confirmar a paternidade da prole, pois somente assim será possível comprovar a eficiência da IA.

Para os viperídeos neotropicais do gênero *Bothrops* e *Crotalus* a estocagem de sêmen é fundamental no ciclo reprodutivo, já que cópula ocorre no outono e a ovulação somente na primavera (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; 2002; BARROS et al., 2012, 2014). *B. insularis*, assim como outros viperídeos neotropicais, apresenta uma contração muscular na junção útero vaginal na qual ocorre a estocagem de espermatozoides (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; 2002; KASPEROVICZUS, 2009). No entanto, a presença desta contração da musculatura útero-vaginal limita o avanço da sonda responsável pela deposição do sêmen no interior do trato reprodutivo, fazendo com que os espermatozoides sejam depositados, obrigatoriamente, no fundo da vagina.

A formação e estabilização ou intensidade desta contração muscular na junção útero-vaginal tem relação com hormônios sexuais como o estradiol e a arginina-vasotocina (YAMANOUYE et al., 2004), porém não sabemos ainda os mecanismos fisiológicos exatos que atuam nesta região durante a cópula em si, ou se há ou não indução do relaxamento momentâneo da mesma, permitindo que o sêmen adentre os ovidutos.

Para que um protocolo de IA seja bem-sucedido, é importante conhecer precisamente o local apropriado para deposição de espermatozoides (vagina, colo do útero ou útero) e o tempo apropriado durante o estro. Como o tempo real de ovulação pode ser difícil de avaliar, a melhor estratégia pode ser controlar as funções ovarianas para detectar e manipular mais facilmente o período sexualmente receptivo das fêmeas (SCHIEWE et al., 1991; THOMPSON; MONFORT, 1999). Infelizmente, para serpentes, algumas informações essenciais para o sucesso na aplicação da IA ainda são desconhecidos, tais como o sítio de deposição dos espermatozoides e a dose inseminante necessária para que seja possível a fertilização.

Por outro lado, vale ressaltar que as informações obtidas com os espermogramas realizados para a seleção dos machos doadores neste experimento, corroboram as hipóteses de que a formação de pools de sêmen

pode realmente exercer uma influência negativa sobre os parâmetros seminais, assim como de que a sazonalidade reprodutiva pode ser determinante na qualidade seminal em *B. insularis*. É possível observar uma melhoria na qualidade seminal da jararaca-ilhoa quando comparamos os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3. Segundo Marques et al. (2013), junho é o mês onde há o maior número de registro de cortes e cópulas na espécie, seja em cativeiro ou em vida livre, o que justifica que o macho possua uma qualidade seminal melhor nesta época do ano.

Acreditamos que este estudo esclareceu alguns pontos relacionados à manipulação e processamento do sêmen de *B. insularis* e também levanta questões acerca da aplicabilidade de biotécnicas reprodutivas, como a IA, evidenciando a necessidade da realização de mais estudos acerca da anatomia e fisiologia reprodutiva da fêmea e também voltados a aspectos fisiológicos do sêmen na espécie.

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE
REFRIGERAÇÃO PARA PRESERVAÇÃO SEMINAL EM
Bothrops insularis

3 CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO PARA PRESERVAÇÃO SEMINAL EM *Bothrops insularis*

3.1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade vem sofrendo uma acentuada redução nos últimos cem anos, embora iniciativas voltadas para a proteção de habitats tenham se tornado cada vez mais frequentes (IUCN, 2018). Além de programas de conservação *in situ*, que monitoram populações de interesse em seu ambiente natural, cada vez mais cresce a necessidade de manter indivíduos fora de seu habitat em ações de conservação *ex situ*, visando salvaguardar populações mínimas em locais distintos, facilitando a realização de pesquisas e até mesmo a criação de bancos de germoplasma para diversas espécies (HIEMSTRA et al., 2000).

O emprego de biotécnicas reprodutivas surge como ferramenta indispensável para a obtenção de sucesso de programas de conservação de espécies ameaçadas, como é o caso da jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*). A criopreservação de sêmen aparece como uma estratégia de grande importância para a reprodução e manutenção da diversidade genética na vida silvestre, e fornece um *pool* genético de longo prazo para bancos de germoplasma de animais, atualmente uma parte importante em muitos programas de conservação da vida selvagem (PUKAZHENTHI et al., 2006).

A criopreservação, no entanto, tem um potencial nocivo às células espermáticas e qualidade seminal elevado devido a alguns fatores como a mudança brusca de temperatura, a ocorrência de estresse osmótico, toxicidade devido à exposição a crioprotetores e a formação de cristais de gelo intra e extracelulares (MEDEIROS et al., 2002). Por outro lado, a refrigeração promove menos danos às células espermáticas, embora permita um período de preservação que dificilmente ultrapassa 72 h a 5°C (MARTINS; JUSTINO, 2015).

A inseminação artificial (IA), por sua vez, é uma biotécnica de fácil emprego, inclusive a campo e que, quando bem executada, traz resultados muito satisfatórios. Pode ser empregada tanto em projetos *in situ*, capturando fêmeas por um breve período para que sejam inseminadas utilizando sêmen de machos de outras localidades ou até mesmo de cativeiro, ou ainda coletar sêmen de machos de vida livre e inseminar fêmeas mantidas em cativeiro (PUKAZHENTHI; WILDT, 2004).

Neste contexto, torna-se fundamental o desenvolvimento de pesquisas acerca da preservação do sêmen de *B. insularis*, focando especialmente na refrigeração e armazenamento adequado para o transporte, permitindo o máximo aproveitamento do material seminal em condições nas quais seja necessária a troca de material genético entre a Ilha da Queimada Grande e instituições mantenedoras. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes sistemas de refrigeração para preservação seminal de *Bothrops insularis* por até 48 h.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Foram utilizados 21 machos adultos e sexualmente maduros (comprimento rostro-cloacal (CRC) >435 mm, SILVA et al., 2015) de *B. insularis*, mantidos no biotério da sede do Projeto de Conservação da Jararaca-ilhoa, localizado no Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. O biotério é mantido sob condições naturais de fotoperíodo e umidade, e a temperatura é mantida em torno dos 25°C com uso de climatizador. Os animais são mantidos em cativeiro desde outubro de 2009 (licença SISBIO n. 25650-1), individualizados em caixas plásticas transparentes (564 x 385 x 371 mm) com tampa e laterais perfuradas, e forradas no piso com papelão corrugado. A dieta dos animais é composta de camundongos (*Mus musculus*) que são oferecidos em intervalos regulares de 30 dias, respeitando-se a proporção de 10 a 20% da massa do indivíduo. É fornecida água fresca *ad libitum*.

3.2.2 Coleta de sêmen

O sêmen foi colhido segundo metodologia de Silva et al. (2015) com modificações. Os animais foram contidos fisicamente em tubo plástico para a limpeza da região cloacal com soro fisiológico. Posteriormente, cada macho recebeu anestesia local na região pericloacal em quatro pontos distintos, visando o relaxamento e exposição da papila urogenital (Lidocaína 1%, 15mg/kg, via subcutânea). Após aproximadamente 10 minutos, foi iniciada a coleta do sêmen com a realização de massagens na região ventral do terço final do indivíduo para que o mesmo fosse expelido. O sêmen foi colhido diretamente da papila genital com tubos capilares de vidro para micro-hematócrito e, então, acondicionado em microtubos de 0,2 mL onde foi diluído na proporção de 1:100 μ L do meio HAM F-10.

3.2.3 Análise do sêmen

Análise computadorizada do movimento espermático: As avaliações de motilidade total (MOT) e motilidade progressiva (MOT PROG) foram realizadas utilizando o CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer – CASA; Hamilton Thorne IVOS), no qual 7,0 μ L da amostra de sêmen são colocados entre lâmina e lamínula de vidro e inseridos no aparelho, que avaliará quatro campos aleatórios para obtenção da média dos parâmetros avaliados.

As amostras de sêmen foram rediluídas em solução de formol salino a 10% para as avaliações de morfologia e concentração espermática. Para a avaliação da concentração foi utilizada a câmara hemantimétrica de *Neubauer*, analisada sob microscopia de luz (400x). Para as avaliações da morfologia espermática foi utilizada a técnica de câmara úmida, com um total de 100 células analisadas por amostra, sob microscopia de contraste de fase (1000x) (CBRA, 2013).

3.2.4 Sistemas de refrigeração

Os três sistemas de refrigeração para o sêmen de *B. insularis* avaliados neste experimento foram: geladeira (GL) (Metalfrio® VB54W 464L), dentro da qual os microtubos contendo as amostras de sêmen foram acondicionados em racks plásticos; banho-maria em geladeira (BM), no qual os tubos com as amostras foram acondicionados em um becker com água, suspensos pela tampa em um suporte de isopor adaptado (Figura 4); caixa de isopor para refrigeração (IS) tipo BotuFLEX® (Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu – Brasil) (Figura 5); e, como controle, avaliamos também amostras de sêmen mantidas em temperatura ambiente (TA), em uma rack plástica sobre a bancada do laboratório.

Previamente, a temperatura dos sistemas GL, BM e TA foram monitoradas com o uso de *dataloggers* (ibutton WatchDog®2k B100), realizando-se aferições a cada 120 minutos durante um período de 48h. Foi observado que no sistema GL a temperatura decresce numa taxa de 0,15 °C/min nos primeiros 120 minutos, quando atinge 4 °C e se mantém estável. A temperatura no sistema BM decresce numa taxa de 0,07 °C/min nos primeiros 240 minutos, quando atinge 4 °C e se mantém estável. A temperatura média do ambiente experimento foi de $19,5 \pm 0,4$ °C. Quanto ao sistema BotuFLEX®, o fabricante (Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu – Brasil) afirma que, utilizando duas bolsas de gelo reciclável, pode-se alcançar a temperatura de 5°C em até 4 h, mantendo-se estável por até 48 h, desde que fechado.

Figura 4 - Sistema de refrigeração em “banho-maria”

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Figura 4 - Caixa de isopor para refrigeração BotuFLEX®

Fonte: (WWW.BOTUPHARMA.COM.BR).

3.2.5 Delineamento experimental

Após a coleta de sêmen, as amostras foram diluídas e avaliadas quanto ao volume, concentração, morfologia e motilidade. A avaliação da motilidade e motilidade progressiva média das amostras realizada nesse primeiro momento, imediatamente após a diluição, correspondeu à avaliação do Tempo 0 (Tabela 2). Em seguida, as amostras foram fracionadas e as alíquotas divididas entre os sistemas de refrigeração e o controle. A partir de então, as amostras foram avaliadas novamente quanto à sua motilidade e motilidade progressiva nos tempos 4, 8, 24 e 48 h (Figura 6).

Para o sistema BotuFLEX®, as amostras foram divididas também por tempo de avaliação e acondicionadas em diferentes caixas, evitando assim que a mesma caixa fosse aberta sucessivas vezes para as análises, o que ocasionaria uma perda acentuada na capacidade de resfriamento do sistema (Figura 7).

Figura 6- Delineamento do experimento de refrigeração seminal de *B. insularis*

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Figura 7- Delineamento do experimento de refrigeração seminal de *B. insularis* referente ao teste do sistema BotuFLEX®.

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). A interação entre os fatores sistema de refrigeração e tempo foi realizada por meio da análise de medidas repetidas no tempo PROC MIXED. Além disso, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, utilizando o teste Duncan, tanto para comparar os diferentes tempos quanto os diferentes sistemas de refrigeração. O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 será de 5% ($p < 0,05$). Os dados serão descritos através da média e erro padrão da média.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Coletas de sêmen e avaliação seminal

No mês de março de 2017, dezoito machos adultos de *B. insularis* foram submetidos à coleta de sêmen. Destes, apenas dois animais (11,1%) possuíam amostras viáveis, enquanto quinze (83,3%) apresentaram amostras de sêmen com alto índice de espermatozoides decapitados (Figura 8) e de um indivíduo (5,5%) não se obteve amostra. Com o intuito de obter a quantidade mínima de amostras viáveis necessárias para a realização do experimento de refrigeração e também de acompanhar a frequência e a incidência da decapitação nas amostras seminais do plantel, foram realizadas mais cinco coletas de sêmen com intervalo variando de dois a seis meses. A figura 9 apresenta a porcentagem de amostras viáveis e “decapitadas” de sêmen obtidas ao longo das coletas realizadas neste experimento.

Figura 8 - Espermatozoides de *B. insularis* decapitados.

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Legenda: espermatozoides de *B. insularis* em preparação de câmara úmida sob microscopia de contraste de fase. A: aumento de 400x; B: aumento de 1000x. *apontam cabeças destacadas e setas apontam caudas soltas.

Figura 9 - Gráfico apresentando frequência de aparecimento de amostras de sêmen “decapitadas” nas coletas realizadas.

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Na Tabela 4, são apresentados os dados referentes aos parâmetros seminais das amostras viáveis obtidas ao longo das coletas. Como o número de amostras viáveis obtidas por coleta foi reduzido, não foi possível realizar análise estatística dos parâmetros seminais encontrados entre as mesmas.

Tabela4 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros seminais das amostras de sêmen viáveis obtidas nas coletas realizadas.

	Março/17 n=2	Junho/17 n=5	Agosto/17 n=6	Março/18 n=2	Mai/18 n=2	Julho/18 n=2
Volume (µL)	4,7±0,7	8,92±2,64	5,6±0,24	4,6±0,8	6,2±3,11	2,43±1,24
Motilidade (%)	61±19,7	43,8±30,6	51,66±14,73	45±4,2	59,5±14,8	55±7
Motilidade Progressiva (%)	54,5±20,5	28±20,74	44,16±10,9	40,5±2,53	51,5±13,43	45±8,4
Concentração (x10 ⁹ spz/mL)	1,83±0,22	1,44±0,19	1,57±0,24	1,68±0,32	1,55±0	1,73 ±0,52
Cél.						
Morfologia normais (%)	76,5±6,36	77±8	74,83±8,9	73±7,07	73±12,72	77,66±9,5
Cél.						
defeituosas (%)	23,5±6,36	23±8	25,16±8,9	27±7,07	27±12,72	22,33±9,5

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Do total de espermatozoides defeituosos encontrados, 14,38% possuíam patologias na cabeça, 50,33% possuíam patologias na peça intermediária e 35,27% possuíam patologias na cauda. Na Tabela 5 estão descritas as principais patologias encontradas nas amostras seminais viáveis de *B. insularis*.

Tabela 5 – Valores percentuais das alterações morfológicas mais frequentes encontradas nas amostras viáveis de sêmen.

Patologias*	(%)	Patologias específicas**	(%)
Patologiasde cabeça	14,38	Macrocefalia	35
		Acrossoma dobrado	18,7
		Cabeça solta anormal	28,2
		Cabeça solta normal	8
Patologiasde peça intermediária	50,33	Peça enrolada	50
		Peça fortemente enrolada	25
		Peça dobrada	13
Patologiasde cauda	35,27	Cauda enrolada	55
		Cauda fortemente enrolada	30,2
		Cauda dobrada	11

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Legenda: *Categoria expressa em porcentagem dentro do total de células anormais; células morfolologicamente normais foram excluídas deste cálculo. **Porcentagem dentro de cada categoria de patologias.

As amostras consideradas “decapitadas” possuíam uma média superior a 80% desta patologia em todas as coletas realizadas. Demais dados referentes às amostras “decapitadas” encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros seminais das amostras de sêmen decapitadas obtidas nas coletas realizadas.

	Março/17 n=15	Junho/17 n=14	Agosto/17 n=15	Março/18 n=17	Maio/18 n=5	Julho/18 n=12
Volume (μL)	5,32 $\pm$ 1,79	7,87 $\pm$ 3,11	4,34 $\pm$ 1,97	4,13 $\pm$ 0,96	4,62 $\pm$ 1,90	2,8 $\pm$ 1,63
Motilidade (%)	0	0	0	0	0	0
Motilidade Progressiva (%)	0	0	0	0	0	0
Concentração ($\times 10^9$ spz/mL)	1,49 $\pm$ 0,42	1,46 $\pm$ 0,46	1,62 $\pm$ 0,58	1,48 $\pm$ 0,38	1,39 $\pm$ 0,36	1,46 $\pm$ 0,39
Morfologia	Cél. normais (%)	2,1 $\pm$ 1	3,2 $\pm$ 1,2	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1,92	7,2 $\pm$ 3,76
	Cél. decapitadas (%)	92,1 $\pm$ 7,34	,7 $\pm$ 8	90,3 $\pm$ 5,52	81 $\pm$ 10,9	89,2 $\pm$ 7,91
						92,4 $\pm$ 9,9

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

3.3.2 Refrigeração do sêmen

Na Tabela 7, encontram-se os valores médios ($\% \pm$ desvio padrão) de motilidade e motilidade progressiva para o sêmen de *B. insularis* ao longo de 48 h em temperatura ambiente (TA) e nos sistemas de refrigeração (IS, BM e GL).

Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão de motilidade e motilidade progressiva do sêmen de *B. insularis* ao longo de 48h mantido em diferentes sistemas de refrigeração (IS, BM, GL) e na temperatura ambiente (TA).

Tempo (h)	Sistema de resfriamento/	TA	IS	BM	GL
Motilidade seminal(%)					
0	MOT	43,8 $\pm$ 30,59	43,8 $\pm$ 30,59	43,8 $\pm$ 30,59	43,8 $\pm$ 30,59
	MOT PROG	28 $\pm$ 20,74	28 $\pm$ 20,74	28 $\pm$ 20,74	28 $\pm$ 20,74
4	MOT	40,5 $\pm$ 18,03	52,8 $\pm$ 8,78	39,6 $\pm$ 18,03	41 $\pm$ 17,13
	MOT PROG	22 $\pm$ 11,85	29,8 $\pm$ 5,16	22,6 $\pm$ 8,32	20,4 $\pm$ 8,9
8	MOT	54 $\pm$ 3,74	44,32 $\pm$ 10	46,4 $\pm$ 16,45	47 $\pm$ 21,8
	MOT PROG	33 $\pm$ 8,15	31,64 $\pm$ 9,22	27 $\pm$ 12,88	28,6 $\pm$ 15,6
24	MOT	6,6 $\pm$ 14,7	31,8 $\pm$ 16,84	31,4 $\pm$ 13,83	33 $\pm$ 14,78
	MOT PROG	3,4 $\pm$ 16,8	20,8 $\pm$ 11	19 $\pm$ 9,4	15,8 $\pm$ 6,83
48	MOT	0 $\pm$ 0	42,6 $\pm$ 23,63	24,6 $\pm$ 13,1	28,8 $\pm$ 22,11
	MOT PROG	0 $\pm$ 0	29,6 $\pm$ 21,73	14,6 $\pm$ 10,96	17,4 $\pm$ 14,97

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Legenda: Sistemas de Refrigeração - temperatura ambiente (TA); isopor tipo BotuFLEX® (IS); banho-maria em geladeira (BM); geladeira (GL).

Como esperado, verificamos que a motilidade e a motilidade progressiva do sêmen caíram em função do tempo quando as amostras ficaram acondicionadas em temperatura ambiente ($p < 0,01$). A motilidade e a motilidade progressiva do sêmen de *B. insularis* no tratamento controle (TA) sofreram queda significativa após 8 h.

3.3.3 Efeito do tempo e do sistema de refrigeração na motilidade total e progressiva

Para verificar se existiu influência do tempo em cada sistema de refrigeração ou vice-versa, foram realizadas análises de interação entre as variáveis, conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de interação (p) dos fatores tempo e sistemas de refrigeração nos parâmetros de motilidade seminal (motilidade e motilidade progressiva) de *B. insularis*.

Parâmetros	Tempo	Sistema de refrigeração	Tempo*Sistema de Refrigeração
MOT	0.057	0.437	0.863
MOT PROG	0.117	0.225	0.958

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Na análise de interação, não foi observada influência do tempo em cada sistema e, desta forma, a avaliação da motilidade e motilidade progressiva foi realizada separadamente em função do tempo ou do sistema de refrigeração.

A motilidade e a motilidade progressiva do sêmen de *Bothrops insularis* não variou significativamente entre os diferentes sistemas de refrigeração ($p=0,56$ e $p=0,26$, respectivamente), conforme mostra a Tabela 9 abaixo:

Tabela 9 - Valores médios e erro padrão da motilidade seminal de *Bothrops insularis* nos diferentes sistemas de refrigeração

Parâmetros	Isopor	Banho-Maria	Geladeira
MOT	43,06±3,86	37,16±3,91	38,72±4,24
MOT PROG	27,96±2,85	22,24±2,6	22,04±2,83

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

Ao analisarmos a motilidade e a motilidade progressiva de acordo com os tempos de avaliação, observamos que ambos os parâmetros também não variaram significativamente entre os tempos 0 e 48h ($p=0,11$ e $p=0,16$, respectivamente), conforme apresenta a Tabela 10 abaixo.

Tabela 10 - Valores médios e erro padrão da motilidade seminal de *Bothrops insularis* nos diferentes sistemas de refrigeração.

	0h	4h	8h	24h	48h
MOT	43,80±7,31	44,46±3,96	45,90±4,03	32,06±3,63	32±5,23
MOT PROG	28±4,95	24,26±2,11	29,08±3,11	18,53±2,27	20,53±4,31

Fonte: (SILVA, K. B., 2018)

3.4 DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes sistemas de refrigeração visando a preservação seminal de *B. insularis* por um período de 48h e, ao mesmo tempo, foi possível avaliar um potencial meio de transporte para o sêmen refrigerado. Em meio a isto, pode-se observar o aparecimento gradativo de características indesejáveis no espermograma dos animais, como é o caso de espermatozoides com a cabeça destacada da cauda. A alta incidência deste defeito em boa parte dos animais comprometeu a análise total das amostras.

3.4.1 Coletas de sêmen e avaliação seminal

Neste trabalho, observamos que, em seis coletas de sêmen realizadas ao longo de quase dois anos, mais da metade dos animais apresentaram amostras de sêmen com mais de 80% de decapitação e 0% de motilidade. Embora não haja na literatura informações precisas sobre a frequência ou incidência da decapitação dos espermatozoides em serpentes, ou mesmo em répteis, é possível afirmar que estamos diante de um quadro preocupante que

pode comprometer a fertilidade dos machos deste plantel de *B. insularis*. Quanto às amostras viáveis obtidas, foi possível observar que as características seminais avaliadas foram semelhantes às descritas por Silva et al. (2015) para este mesmo plantel.

A decapitação, ou cabeça isolada normal, é um tipo de anomalia na qual a cabeça encontra-se sem a inserção da cauda na região basal. Pode ser considerada uma anomalia menor, ou seja, que não compromete a fertilidade do animal (BLOM, 1973), ou uma anomalia secundária ou terciária, que são aquelas que têm origem distal ao epitélio seminífero, durante o armazenamento ou ejaculação, ou ainda na manipulação dos espermatozoides após a coleta (LAGERLÖF, 1934). Não acreditamos, no entanto que a incidência de patologias neste trabalho esteja relacionada com a coleta ou manipulação das amostras, tendo em vista que este experimento foi realizado seguindo exatamente a mesma metodologia e pela mesma equipe do trabalho de Silva et al. (2015).

Touros em repouso sexual prolongado também podem apresentar percentuais elevados de cabeça isolada normal. No entanto, este é um quadro passageiro e não deve comprometer a fertilidade. Em alterações como hipoplasia testicular, degenerações crônicas, orquite, epididimite, vesiculite seminal e ampolite também cursam com a ocorrência dessas patologias (ROSA et al., 2009).

O ciclo reprodutivo dos machos da jararaca-ilhoa é marcadamente sazonal, com a espermatogênese se iniciando a partir do início do outono, coincidindo com a época de corte e cópula, e podendo se estender até a metade da primavera, quando as células germinativas começam a entrar em dormência, permanecendo assim até o final do verão (KASPEROVICZUS, 2009). Este fato, segundo Silva et al. (2015), pode influenciar algumas características seminais da espécie, tais como motilidade e concentração. Ainda no mesmo trabalho, ao realizar a avaliação morfológica das amostras, feita somente no inverno, relatou a incidência de apenas 7% de anomalias totais na cabeça dos espermatozoides. Fahrig et al. (2007) encontrou uma média de 1% de destacamento de cabeças ao trabalhar com sêmen de corn snake

(*Pantherophis guttatus*) e sugere que estas anomalias estejam relacionadas com o estresse ao qual os animais estão submetidos.

Outro estudo realizado com touros apontou que, embora a presença de espermatozoides decapitados seja uma patologia relativamente frequente, aparecendo em aproximadamente 66% das amostras de sêmen coletadas, a média por indivíduo varia de 3,6% a 12,2% em touros aptos e inaptos para a reprodução, respectivamente (FERNANDES; MARTINS, 2003).

Quando em cativeiro, o ciclo reprodutivo dos animais pode ser comprometido pelo estresse crônico ao qual estes estão submetidos (MOBERG, 2000). Segundo Stein (2016), as condições de manejo às quais as *B. insularis* estão submetidas no biotério onde esta pesquisa foi realizada, tais como alimentação, temperatura e umidade, são muito distintas daquelas encontradas no hábitat natural da espécie, o que pode ser responsável pela elevação no nível de estresse dos animais (SILVESTRE, 2014). Uma das diferenças mais marcantes, sem dúvida, é a alimentação, pois na Ilha da Queimada Grande, os animais adultos têm sua dieta restrita a basicamente a *Elaenia chilensis* e *Turdus flavipes*, duas aves migratórias que visitam a ilha nos meses de fevereiro a março, e de agosto a setembro, (MARTINS et al., 2002; MONTANHINI, 2010). É possível que, por se tratar de animais que estão submetidos ao manejo em cativeiro e ao estresse decorrente dele há muito tempo (>4 anos), exista uma quiescência ou pausa testicular prolongada, o que levaria à não renovação dos espermatozoides estocados e à permanência prolongada em seu sítio de estocagem (ductos deferentes) (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; KASPEROVICZUS, 2009), justificando uma queda expressiva na qualidade seminal de boa parte dos indivíduos.

Diante destes resultados, acreditamos que são necessários mais estudos que avaliem e monitorem o nível de estresse ao qual os animais estão submetidos em cativeiro, bem como a influência do estresse nos ciclos reprodutivos. A implantação de enriquecimento ambiental e também alterações no manejo podem ter resultados positivos no bem-estar animal e, consequentemente, nos índices reprodutivos. Além disso, é primordial seguir avaliando a qualidade seminal da espécie, tanto da população avaliada neste estudo, quanto de indivíduos mantidos em outras instituições, submetidos a

condições de manejo diferentes das observadas aqui. Não obstante, é fundamental que estas avaliações também sejam feitas em animais de vida livre para que seja possível acessar o status reprodutivo da espécie em seu hábitat natural.

3.4.2 Refrigeração do sêmen

Considerando os resultados obtidos quanto à qualidade do sêmen dos animais, torna-se evidente a necessidade de estudos que avaliem protocolos de preservação seminal, permitindo o máximo de aproveitamento das amostras viáveis, bem como o transporte deste material, assegurando sua viabilidade.

É esperado que os espermatozoides de serpentes tenham uma capacidade de sobrevivência elevada mesmo em situações extremas, tendo em vista o tempo que permanecem viáveis durante os longos períodos de estocagem, seja nos ductos deferentes nos machos ou nos sítios de estocagem no trato reprodutor feminino (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO 1997; 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004, YAMANOUYE et al., 2004; MARINHO et al., 2009). Neste trabalho, pudemos observar que em temperatura ambiente, sem qualquer sistema específico para preservação, os espermatozoides de *B. insularis* mantiveram a motilidade sem alterações significativas por até 8h. Almeida-Santos et al. (2004), que ao trabalharem com sêmen de cascavel, já relataram a sobrevivência dos espermatozoides em temperatura ambiente (20-24°C) pelo mesmo período de tempo. No mesmo estudo, os autores relatam ainda que os espermatozoides extraídos de machos mantidos no freezer por 24 h após sua morte ainda apresentavam motilidade.

De acordo com nossos resultados, a refrigeração do sêmen se mostrou extremamente eficaz na preservação da motilidade e motilidade progressiva das amostras por um período de até 48 h, pois tais parâmetros não sofreram alteração significativa neste período de tempo. Vale ressaltar também a versatilidade que os protocolos de refrigeração oferecem, pois tanto os sistemas em geladeira (resfriamento rápido) quanto em banho-maria em geladeira (resfriamento lento), e até mesmo a refrigeração em caixa de isopor própria para transporte (BotuFLEX®) se mostraram satisfatórias na

preservação da motilidade seminal por 48h, o que permite o armazenamento e transporte desse material utilizando metodologias simples e sem prejuízo à motilidade do sêmen.

O primeiro estudo referente à conservação de espermatozoides de serpentes cita ser possível manter a motilidade espermática por até 96 h, usando um meio de cultivo celular (McCoy modificado) a 5°C, ou obter 30% de células móveis após o descongelamento, porém sem descrever detalhes dos protocolos utilizados (MENGDEN et al., 1980).

Fahrig et al. (2007), ao avaliarem amostras de sêmen refrigeradas de corn snake, compararam a eficiência da manutenção em geladeira a 4°C e um dispositivo para manutenção e transporte de sêmen refrigerado chamado Equitainer®. Os autores relatam que a motilidade média dos espermatozoides foi superior a 50% a 48 h e chegou a 0% em 120 h em ambos os sistemas, mas ressaltam que nos tempos de 72 e 96 h a motilidade dos espermatozoides mantidos em geladeira se mostrou significativamente maior em comparação aos mantidos no Equitainer® (FAHRIG et al., 2007). Como nossos resultados demonstram que não houve redução significativa da motilidade em até 48h, acreditamos que seria interessante a realização de mais estudos testando a viabilidade desses sistemas de refrigeração na manutenção da motilidade seminal por períodos de tempos mais prolongados.

Mattson et al. (2007), no único trabalho que comprova geneticamente a eficiência da inseminação artificial em corn snake, relata que metade da prole foi obtida utilizando sêmen refrigerado (4-10 °C por três dias) na inseminação e a outra metade utilizando sêmen fresco, recém coletado e diluído. Embora os índices de gestação e de eclodibilidade obtidos pelos autores não sejam considerados satisfatórios (30 e 19,6%, respectivamente), o fato de terem nascido filhotes viáveis com o uso de sêmen refrigerado via inseminação artificial já demonstra que esta é uma linha promissora na qual mais recursos e estudos devem ser aplicados afim de alcançarmos melhores resultados.

Desta forma, concluímos que a qualidade seminal e, conseqüentemente, a fertilidade de boa parte dos machos do plantel de *B. insularis* utilizados neste estudo podem estar seriamente comprometidas pela elevada frequência e alta incidência de espermatozoides decapitados nas amostras. Acreditamos que a

realização de pesquisas que monitorem a saúde geral e reprodutiva destes animais é fundamental, assim como a implementação de enriquecimento ambiental e mudanças no manejo que possam amenizar o elevado nível de estresse aos quais os mesmos estão submetidos, pois estes fatores podem estar fortemente relacionados à baixa qualidade seminal.

Por outro lado, os resultados obtidos com os sistemas de refrigeração avaliados foram animadores, no que diz respeito à preservação seminal por até 48h, sem que haja uma queda significativa na motilidade das amostras. Isto permite que amostras de sêmen sejam transportadas entre instituições mantenedoras e entre essas instituições e a Ilha da Queimada Grande, subsidiando o desenvolvimento e aprimoramento de outras biotécnicas, como inseminação artificial, e permitindo a troca de material genético, tão importante para a viabilidade de populações mantidas em cativeiro.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio HAM F-10 na diluição 1:100 μ L foi o protocolo de diluição seminal que apresentou os melhores resultados sobre a motilidade e motilidade progressiva do sêmen de *B. insularis*. O meio ACP-120®, por ter apresentados resultados próximos ao HAM F-10 e por ser de fácil preparo e baixo custo, também pode ser considerado uma boa opção para o processamento seminal na espécie, especialmente em trabalhos a campo. Até o momento não foi detectada nenhuma prenhez em fêmeas de *B. insularis* inseminadas, no entanto, pelo fato da espécie ser capaz de estocar espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea por alguns anos, a técnica não deve ser descartada, mas sim alvo de mais estudos que contemplem anatomia e fisiologia da fêmea e a dose inseminante necessária para que ocorra o processo de fertilização.

Diante destes resultados, acreditamos que são necessários mais estudos que avaliem e monitorem o nível de estresse ao qual os animais estão submetidos em cativeiro, bem como a influência do estresse nos ciclos reprodutivos. A implantação de enriquecimento ambiental e também alterações no manejo podem ter resultados positivos no bem-estar animal e, consequentemente, nos índices reprodutivos. Além disso, é primordial seguir avaliando a qualidade seminal da espécie, tanto da população avaliada neste estudo, quanto de indivíduos mantidos em outras instituições, submetidos a condições de manejo diferentes das observadas aqui. Não obstante, é fundamental que estas avaliações também sejam feitas em animais de vida livre para que seja possível acessar o status reprodutivo da espécie em seu hábitat natural.

Pela observação da alta incidência e frequência de espermatozoides decapitados em boa parte dos machos avaliados, acreditamos que a fertilidade do plantel por estar seriamente comprometidas. Assim, acreditamos que ações que visem um monitoramento clínico e reprodutivo e a melhoria nas condições de manejo são fundamentais para tentar reverter este quadro. Além disso, verificamos que a refrigeração é um método que se mostrou muito eficiente na

preservação seminal, tendo bons resultados sobre a manutenção da motilidade espermática por até 48h nos três protocolos testados.

Esperamos que o conhecimento gerado aqui sirva de base para o delineamento de planos de conservação e para o desenvolvimento e aprimoramento de biotécnicas reprodutivas, contribuindo com o Plano Nacional de Ação para Conservação da Herpetofauna Insular Ameaçada de Extinção, no qual a jararaca-ilhoa está inserida, contribuindo também com a criação de um banco de germoplasma e possibilitando, futuramente, a troca de material genético entre indivíduos da Ilha da Queimada Grande e instituições mantenedoras.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal of Herpetology**, v. 17, p. 46-52, 1997.
- ALMEIDA SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. (Eds.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Publ. Mountain, 2002. p. 445-462.
- 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**, v. 26, n. 2, p. 109-112, 2002.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ABDALLA, F. M. F.; SILVEIRA, P. F.; YAMANOUYE, N.; BRENO, M. C.; SALOMÃO, M. G. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. Seasonal level and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 143-150, 2004.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SILVA, K. B.; SUEIRO, L. R.; SILVA, K. M. P.; KASPEROVICZUS, K. N. Atividade reprodutiva de fêmeas de *Bothrops insularis* em cativeiro. In: **VIII Congresso Brasileiro de Herpetologia**, 2017, Campo Grande. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2017.
- ALVES, M. L. M.; ARAÚJO, M. L.; WITT, A. A. Aspectos da biologia reprodutiva de *Bothrops jararaca* em cativeiro (Serpentes, Viperidae). **Iheringia, Série Zoologia**, n. 89, p. 187-192, 2000.
- BALLOU, J. D.; LEES, C.; FAUST, L. J.; LONG, S.; LYNCH, C.; LACKEY, L. B.; FOOSE, T. J. Demographic and genetic management of captive populations. In: KLEIMAN, D. G.; THOMPSON, K. V.; BAER, C. K. **Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management** (2nd. Edition). The University of Chicago Press, 2010. p. 219-252.
- BARROS, V. A.; SUEIRO, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.. Reproductive biology of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus* from northeastern Brazil: a test of phylogenetic conservatism of reproductive patterns. **Herpetological Journal**, v. 22, p. 97-104, 2012.
- 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**, v. 24, p. 67–75, 2014.

BIGGERS, J. D.; WHITTEN, W. K.; WHITTINGHAM, D. G. (1971) The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel, J. D. (ed.). **Methods in Mammalian Embryology**. Freeman: San Francisco, 1971. p. 86-115.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm. defects and a proposal for a new classification of the bull. spermogram. **Nordisk Veterinærmedicin**, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973

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**, v. 104, n. 4, p. 934-942, 2011.

BROMFIELD, E. G.; AITKEN, R. J.; GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; NIXON, B. Capacitation in the presence of methyl-beta-cyclodextrin results in enhanced zona pellucida-binding ability of stallion spermatozoa. **Reproduction**, v. 147, p. 153-166, 2014.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 4, p. 257-262, 2005.

CARVALHO, M. A. M.; LINHARES, F. R. A.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; COSTA, R. B.; SALES, R. O. Água de coco como diluente para o sêmen de peixes de água doce de fertilização externa. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, p. 203-222, 2014.

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação seminal**, 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

ELLIS, D. H.; GEE, G. F.; MIRANDE, C. M. (editors). **Cranes: their biology, husbandry and conservation**. U.S. Department of the Interior, National Biological Service, Washington D.C. and International Crane Foundation, Baraboo, Wisconsin, in cooperation with the U.S. Fish and Wildlife Service, 1996. XII, 308p.

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

FERNANDES, C. E.; MARTINS, C. Componentes principais da análise de regressão para variáveis do espermograma em touros Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, p. 344. Suplemento 1. Edição dos Anais da 17ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Beberibe, CE, agosto, 2003.

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

FONSECA, V. O. Fisiologia da reprodução. **Curso de Pós-Graduação Latu Sensu Tutoria à Distância Julgamento de Raças Zebuínas**: modulo V. Uberaba: FazuAbcz, v. 1, p.128, 1999.

FOOTE, R. H.; PARKS, R. W. Factors effects preservation and fertility of bull sperm: a brief review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 665-673, 1993.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Avaliação do sêmen. In: AX, R. L.; DALLY, M.; DIDION, A. B.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; ELLIN, M. E. **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 372-373.

HIEMSTRA, S. J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Rome: FAO, 2000. p. 25-35.

HOFFMAN, C. Peregrine to soar off endangered species list. **Endangered Species Bulletin**, v. 23, p. 20–21, 1998.

IUCN. 2018 **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/>> Acesso em: 05 jan. 2018.

JAMIESON, B. G. M. Spermatozoal phylogeny of the vetebrata. In: GLAGNON, C. *The Male Gamete: from Basic Science to Clinical Applications*. Vienna, USA: Cache River Press, 1999, p. 303–331.

KASPEROVICZUS, K. N. **Biologia reprodutiva da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae), da Ilha da Queimada Grande, São Paulo**. 2009. 126 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

LAGERLÖF, N. Morphologische Untersuchungen über. Veranderim sperma bild und in den Hoden bei Bulle mit Verminderter oder auf gehobe ver Fertilitat. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 1, p. 254, 1934.

MARINHO, C. E.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; YAMASAKI, S. C.; SILVEIRA, P. F. Peptidase activities in the semen from the ductus deferens and uterus of the Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Comparative Physiology B**, v.179, p. 635–642, 2009.

MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. 2004. *Bothropoides insularis*. In: **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1**. Available at <<http://www.iucnredlist.org/>> (accessed in 01.05.14).

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, p. 393–399, 2013.

MARTINS, M.; MARQUES, M.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.; HÖGGREN, M.; GREENE, H. W. **Biology of the vipers**. Carmel: Biological Sciences Press, 2002. p. 307-328.

MARTINS, M. I. M.; JUSTINO, R. C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p.136-140, 2015.

MARTINS, M.; SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. V. 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.

MASCARENHAS, R. M.; XAVIER, P. R.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Ejaculados individuais e *pools* de sêmen: diferenças em condições experimentais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 22-26, 2014.

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

MEDEIROS, A. S. L.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 273-276, 2002.

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

MOBERG, G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (Ed.). **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000. p. 1-22.

MONTANHINI, A. M. 2010. **Avifauna da Ilha da Queimada Grande, SP: diversidade, estrutura trófica e sazonalidade**. 2010. 65 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2010.

OLIVEIRA, K. G.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C.; DOMINGUES, S. F. S. Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal de macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118®), em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 617-621, 2010.

OLIVERI, M.; BARTOSKOVA, A.; SPADOLA, F.; MORICI, M.; DI GIUSEPPE, M.; KNOTEK, Z. Method of semen collection and artificial insemination in snakes. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 27, p. 75-80, 2018.

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

PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1498-1517, 2004.

PUKAZHENTHI, B.; WILDT, D. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 33-46, 2004.

PUKAZHENTHI, B.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A.J.; WILDT, D. E. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 77–90, 2006.

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

RONDON, R. M. M.; RONDON, F. C. M.; NUNES, J. F.; ALENCAR, A. A.; SOUSA, F. M.; CARVALHO, M. A. M. Uso da água de coco em pó (ACP®) em diferentes temperaturas como diluente de espermatozóides de capote (*Numida meleagris*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n.4, p. 848-854, 2008.

ROSA, A. N.; SILVA, L. O. C.; NOBRE, P. R. C.; TORRES JR., R. A. A.; AMARAL, T. B. Avaliação genética, zootécnica e funcional de touros. In: AMARAL, T. B.; SERENO, J. R. B.; PELLEGRIN, A. O. (Org.). **Fertilidade, funcionalidade e genética de touros zebuínos – Dados eletrônicos**. Corumbá: Embrapa Pantanal; Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 216p.

SAINT JALME, M.; P. GAUCHER, P.; PAILLAT, P. Artificial inseminations in houbara bustards (*Chlamydotis undulata*): influence of the number of spermatozoa and insemination frequency on fertility and ability to hatch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 93–103, 1994.

SAMOUR, J. H.; MARKHAM, J. A.; MOORE, H. D. M.; WATSON, P. F. Semen cryopreservation and artificial insemination in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **Journal of Zoology (London)**, v. 216, p. 169–176, 1988.

SCHIEWE, M. C.; BUSH, M.; PHILLIPS, L. G.; CITINO, S.; WILDT, D. E. Comparative aspects of estrus synchronization, ovulation induction, and embryo cryopreservation in the scimitar-horned oryx, bongo, eland, and greater kudu. **Journal of Experimental Zoology**, v. 258, p. 75–88, 1991

SEVER, D. M.; STEVENS, R. A.; RYAN, T. J.; HAMLETT, W. C. Ultrastructure of the Reproductive System of the Black Swamp Snake (*Seminatrix pygaea*). III. Sexual Segment of the Male Kidney. **Journal of Morphology**, v. 252, p. 238–254, 2002.

SILVA, K. B.; MUNIZ-DA-SILVA, D. F.; SILVA, K. M. P.; GARCIA, V. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Hemipenicectomia em jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) – Relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 9-14, 2013.

SILVA, K. B. **Avaliação do espermograma da jararaca-ilhoa, Bothrops insularis, (Serpentes: Viperidae) mantidas em cativeiro**. 2014. 52 p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

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

SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SANTOS, E. A. A.; CASTELO, T. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**, v. 76, p. 1084–1089, 2011.

SILVESTRE, A. M. How to assess stress in reptiles. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 23, n. 3, p. 240-243, 2014.

SNYDER, N. F. R.; DERRICKSON, S. R.; BEISSINGER, S. R.; WILEY, J. W.; SMITH, T. B.; TOONE, W. D.; MILLER, B. Limitations of captive breeding in endangered species recovery. **Conservation Biology**, v. 10, p. 338-348, 1996

STEIN, I. V. **Monitoramento das oscilações anuais nos níveis de testosterona plasmática e andrógenos fecais de machos de jararaca-ilhoa (Bothrops insularis) mantidos em cativeiro**. 2016. 48 p. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

THOMPSON K. V.; MONFORT S. L. Synchronisation of oestrous cycles in sable antelope. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 185–197, 1999.

TONIOLLI, R.; TONIOLLO, G. H.; FRANCESCHINI, P. H.; MORATO, F. M. A. C. Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação *in vitro* e *in vivo*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1072-1079, 2010.

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

TOURMENTE, M.; GIOJALAS, L. C.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm Parameters associated with reproductive ecology in two snake species. **Herpetologica**, v. 67, n. 1, p. 58-70, 2011.

VASSE, Y. Hemipenes. In: BAUCHOT, R. **Snakes: a natural history**. New York: Sterling Publ, 1994. p.102.

VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk-added Tris-glucose extender: *in vitro* and *in vivo* studies. **Theriogenology**, v. 64, p. 720–733, 2005.

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

ZACARIOTTI, R. L.; GRECO, K. F.; FERNANDES, W.; SANT'ANNA, S. S.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Zoo Biology**, v. 26, n. 3, p. 155-160, 2007.

ZACARIOTTI, R. L. **Avaliação reprodutiva e congelação de sêmen em serpentes**. 2008. 98 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

ZIMMERMAN, D.; MITCHELL, M. A.; HEGGEM, B. Collection and characterization of semen from green iguanas (*Iguana iguana*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 12, p. 1536–1541, 2013.

ANEXO

Short-term cold storage of seminal samples of the golden lancehead pitviper

(Bothrops insularis)

Kalena B Silva^{1, †}, Mayra H Frediani², Daniel de S R Angrimani², Ricardo J G Pereira², Selma M A Santos³

¹ Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

³ Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

†Corresponding author: Me. Kalena Barros da Silva, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 – Cidade Universitária, CEP 05508-270 - São Paulo – SP, Brazil. Tel: 55-11-3091-7805; e-mail: kalena.barros@gmail.com

Abstract

The development of seminal biotechnologies such as cooling, freezing, and artificial insemination are essential for the continuity of wildlife conservation programs. In this context, the golden lancehead (*Bothrops insularis*) stands out, since it is critically endangered. The aim of this study was to evaluate the semen viability of *B. insularis* during cooling. Semen samples were collected from 6 *B. insularis* males, diluted with coconut water-based extender (ACP...list vendor and location here) and kept refrigerated at 5°C. The samples were evaluated immediately after the dilution, and after 6, 24 and 48 hours of cooling. Progressive motility (by

CASA), integrity of the plasma membrane and acrosomal integrity were evaluated. Our results show that the semen of the golden lancehead remains viable for up to 48 hours of cooling, demonstrating a possible application of this material in reproductive biotechnologies, such as artificial insemination, cryopreservation, and use in germplasm banks.

Keywords: snake, reproduction, spermatozoa, extenders

Introduction

Classified as critically endangered by the *IUCN Red List of Threatened Species* (Marques et al, 2004), *Bothrops insularis*, also known as golden lancehead, is an endemic pitviper from Queimada Grande Island, 30 km offshore São Paulo coast, Brazil. A density of about 2,100 *B. insularis* in the wild is estimated, but this population may suffer a sharp decrease due to the action of traffickers (Martins et al., 2008). To prevent its extinction, action to preserve this species is required.

When in captivity, most animals exhibit low reproductive rates or even reproductive inactivity as a result of artificial conditions and inadequate management (Snyder et al. 1996). Likewise, this may also happen to *B. insularis*. Moreover, the stress arising from captivity may cause changes in the reproductive system of the snakes, such as hemipenis prolapses, which has already been reported in this species (Silva et al., 2013). Another challenge for the captive breeding program of *B. insularis* is the limited number of animals distributed in a few institutions in Brazil. This is less than necessary to prevent loss of genetic diversity, inbreeding depression, genetic adaptation to captivity, and accumulation of deleterious alleles (Ballou et al., 2010). For this reason, the development of reproductive biotechnologies such as cooling, freezing, and artificial insemination of semen are indispensable for continuing conservation programs, enabling the exchange of genetic material from populations of *B. insularis in situ* and *ex situ*.

Several authors have described semen preservation protocols for snakes using different extenders and cryoprotectants, obtaining distinct with varying results (Mengden et al. 1980;

Fahrig et al., 2007; Mattson et al., 2007; Zacariotti et al., 2011). The applicability of these protocols across species however, is often unknown due to interspecific differences in semen characteristics. Extenders with water-based coconut in powder (ACP® - ACP Biotecnologia, Fortaleza, CE, Brazil) have been tested, providing satisfactory results for dogs (Cardoso et al., 2005), boars (Toniolli et al., 2010), monkeys (Oliveira et al., 2010), agoutis (Silva et al., 2011) and fishes (Linhares et al., 2015). These extenders have the advantage of being adjusted to suit the semen characteristics of the species, and also the easy preparation, because the powder is diluted in distilled water, only. Thus, the aim of this work was to evaluate the viability of *B. insularis* semen during cooling process using the ACP-120® coconut water base, produced for snakes' semen.

Materials and Methods

Animals

Six sexually mature males were (snout-vent length 66.5 ± 3.02 cm) held captive in at the Ecology and Evolution Lab – Butantan Institute (SISBIO license No. 25650-1). The laboratory was kept under natural photoperiod conditions and humidity, and the temperature was maintained around 23°C. Individuals were isolated in clear plastic boxes (56.4×38.5×37.1cm) with small holes on the sides, paperboard in the bottom. Water was provided *ad libitum* and alive mice were fed once a month (15% of the live weight).

Sample and cooling process

Semen was collected in February (2015), utilizing the methodology proposed by Zacariotti et al. (2007) with adaptations. The animals were physically restrained in a plastic tube to clean the vent region with 0.9% saline. Subsequently, pericloacal region was anesthetized (1% Lidocaine, 15 mg/kg, subcutaneously) in order to relax, and expose the urogenital papilla (Lidocaine 1% 15mg/kg, subcutaneously). After 10 minutes, the seminal collection was

performed through massaging in the ventral region of the individual. The semen was collected directly from the genital papilla using capillary tubes (Figure 1). Then, each semen sample was diluted at a ratio of 1:50mL in the ACP-120® extender developed for snakes semen (pH 7.08, 305 mOsm/kg H₂O), and stored in plastic tubes which were kept at 5°C. All samples were evaluated immediately after the dilution (T0) and after 6 (T1), 24 (T2) and 48 hours (T3) of cooling at 5°C.

Assessment of sperm motility

All samples were evaluated using computer-assisted sperm analysis (CASA; HTM-IVOS Ultimate 12.3; Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA), according to a protocol previously described (Iguer-ouada and Verstegen, 2001).

Assessment of plasma membrane and acrosomal integrity

For evaluating plasma membrane permeability, 5µL of semen and 5µL of eosin/nigrosin stain were placed in a warmed microscope slide. After the smear, the slide was evaluated in light microscope (Nikon, Eclipse E200, Japan) in magnification of 1000x. Spermatozoa with pink coloration were classified as membrane-damaged, while intact sperm had no coloration (Lagergren, 1953). For evaluating the acrosome integrity we used Pope et al. (1991) technique, adapted for snakes. A smear of 5µL semen and 5µL of Fast Green/Rose Bengal stain was made, and then evaluated by light microscopy (1000x). We considered the acrosomal region intact when the spermatozoa showed purple color, becoming darker than the post-acrosomal region. The injured acrosome either remained unstained or exhibited a brighter color than the post-acrosomal region. The percentage of stained sperm was analyzed through light microscopy by counting 200 cells.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad InStat® software. The comparison of means of the measured parameters for each cooling period was performed by ANOVA and

Kruskal-Wallis tests. The results were expressed as mean and standard error (mean $\pm$ SEM), and differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

The semen of *B. insularis* showed color ranging from white to yellowish, with creamy and thick consistency, with a volume of 2 to 5 μL . The mean values of seminal parameters evaluated did not change between different times of cooling ($p < 0.05$) (Table 1).

Figure

Discussion

This study represents an important advance in the development of a germplasm bank for this critically endangered species. Results of plasma membrane and acrosome integrity demonstrate that it is certainly possible to maintain the viability of semen for up to 48 hours, and perhaps even longer. This may allow the exchange of genetic material between wild and captive animals. This assertion is based on the results of membrane plasmatic and acrosomal integrity, which did not change for up to 48 hours of cooling. This structural maintenance of sperm provides the necessary viability, motility and ability for the spermatozoa to recognize and bind to the oocyte (Schimming and Vicentini, 2001).

Moreover, the average motility found after 48h cooling in this study (46.50%) was similar to that reported by Silva et al. (2015) in the immediate evaluation of semen using the extender HAM F-10 culture (approximately 40%) during the same season (summer). This shows a major advantage in the use of the coconut water base extender, because ACP9120 is inexpensive and easy to prepare, facilitating the use in the field, since it eliminates the maintenance at low temperatures until the time of dilution.

Conclusion

1. The semen samples diluted in ACP-120® stored under refrigeration for up to 48 hours were considered viable for use in artificial insemination.
2. This data allows the standardization of artificial insemination techniques to enable the exchange of genetic material between populations of *B. insularis ex situ* and *in situ*.

Conflict of interest statement

None

Acknowledgements

The author is grateful to CAPES for funding this research, the ACP Biotechnology, sending the ACP-120® without any costs, and the Andrology Laboratory, at the Department of Animal Reproduction (FMVZ-USP), where seminal analyses were performed.

References

- Ballou JD, Lees C, Faust LJ, et al. 2010. Demographic and genetic management of captive populations. In: Kleiman DG, Thompson KV, Baer CK. Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management (2nd. Edition). Chicago: The University of Chicago Press, p 219-252.
- Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM. 2005. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. Anim. Reprod., 2(4):257-262.

Fahrig, BM, Mitchell, MA, Eilts, BE, Paccamonti, DL, 2007. Characterization and cooled storage of semen from corn snakes (*Elaphe guttata*). J Zoo Wildl Med. 38:7-12.

Iguer-ouada M, Verstegen JP. 2001. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. Theriogenology. 55:733-749.

Kasperoviczus KN, 2009. Biologia reprodutiva da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae), da Ilha da Queimada Grande. [dissertação], São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Lagergren CG. 1953. On the eosin-nigrosin stain and some other methods for the appraisal of sperm vitality with special reference to practical application. Anna di Ost e Gin. 75:998-1005.

Linhares FRA, Salmito-Vanderley CSB, Carvalho MAM, Oliveira FCE, Nunes JF. 2015. Cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum criopreservados em água de coco em pó ACP-104®. Arq Bras Med Vet Zootec. 67(5): 1313-1320.

Marques OAV, Martins M, Sazima I, 2004. *Bothrops insularis*. The IUCN Red List of Threatened Species, Available in: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T2917A9493475.en>. (accessed in 08.07.18).

Martins M, Sawaya RJ, Marques OAV. 2008. A first estimate of the population size of the critically endangered lancehead, *Bothrops insularis*. South Am J Herpetol. 3:168–174.

Mattson KJ, Vries AD, McGuire SM et al., 2007. Successful artificial insemination in the corn snake (*Elaphe gutatta*) using fresh and cooled semen. Zoo Biol. 26:363-369.

Mengden AG, Platz GC, Hubbard R, Quinn H, 1980. Semen collection, freezing and artificial insemination in snakes, in: Murphy, JB. Reproductive biology and diseases of captive reptiles. Soc Study Amp and Rep Kansas. p 71-78.

Oliveira KG, Castro PHG, Muniz JAPC, Domingues SFS. Conservação do sêmen e liquefação do coágulo seminal de macaco-prego (*Cebus apella*) em água de coco em pó (ACP-118®), em diferentes temperaturas. 2010. Ciênc. Rural. 40(3)617-621.

Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL. 1991. A Simple Staining Method for Evaluating Acrosomal Status of Cat Spermatozoa. *J Zoo Wildlife Med.* 22:87-95.

Silva MA, Peixoto GCX, Santos EAA et al. 2011. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*, 76:1084–1089.

Silva KB, Muniz-Da-Silva DF, Silva KMP, Garcia VC, Almeida-Santos SM. 2013. Hemipenicectomia em jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) – Relato de caso. *Veterinária e Zootecnia.* 20(3).

Silva KB, Zogno MA, Camillo AB, Pereira RJG, Almeida-Santos SM. 2015. Annual changes in seminal variables of golden lancehead pitvipers (*Bothrops insularis*) maintained in captivity. *Anim Reprod Sci.* 163:144-150.

Schimming BC, Vicentini CA. 2001. Ultrastructural features in the epididymis of the dog (*Canis familiaris* L.). *Anat Histol Embryol.* 30:327–332.

Snyder NFR, Derrickson SR, Beissinger SR, et al. 1996. Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conserv Biol.* 10:338-348.

Toniolli R, Toniollo GH, Franceschini PH, Morato FMAC. 2010. Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação in vitro e in vivo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(5):1072-1079.

Zacariotti RL, Greco KF, Fernandes W, Sant’Anna SS, Guimarães MABV. 2007. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Zoo Biol.* 26:155-160.

Zacariotti RL, Guimarães M, Jansen T, Durrant B. 2011. Cryopreservation of snake semen: are we frozen in time? *Reprod Fertil Dev.* 24:171.

Table 1: Values (mean standard error) of seminal parameters *Bothrops insularis* (n=6) observed in each moment of the cooling time.

	T0	T1	T2	T3
Motility (%)	45.50±14.02	69.83±14.02	70.33±14.02	46.50±14.02
Range	0-92	29-99	29-97	9-85
Progressive Motility (%)	10.66±3.5	10±3.84	9.66±3.50	3.83±3.50
Range	0-30	3-24	6-15	0-15
Intact plasma membrane (%)	84.33±5.31	82.00±5.31	81.33±5.31	65.33±5.31
Range	66-97	66-98	66-92	35-79
Intact acrosome membrane (%)	98.00±0.78	97.66±0.78	97.50±0.78	96.66±0.78
Range	97-99	96-99	95-99	93-98