KALENA BARROS DA SILVA

**Avaliação do espermograma da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis*,
(Serpentes: Viperidae) mantidas em cativeiro**

São Paulo
2014

KALENA BARROS DA SILVA

**Avaliação do espermograma da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis*, (Serpentes:
Viperidae) mantidas em cativeiro**

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Prof. Dra. Selma Maria de Almeida Santos

São Paulo
2014

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.2926
FMVZ

Silva, Kalena Barros da
Avaliação do espermograma da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis*, (Serpentes: Viperidae) mantidas
em cativeiro / Kalena Barros da Silva. -- 2014.
52 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dra. Selma Maria de Almeida Santos.

1. Avaliação de sêmen. 2. *Bothrops insularis*. 3. Espermatozoide. 4. Maturidade sexual. 5. Squamata.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do espermograma da jararacilha *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae)", protocolado sob o nº 2753/2012, utilizando 18 (dezoito) serpentes, sob a responsabilidade do(a) Selma Maria Almeida Santos (Instituto Butantan), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/9/2012.

We certify that the Research "Seminal evaluation in *Bothrops insularis* under captive conditions", protocol number 2753/2012, utilizing 18 (eighteen) snakes, under the responsibility Selma Maria Almeida Santos (Instituto Butantan), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/19/2012.

• São Paulo, 1º de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Kalena Barros da

Título: Avaliação do espermograma da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae), mantidas em cativeiro.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais, Antônio Carlos e Marlene,
meus maiores incentivadores. Acreditaram em
mim e investiram neste sonho, me dando todo
o suporte necessário para chegar até aqui.
Obrigada pela confiança e amor incondicional
a mim sempre dedicados.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de todas as coisas, por seu amor e misericórdia infinita, por ter me permitido chegar até aqui e pelos incontáveis livramentos e bênçãos concedidas.

À minha mãe, esta pessoa maravilhosa, que amo mais que tudo na vida! Por sempre me dar inúmeras demonstrações de amor, dedicação, carinho e resiliência, mesmo nas horas difíceis. Também por sempre me incentivar a buscar meus objetivos, não importando quão distantes eles estivessem.

Ao meu paizinho, minha base, meu exemplo... E sempre tão protetor! Você me deu o suporte que eu precisei ao trilhar novos caminhos, sem nunca deixar de estar por perto para me estender a mão caso necessário! Agradeço a Deus por ter um pai como você!

À Thais Virgínia, não só pelos 10 anos de amizade e companheirismo verdadeiro, mas por tudo que você me acrescentou! Seus conselhos e puxões de orelha certamente têm feito de mim uma pessoa melhor, assim como seu constante incentivo e encorajamento sempre me ajudaram a ir adiante e ultrapassar meus limites! Obrigada por ter acreditado em mim até quando eu mesma não acreditava.

À minha querida orientadora Dra. Selma Almeida Santos, por ter cedido á minha insistência (rs) e confiado em mim há alguns anos atrás mesmo sem me conhecer! Por sempre ter me incentivado nas pesquisas que eu pretendia desenvolver e por sua enorme paciência e carinho, comigo e com todos os seus alunos.

Às queridas Adriana Batista e Maria Amélia Zogno. Sem vocês, este trabalho não teria sido possível! Vocês foram fundamentais em todo o desenvolvimento dele! A Adriana foi peça chave na aquisição de todo o material necessário e a Amelinha foi me orientando em cada etapa! Muito obrigada pela disponibilidade, dedicação e sugestões, vocês foram fundamentais!

Aos colegas do laboratório Adriano Felonne, Kelly Kishi, Karina Banci, Cristiene Martins e Dona Maria! Vocês foram os braços que muitas vezes me faltavam durante as colheitas!!!

À Livia Cristina pela enorme e indispensável ajuda com a estatística! Isso envolveu muito tempo e paciência!

À Karina Kasperoviczus por ter se mostrado sempre disponível e interessada nos nossos frequentes debates sobre os diversos aspectos da reprodução de *B. insularis*, pelos esclarecimentos, críticas e sugestões sempre pertinentes!

Aos meus amigos Karina Maria, Diego Muniz, Fernanda Magno e Ingrid Stein pelos dias e noites incansáveis de coletas e de risadas e pelo essencial apoio em todos os momentos!!!

Às minhas amigas fofíssimas do laboratório Karina Banci, Natalia Torello, Daniela Araújo e Patrícia Marinho! Obrigada pelo apoio e risadas! Adoro vocês!

Aos demais colegas do grupo de pesquisa Henrique Braz, Cláudio Rojas, Verônica Barros, Letícia Sueiro, Igor Popovic e Viviane Garcia, pelas sugestões, críticas e orientações que certamente foram muito úteis em algum ponto deste trabalho.

Aos demais funcionários do LEEV, que juntos fizeram com que toda a engrenagem do laboratório funcionasse da melhor maneira possível, certamente contribuindo para o bom andamento deste experimento.

A todos os funcionários e colegas do Programa de pós-graduação em Anatomia dos animais domésticos e silvestres da FMVZ-USP pela cordialidade e acolhimento e à CNPq pela bolsa a mim concedida.

E a todos aqueles que torceram por mim, e que, embora não tenham sido citados, não foram de maneira alguma esquecidos! Muito Obrigada!

“De vez em quando a mente do homem é esticada por uma ideia nova ou sensação e nunca mais se reduz às suas antigas dimensões.”

(Oliver Wendell Holmes)

RESUMO

SILVA, K. B. da. **Avaliação do espermograma da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae), mantidas em cativeiro** [Seminal evaluation of the golden lancehead, *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae), under captive conditions]. 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o sêmen da jararaca ilhoa, *Bothrops insularis*, quanto ao volume, motilidade, vigor e concentração, além de verificar se estes parâmetros estão relacionados ao comprimento ou massa dos animais ou se variam ao longo das estações, uma vez que esta espécie possui ciclo reprodutivo sazonal. Para tanto, foram avaliadas amostras de sêmen de 18 machos, com comprimento rostro-cloacal (CRC) variando de 43,5 a 73,70 cm, pertencentes ao plantel do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, entre os meses de agosto de 2012 e maio de 2013. O sêmen de *Bothrops insularis* apresentou coloração variando de esbranquiçada a amarelada e consistência cremosa e espessa. Foi possível observar amostras de sêmen viáveis em todos os 18 animais avaliados, indicando que animais com CRC igual ou acima de 43,5 cm já são sexualmente maduros. O espermatozoide de *Bothrops insularis* é filiforme, possui cabeça alongada, fina e com formato pontiagudo, seguindo o padrão morfológico descrito para outros Squamata. Não foi observada nenhuma relação entre o comprimento, massa e cada um dos parâmetros seminais avaliados. Foi observada variação significativa da motilidade e da concentração do sêmen de *Bothrops insularis* entre as estações, porém o volume e o vigor do sêmen não variaram. Foi no outono, época de cópula da espécie, que o sêmen apresentou as maiores médias para os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Avaliação de sêmen. *Bothrops insularis*. Espermatozoide. Maturidade sexual. Squamata.

ABSTRACT

SILVA, K. B. da. **Seminal evaluation of the golden lancehead, *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae), under captive conditions.** [Avaliação do espermograma da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae), mantidas em cativeiro]. 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

This study aimed to evaluate sperm parameters of the golden lancehead, *Bothrops insularis*, including appearance, sperm motility, vigor, volume and concentration, determine if these parameters varied with body size or weight and to verify whether these vestments vary throughout seasons, since this species has a seasonal reproductive cycle. Samples of semen of 18 males with snout-vent length (SVL) ranging from 43.5 to 73.70 cm, belonging to the squad of the Ecology and Evolution Laboratory at Instituto Butantan, were collected between August 2012 and May 2013. Sperm color from *Bothrops insularis* ranged from whitish to yellowish, and a creamy and thick consistency. Viable sperm was observed in samples from all 18 males evaluated, indicating that animals with SVL equal to or above 43.5 cm are sexually mature. Sperm of *Bothrops insularis* is thready, has elongated, thin and pointed shaped head, following the morphological pattern described for other Squamata. No relationship between length, mass and each of seminal parameters evaluated was observed. Significant variation of concentration and motility of semen from *Bothrops insularis* between seasons was observed, but volume and vigor did not change. It was during Fall, mating season of the species, that sperm had the highest means for all parameters evaluated.

Keywords: Sperm analysis. *Bothrops insularis*. Sperm. Sexually mature. Squamata.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Jararaca-ilhoa (<i>Bothrops insularis</i>).....	24
Figura 2 -	Ilha da Queimada grande, São Paulo.....	25
Figura 3 -	Biotério do Laboratório de ecologia e Evolução do Instituto Butantan.....	25
Figura 4 -	Cloaca de <i>Bothrops jararaca</i>	27
Figura 5 -	Sêmen sendo colhido da papila genital de <i>Bothrops insularis</i>	28
Figura 6 -	Espermatozoides normais de <i>Bothrops insularis</i> sob microscopia de luz.....	33
Figura 7 -	Espermatozoides defeituosos de <i>Bothrops insularis</i>	35
Figura 8 -	Relação entre os parâmetros seminais e CRC dos animais estudados.....	36
Figura 9 -	Relação entre os parâmetros seminais e a massa dos animais estudados.....	37
Quadro 1 -	Prevalência das alterações morfológicas encontradas em sêmen de <i>Bothrops insularis</i> mantidas em cativeiro.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios e desvio padrão (Média $\pm$ DP) e valores mínimos e máximos encontrados nos parâmetros estudados para machos adultos de <i>Bothrops insularis</i> mantidos em cativeiro (n=18).....	32
Tabela 2 -	Valores médios e desvio padrão (Média $\pm$ DP) das alterações da morfologia espermática encontradas no sêmen de machos adultos (n=13) de <i>Bothrops insularis</i> mantidas em cativeiro.....	33
Tabela 3 -	Valores médios e desvio padrão (Média $\pm$ DP) dos parâmetros seminais estudados em machos adultos de <i>Bothrops insularis</i> mantidas em cativeiro, de acordo com as estações climáticas.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>Bothrops insularis</i> – REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2 OBJETIVOS.....	22
3 MATERIAL E MÉTODO.....	24
3.1 ANIMAIS.....	24
3.2 BIOMETRIA E PESAGEM.....	26
3.3 COLHEITA DE SÊMEN.....	26
3.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	28
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS.....	32
4.1 ASPECTOS GERAIS DO SÊMEN DE BOTHROPS INSULARIS.....	32
4.1.1 Morfologia espermática.....	32
4.2 AVALIAÇÃO DO SÊMEN EM RELAÇÃO À BIOMETRIA DOS ANIMAIS.....	36
4.3 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE DOS PARÂMETROS SEMINAIS.....	38
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	47

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A reprodução natural de espécies ameaçadas tem se tornado um grande desafio para aqueles que buscam a criação ou a manutenção de um banco de reserva genômica em zoológicos e criadouros.

Indivíduos mantidos em cativeiro sofrem diversos estímulos estressores ocasionados por alterações em seus hábitos, tais como a proximidade forçada com suas presas e/ou predadores, superpopulação, dietas inadequadas, falta de privacidade, formação de grupos sociais impostos além da grande proximidade com seres humanos (MORGAN; TROMBORG, 2007). Estes fatores frequentemente acarretam no insucesso reprodutivo de populações cativas. Portanto, ao considerarmos que a manutenção da diversidade genética é dependente da reprodução, o uso de biotecnologias reprodutivas é imprescindível na preservação de espécies ameaçadas por meio do desenvolvimento de métodos que melhorem os índices reprodutivos destes animais (HOWARD, 1993).

Segundo a Associação Mundial de Zoológicos e Aquários (*World Association of Zoos and Aquariums* - WAZA), anteriormente conhecida como União Internacional de Diretores de Jardins Zoológicos (INTERNATIONAL UNION OF DIRECTORS OF ZOOLOGICAL GARDENS, 1993), alguns dos principais benefícios do uso de técnicas de reprodução assistida em programas de conservação são:

1. Possibilitar a troca de material genético entre zoológicos ou criadouros conservacionistas. O transporte de sêmen é econômico e reduz os riscos envolvidos no deslocamento do animal e consequentemente a transmissão de doenças;
2. Permitir a reprodução de animais com alguma limitação física ou comportamental, principalmente em casos de espécimes com linhagem de representativo potencial genético que não possam ser perdidas;
3. Permitir o rápido crescimento populacional mesmo quando existam poucos indivíduos;
4. Gerenciar a razão sexual das populações pelo uso seletivo de embriões de um dos sexos;
5. Determinar com exatidão a prole oriunda de cada indivíduo;

6. Promover a formação de bancos de gametas e embriões das espécies de interesse.

As técnicas utilizadas na reprodução assistida tanto para animais domésticos quanto selvagens são similares. Tais técnicas consistem basicamente na colheita, avaliação e criopreservação do sêmen, inseminação artificial (IA), fertilização in vitro (FIV) e transferência de embriões (TE).

A análise da qualidade do sêmen, em especial, é uma poderosa ferramenta para a criação de bancos de genes visando à conservação de espécies ameaçadas, pois é capaz de avaliar de maneira rápida e confiável o potencial fertilizante dos machos que serão utilizados em programas de reprodução assistida (HOWARD et al., 1991; GOERITZ et al., 2003).

Contudo, a conservação e a restauração da fauna selvagem devem acontecer concomitantemente com a preservação do habitat natural, para que a fauna em risco consiga futuramente obter seus próprios recursos e assegurar sua sobrevivência (CULLEN JR; RUDRAN; VALLADARES-PÁDUA, 2003).

Em animais com sazonalidade reprodutiva, particularmente, torna-se necessário um conhecimento ainda maior de seus ciclos reprodutivos, uma vez que os diversos eventos e etapas envolvidos no processo reprodutivo sofrem grandes influências das condições climáticas e ambientais. Pope, Gómez e Dresser (2006) relatam que a obtenção de espermatozoides viáveis para a fertilização in vitro (FIV), bem como a taxa de clivagem de embriões, podem ser influenciadas pela variação no ciclo reprodutivo ao longo das estações do ano.

Os ciclos reprodutivos dos répteis são influenciados tanto por fatores endógenos quanto exógenos (FITCH, 1982; MATHIES, 2011). No caso de serpentes de regiões temperadas, a temperatura influencia a recrudescência testicular, reiniciando o crescimento do epitélio germinativo após um período de dormência (ALDRIDGE, 1975; DUVALL; GIULIETTE; JONES, 1982). Embora em regiões tropicais existam condições climáticas mais estáveis, com temperaturas mais elevadas e grande disponibilidade de alimento ao longo de todo o ano, várias espécies neotropicais também apresentam ciclos reprodutivos sazonais, como é o caso das serpentes do gênero *Bothrops* (MARQUES, 1996; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2007)

Nas últimas décadas, diversas técnicas de colheita de sêmen em serpentes têm sido testadas, sempre buscando se adaptar às particularidades da espécie em questão e aos próprios limites impostos pela anatomia do animal (FITCH, 1960; MENGDEN 1980; SCHULTE-

HOSTEDDE; MONTGOMERIE, 2006; FAHRIG et al, 2007; TOURMENTE; GIOJALAS; CHIARAVIGLIO, 2011).

O sistema reprodutor masculino dos Squamata (serpentes, lagartos e anfisbenas) é formado por um par de testículos alojados na cavidade celomática. Cada testículo é formado por túbulos seminíferos, células intersticiais e vasos sanguíneos, que estão envoltos por uma bainha de tecido conjuntivo (DeNARDO, 2006). Os túbulos seminíferos ligam-se à rede testis, que transporta os espermatozoides para os ductos eferentes, os quais estão ligados ao epidídimo, que, em seguida, conecta-se com o ducto deferente (TRAUTH; SEVER, 2011). Este, por sua vez, liga o testículo à papila genital na cloaca, por onde o sêmen é liberado, em uma região muito próxima à base do hemipênis – o órgão copulatório das serpentes. Os hemipenes são bolsas membranosas, tubulares, que se localizam na base da cauda. Neles é possível observar a presença de sulcos espermáticos pelos quais o sêmen escorre, durante a cópula, até o interior do trato genital da fêmea, uma vez que répteis não possuem uretra peniana (VASSE, 1994; DOWLING; SAVAGE, 1960).

Fitch (1960) foi pioneiro na tentativa de realizar a colheita de sêmen em serpentes, através da compressão do terço final do animal. Porém, esta metodologia resultava frequentemente na contaminação da amostra por fezes e urato. Este fato se apresenta com uma das principais limitações encontradas em praticamente todas as metodologias testadas. Esta contaminação se deve à proximidade da região da papila genital com o trato urinário nos machos (OLIVEIRA et al., 2004).

Posteriormente, Mengden et al (1980) conseguiram obter sêmen colhendo-o diretamente da cloaca, com o auxílio de uma seringa, apenas com massagens digitais ventrais no terço final dos animais, reduzindo a contaminação das amostras. O uso de delicadas massagens ventrais ou ventro-laterais ainda foi empregado por vários autores, que obtiveram êxito na colheita de sêmen (FAHRIG et al, 2007; SCHULTE-HOSTEDDE; MONTGOMERIE, 2006; TOURMENTE et al., 2006; MATTSON et al, 2007). Entretanto, em animais com musculatura fortemente desenvolvida, como é o caso de boídeos, a contração muscular decorrente da contenção do animal torna esta técnica inviável, levando o profissional a buscar outros meios de obtenção de sêmen (TOURMENTE et al., 2007; TOURMENTE; GIOJALAS; CHIARAVIGLIO, 2011).

A eletroejaculação também já foi empregada algumas vezes na colheita de sêmen, apresentando resultados controversos. Quinn, Blasedel e Platz (1989) utilizaram este método seguido de massagens digitais em *Thamnophis marcianus*. No entanto, houve contaminação da amostra. Já em *Boa constrictor occidentalis* a eletroejaculação mostrou-se eficaz, sendo

realizada a introdução de uma *probe* de plástico na base da cloaca, seguida da realização de movimentos crânio-caudais contínuos, a fim de estimular a eversão do hemipênis e consequente ejaculação (TOURMENTE et al, 2007).

Zacariotti et al. (2007) aliaram o uso de massagens digitais ventrais no terço final do animal com o uso de anestesia local, obtendo assim um maior relaxamento da região cloacal, o que facilitou o procedimento de colheita. O sêmen então foi colhido diretamente da papila genital com o auxílio de uma seringa, minimizando significativamente a contaminação do material.

A colheita de sêmen pela remoção dos ductos deferentes em sua totalidade, ou de um pequeno fragmento, também é bastante utilizada, principalmente em casos onde se faz imprescindível a pureza da amostra ou quando nenhuma das técnicas preconizadas mostra-se adequada à espécie em questão ou até mesmo às habilidades do profissional. A remoção dos ductos pode ocorrer *post-mortem* (LANGLADA; LAPORTA-FERRERA; SANTOS, 1991; MOZAFARI; ABDOLHOSSEIN; FATEMEH, 2012, TOURMENTE; GIOJALAS; CHIARAVIGLIO, 2011; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004) ou pela realização de uma laparotomia, na qual é feita uma incisão ventral entre o terço médio e final do animal a fim de se acessar os ductos deferentes (LANGLADA; ALMEIDA-SANTOS; LAPORTA-FERRERA, 1994; MARINHO et al., 2008; 2009).

1.1 REVISÃO DA LITERATURA – *Bothrops insularis*

A jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*), descrita em 1921 pelo herpetólogo Afrânio do Amaral, 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. Pertence ao chamado “grupo jararaca” que é representado atualmente por quatro espécies: *Bothrops jararaca*, *Bothrops alcatraz*, *Bothrops otavioi* e a *Bothrops insularis* (CARRASCO et al., 2012; BARBO et al., 2012; FENWICK et al., 2009; GRAZZIOTIN et al., 2006; MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002a). A jararaca comum, *Bothrops jararaca*, distribui-se amplamente no Brasil desde o sul da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul, incluindo

diversas ilhas continentais (HOGE; ROMANO-HOGE, 1981; CAMPBELL; LAMAR, 2004; CICCHI et al., 2007; CENTENO; SAWAYA; MARQUES, 2008; SUZUKI; FURTADO, 2008). No entanto, as demais espécies do grupo são endêmicas de ilhas do litoral de São Paulo.

A Ilha da Queimada Grande possui aproximadamente 430 mil m², é considerada Área de Relevante Interesse Ecológico (AIRE) e pertence à Área de Proteção Ambiental (APA) das cidades de Cananéia-Iguape-Peruíbe. Inabitada pelo homem, a Ilha possui vegetação típica de Mata Atlântica e apenas algumas espécies de vertebrados, dentre elas, duas espécies de morcegos, três de anfíbios endêmicos, três espécies de lagartos e duas de anfisbenas, além de várias espécies de aves residentes e migratórias. São conhecidas duas espécies de serpentes que habitam a ilha, a dormideira *Dipsas albifrans* e a jararaca ilhoa *Bothrops insularis* (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002b).

Acredita-se que *B. insularis* possui um ancestral comum a *B. jararaca* (GRAZZIOTIN et al., 2006), e que a especiação entre elas tenha se dado de forma alopátrica há aproximadamente 11.000 anos, decorrente do isolamento geográfico produzido pela elevação do nível do mar após a última glaciação (SALOMÃO et al., 1999; MARTINS et al., 2001; MARQUES et al., 2002b; WÜSTER et al., 2005).

Considerada uma espécie criticamente ameaçada de extinção, *Bothrops insularis* está incluída na “Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção” e na “Lista Vermelha das espécies Ameaçadas da IUCN” (*International Union for Conservation of Nature*, 2013). Segundo Martins et al. (2001), estima-se que existam aproximadamente dois mil indivíduos de *B. insularis* na ilha, porém existem indícios que apontam uma acentuada diminuição desta população em virtude do tráfico destes animais, que visa atender a demanda de colecionadores e biopiratas.

Apesar de pertencer ao mesmo grupo da jararaca do continente, a jararaca-ilhoa ainda guarda algumas particularidades em sua biologia, como a dieta na fase adulta, constituída basicamente por aves (MARTINS et al., 2002), o hábito arborícola e diurno (AMARAL, 1921b, 1927) e a ação diferenciada de seu veneno (COGO et al., 1993; ZELANIS et al., 2008). Morfologicamente também possui características particulares, como sua coloração pardo-amarelada e o corpo comprimido lateralmente com cauda ligeiramente preênsil, sendo estas duas últimas características comumente encontradas em serpentes arborícolas (AMARAL, 1921B, 1927; MARTINS et al., 2001).

Hoge et al. (1959) realizaram um estudo pioneiro a respeito da biologia reprodutiva da jararaca-ilhoa. Relataram a existência de indivíduos intersexuados em sua população já que as fêmeas possuíam órgãos copulatórios masculinos (hemipênis) de tamanho e grau de desenvolvimento variado. Décadas depois, o trabalho realizado por Kasperoviczus (2009) foi elucidou mais questões referentes ao ciclo reprodutivo da espécie.

O ciclo reprodutivo da espécie é considerado sazonal e suas estratégias reprodutivas são semelhantes às da espécie continental *B. jararaca*. Nas fêmeas, a vitelogênese ocorre no outono e inverno paralelamente ao período de acasalamento, já a ovulação e fertilização ocorrem na primavera, com nascimento dos filhotes no final do verão e início do outono. Isto é possível devido à capacidade que as fêmeas possuem de realizar estocagem de espermatozoides durante o outono e inverno. (KASPEROVICZUS, 2009).

O menor macho sexualmente maduro de *Bothrops insularis* encontrado por Kasperoviczus (2009), em coleção, possuía 505 mm de comprimento rostro-cloacal e a menor fêmea madura, 555 mm. Devido à escassez de trabalhos sobre fisiologia da reprodução em répteis, tais dados têm sido utilizados como parâmetros para que se estime quando estes animais atingem a maturidade sexual.

A via espermática tem início com a produção de espermatozoides nos testículos, dentro dos túbulos seminíferos. Quando a espermatogênese é concluída, os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos e por fim, ficam estocados até a cópula nos ductos deferentes. Este ciclo nos machos tem início no outono e continua até metade da primavera quando as células germinativas (epitélio seminífero) começam a entrar em dormência, permanecendo assim até o final do verão (KASPEROVICZUS, 2009).

Diante da carência de estudos reprodutivos mais aplicados em serpentes, em especial quando se trata de uma espécie seriamente ameaçada de extinção como é o caso de *Bothrops insularis*, é de suma importância o desenvolvimento de trabalhos que busquem respostas, esclarecendo assim as muitas dúvidas ainda presentes em relação ao processo reprodutivo deste animal. Neste contexto, a análise da qualidade do sêmen é ferramenta fundamental em programas de conservação *ex situ*, realizando a seleção de machos com alto potencial reprodutivo que poderão ser usados com segurança tanto em programas de manejo reprodutivo quanto na criação de bancos de genes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Avaliar as características do sêmen de machos de jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) mantidas em cativeiro;
- Verificar se existe relação entre biometria, massa e cada um dos parâmetros seminais de *Bothrops insularis* (volume, motilidade, vigor e concentração);
- Verificar se os parâmetros seminais da jararaca-ilhoa variam de acordo com as estações climáticas ao longo do ano.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram avaliados todos os 18 exemplares machos de *Bothrops insularis* (Figura 1) pertencentes ao biotério do Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan, sendo oito adultos, que possuíam comprimento rostro-cloacal (CRC) igual ou maior que 50,5 m, que segundo Kasperoviczus (2009; 2013) é o comprimento mínimo no qual os machos desta espécie atingem a maturidade sexual, e 10 filhotes, com CRC inferior a 50,5 cm. Os oito indivíduos adultos foram coletados na Ilha da Queimada Grande em 2009 (Figura 2), encontrando-se em cativeiro desde então; e os outros dez animais nasceram em cativeiro em 2010.

Os animais foram mantidos individualizados em caixas plásticas transparentes com tampa e laterais perfuradas e forradas com papelão corrugado (Figura 3). A dieta foi composta de camundongos (*Mus musculus*), perfazendo um total de 15% do peso do indivíduo e oferecidos em intervalos regulares de 30 dias. Foi oferecida água *ad libitum* aos animais.

Figura 1- Jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*).

FOTO: Diego Muniz (2013).

Figura 2: Ilha da Queimada Grande, São Paulo.

FOTO: Diego Muniz (2013).

Figura 3- Biotério do Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan

Foto: Karina Kasperoviczus (2011)

3.2 BIOMETRIA E PESAGEM

Todos os animais foram submetidos à tomada de dados biométricos trimestral, concomitante com as colheitas de sêmen, composta por biometria (especificamente a tomada do comprimento rostro-cloacal - CRC) e pesagem.

3.3 COLHEITA DE SÊMEN

O sêmen foi colhido trimestralmente no LEEV (Instituto Butantan), seguindo a metodologia proposta por Mengden et al. (1980) e modificada por Zacariotti et al. (2007). As colheitas foram realizadas em dias que correspondiam aproximadamente ao meio de cada estação climática, tendo sido realizadas nos meses de agosto de 2012 (inverno), novembro de 2012 (primavera), fevereiro de 2013 (verão) e maio de 2013 (outono). Foi realizada apenas uma colheita de sêmen em cada animal por estação, sendo esta repetida sete dias depois apenas nos casos em que o animal não respondeu a primeira tentativa.

Para a colheita do sêmen, os animais foram contidos fisicamente em tubo plástico e então se procedeu com a limpeza da região em torno da cloaca utilizando-se soro fisiológico para remoção de sujidades maiores que são frequentes no local. Cada animal recebeu anestesia local na região pericloacal em quatro pontos distintos, visando o relaxamento e exposição da papila urogenital (Figura 4). Para tanto, utilizou-se Lidocaína na concentração de 1% (Bravet®) e dose de 15mg/kg, via subcutânea.

Figura 4- Cloaca de *Bothrops jararaca*.

Foto: Henrique B. Braz, 2012.

Legenda: Letra **A** indica o reto e letras **B** indicam a base de cada hemipênis. O asterisco indica a papila genital.

Após a anestesia, aguardou-se um período de tempo que variou de 7 a 15 minutos para que se obtivesse o efeito desejado. A colheita iniciava-se 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 (Figura 5) com o uso de micropipetas automáticas de volume variável (0,5-10 μ L, Eppendorf®). O sêmen colhido era então acondicionado em microtubos de 1,5 mL para as devidas avaliações.

Figura 5- Sêmen sendo colhido da papila genital em macho *Bothrops insularis*.

Foto: Cristiene Martins (2013).

3.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

O sêmen foi avaliado imediatamente após a colheita, quanto aos seguintes parâmetros:

- Volume: estimado com o uso de micropipetas de volume variável (0,5-10 μ L, Eppendorf®).
- Coloração: avaliada momento da colheita diretamente na pipeta ou tubo de armazenamento.
- Motilidade e Vigor: devido sua elevada concentração, o sêmen foi previamente diluído na proporção de 1:1000 em meio de cultura de células (HAM – F10, Sigma) e observado em microscópio de luz (Eclipse E100, Nikon) sob o aumento de 100 vezes. A motilidade foi avaliada levando-se em consideração qualquer tipo de movimento, numa escala de 0 a 100% de espermatozoides móveis.

O vigor espermático foi avaliado numa escala de 0 a 5, onde:

- 0 - ausência de movimentos;
- 1 - movimentos laterais leves sem progressão;
- 2 - movimentos laterais moderados com progressão eventual;
- 3 - movimentos progressivos frequentes, porém lentos;
- 4 - movimentos progressivos constantes com velocidade moderada;
- 5 - movimentos progressivos rápidos.

- Concentração espermática: o sêmen foi diluído na proporção de 1:1000 em solução de formol salino para a determinação de sua concentração. A contagem foi realizada em câmara hemantimétrica de *Neubauer "improved"* com o uso de microscópio de luz (Eclipse E100, Nikon), sob o aumento de 400x.

A avaliação da morfologia espermática foi realizada posteriormente no setor de Biologia Molecular do LEEV, pela observação sob microscopia óptica com aumento de 1000x de lâminas de esfregaço e câmaras úmidas preparadas com sêmen previamente diluído, sendo feita a contagem de 100 células para estimativa de espermatozoides normais/defeituosos. Para a avaliação da morfologia espermática, foram colhidas amostras de 13 animais durante o mês de Agosto de 2013.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando-se o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 11.0).

As amostras foram primeiramente testadas quanto a sua distribuição e homogeneidade de variâncias através dos testes Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e Levene. Uma vez obedecida estas premissas, foi realizado o teste ANOVA para a análise das variâncias. Nos casos em que os dados não obedeceram às premissas, optou-se pela realização do teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

Para testar a influencia do comprimento ou da massa do animal sobre cada um dos parâmetros seminais avaliados foram realizadas análises de regressão linear.

O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%, portanto, para $p < 0,05$ considerou-se que havia diferenças estatísticas entre as variáveis.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ASPECTOS GERAIS DO SÊMEN DE *B. insularis*

O sêmen de *B. insularis* apresentou coloração variando de esbranquiçada a ligeiramente amarelada e consistência cremosa e bastante espessa. O CRC e a massa média dos 18 animais avaliados foram de 58,50 cm e 90,25 gramas respectivamente. O macho com menor CRC possuía 43,5 cm e o maior, 73,70 cm, e foram obtidas amostras viáveis de sêmen de todos os animais avaliados.

Na tabela a seguir (Tabela 1), estão apresentadas as médias gerais dos dados obtidos ao longo de todo o experimento, tanto para o sêmen como para a biometria.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão (Média $\pm$ DP) e valores mínimos e máximos encontrados nos parâmetros estudados para machos adultos de *Bothrops insularis* mantidos em cativeiro (n=18)

	Média $\pm$ DP	Mínimo e máximo
CRC (cm)	58,50 $\pm$ 10,18	43,5 - 73,70
Massa (g)	90,25 $\pm$ 42,34	30 – 170
Volume (μ L)	3,05 $\pm$ 1,19	0,5 – 6
Motilidade (%)	60,37 $\pm$ 26,61	0 – 95
Vigor	3,1 $\pm$ 1,11	0 - 5
Concentração ($\times 10^9$ sptz/mL)	1,36 $\pm$ 0,77	0,2 - 3,15

4.1.1 Morfologia espermática

Foi realizada a avaliação da morfologia espermática do sêmen de 13 indivíduos de *B. insularis* colhido durante o inverno, em Agosto de 2013.

O espermatozoide de *B. insularis* (Figura 6) é filiforme e claramente dividido em três regiões: cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça é alongada, fina e possui formato pontiagudo, é ligeiramente curva e na sua extremidade é possível visualizar o acrossoma. A

peça intermediária possui aproximadamente o mesmo diâmetro ao longo de toda sua extensão e, após a mesma, está a cauda, menor e mais fina se comparada a peça intermediária.

Figura 6 - Espermatozoides normais de *B. insularis* sob microscopia de luz

Foto: Kalena Barros (2013)

Legenda: Letra **A** indica cauda, **B**, peça intermediária e **C** cabeça.

Quanto aos defeitos espermáticos, a maior porcentagem de alterações foi referente à região de peça intermediária, seguida por alterações na cauda. Na região da cabeça foi encontrada a menor porcentagem de defeitos (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão (Média $\pm$ DP) das alterações da morfologia espermática encontradas no sêmen de machos adultos (n=13) de *Bothrops insularis* mantidos em cativeiro

	Defeitos de cabeça (%)	Defeitos de peça intermediária (%)	Defeitos de cauda (%)	Total de células defeituosas	Total de células normais
n=13	3,53 $\pm$ 2,69	36,61 $\pm$ 17,94	5,61 $\pm$ 4,05	45,76 $\pm$ 17,34	54,23 $\pm$ 17,34

As alterações morfológicas por enrolamento de peça intermediária e cauda foram as mais comuns encontradas em *B. insularis*, com destaque para o forte enrolamento da peça intermediária, encontrado em todas as amostras de sêmen avaliadas (Figura 7 e Quadro 1).

Quadro 1 – Prevalência das alterações morfológicas encontradas em sêmen de *Bothrops insularis* mantidas em cativeiro.

Alterações		(%)
Cabeça		
	Macrocefalia	34,61
	Acrossoma dobrado	23,07
	Gota proximal	15,38
	Cabeça solta anormal	31,53
Peça intermediária		
	Fortemente enrolada	100
	Fortemente dobrada	48,46
	Enrolada	61,53
Cauda		
	Fortemente enrolada	84,61
	Enrolada	61,53
	Dobrada	46,15

Figura 7 - Espermatozoides defeituosos de *B. insularis*.

Foto: Kalena Barros (2013)

Legenda: Espermatozoides apresentando enrolamentos de cauda (letra **A** e **B**) e de peça intermediária (letras **C**, **D**, **E** e **F**).

4.2 AVALIAÇÃO DO SÊMEN EM RELAÇÃO À BIOMETRIA DOS ANIMAIS

As análises de regressão linear realizadas apontaram que não existe relação entre o comprimento rostro cloacal (CRC) (Figura 8) e nem entre a massa (Figura 9) do indivíduo e os parâmetros seminais em *B. insularis*.

Figura 8 - Relação entre os parâmetros seminais e o CRC nos animais estudados.

Figura 9 - Relação entre os parâmetros seminais e a massa nos animais estudados.

4.3 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE DOS PARÂMETROS SEMINAIS

Na tabela a seguir (Tabela 3) estão apresentados os resultados referentes à avaliação dos parâmetros seminais de *Bothrops insularis* de acordo com as estações do ano.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão (Média $\pm$ DP) dos parâmetros seminais estudados em machos adultos de *Bothrops insularis* mantidos em cativeiro, de acordo com as estações climáticas.

	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Volume (μ L)	2,5 $\pm$ 1,16 ^a	3 $\pm$ 1,37 ^a	3 $\pm$ 0,95 ^a	3,6 $\pm$ 1,03 ^a
Motilidade (%)	67,73 $\pm$ 24,93 ^{a,b}	50,93 $\pm$ 30,99 ^{a,b}	49,09 $\pm$ 22,34 ^a	73,33 $\pm$ 19,42 ^b
Vigor	3,09 $\pm$ 0,94 ^a	2,75 $\pm$ 1,43 ^a	3,19 $\pm$ 0,94 ^a	3,4 $\pm$ 0,96 ^a
Concentração ($\times 10^9$ sptz/mL)	0,564 $\pm$ 0,36 ^b	1,49 $\pm$ 0,82 ^a	1,55 $\pm$ 0,60 ^a	1,69 $\pm$ 0,72 ^a

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

O volume seminal e o vigor espermático não variaram significativamente ao longo das estações do ano, embora em ambos os parâmetros as médias do outono tenham sido maiores.

Quanto á motilidade, a média obtida no verão foi muito menor e significativamente diferente da obtida no outono, mas não diferiu das médias do inverno nem da primavera. Já a motilidade média do outono, onde foi encontrada a maior média, embora tenha diferido da média do verão, também não diferiu das médias do inverno e primavera.

Em relação à concentração, somente a média do inverno foi estatisticamente diferente das outras estações, que por sua vez não diferiram entre si, sendo que a maior média foi obtida no outono e a menor, no inverno.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A grande maioria dos trabalhos sobre biologia reprodutiva de serpentes utilizam espécimes conservados em coleções zoológicas como material de estudo e avaliam o tamanho dos testículos e opacidade/enovelamento dos ductos deferentes para determinar a maturidade sexual dos machos, seguindo o proposto por Shine (1980; 1982). No entanto, para que seja possível assegurar a época em que este evento ocorre, são necessários mais estudos acerca da fisiologia reprodutiva do animal.

A avaliação seminal realizada neste trabalho possibilitou a elucidação de várias questões a respeito das características do sêmen desta espécie, e os parâmetros obtidos poderão ser amplamente empregados em programas de manejo envolvendo biotecnologias reprodutivas. O volume médio de sêmen encontrado para *B. insularis* foi de 3,05 μL . Segundo os dados disponíveis na literatura, existe uma grande variação na quantidade de sêmen obtida quando se trabalha com diferentes espécies de serpentes. Almeida-Santos et al. (2004) relataram volume seminal que variou entre 800 e 1000 μL para a cascavel *Crotalus durissus terrificus*. O fato de termos encontrado no presente estudo valores tão menores para *B. insularis* pode ser atribuído tanto ao fato da cascavel ser um animal maior e mais robusto se comparado a jararaca-ilhoa e, principalmente, à técnica de colheita empregada por Almeida-Santos et al. (2004), que consistia na remoção e compressão dos ductos deferentes após o sacrifício do animal. Esta técnica certamente leva a obtenção de maiores quantidades de sêmen pela eliminação do conteúdo total presente nos ductos deferentes.

Foi utilizada neste trabalho a mesma técnica de colheita de sêmen empregada por Zacariotti (2004), que obteve para cascavel uma média de volume de 18,49 μL . Já Schulte-Hostedde e Montgomerie (2006) obtiveram entre 10 e 30 μL de sêmen para a cobra d'água *Nerodia sipedon*, utilizando apenas massagens ventrais para realizar a colheita.

Fahrig et al. (2007) e Mattson et al. (2007) ao trabalharem com a mesma espécie de corn snake *Elaphe gutatta*, seguiram a técnica preconizada por Mengden et al. (1980) e ainda sim obtiveram diferentes resultados. Fahrig et al. (2007) relataram um volume seminal médio de 10 μL , enquanto Mattson et al. (2007) obtiveram valores variando entre 2 e 5 μL . A partir disto podemos observar que, ainda que se utilize a mesma espécie e a mesma técnica de colheita, é possível que tanto variações individuais como a fase do ciclo reprodutivo em que o indivíduo se encontra durante a colheita influenciem no volume de sêmen do animal.

Quanto à motilidade, a média geral encontrada por Zacariotti (2004) para *Crotalus durissus terrificus* (60,26%) e por Tourmente et al. (2007) para *Boa constrictor occidentalis* (63%) foi semelhante à encontrada no presente trabalho (60,37%). Em contrapartida, Fahrig et al. (2007) relatam altíssimos 92,5% de motilidade para o sêmen de *corn snake*, um grau de motilidade comparável ao de animais domésticos, que aliado a seu longo período de cópula são responsáveis pelo sucesso reprodutivo da espécie.

A concentração média do sêmen encontrada neste estudo para *B. insularis* ($1,36 \times 10^9$ spz/mL) foi também muito próxima à encontrada por Zacariotti (2004) para a cascavel *Crotalus durissus terrificus* ($1,39 \times 10^9$ spz/mL), porém, muito distante do relatado por Langlada, Laporta-Ferrera e Santos (1991) também para cascavel ($0,004 \times 10^9$ spz/mL). Nota-se então, que a escolha da técnica de colheita do sêmen pode ser determinante no resultado obtido, já que, como descrito, neste trabalho utilizou-se a mesma técnica empregada por Zacariotti (2004), ao passo que Langlada, Laporta-Ferrera e Santos (1991) utilizaram a técnica de remoção e compressão dos ductos deferentes *post mortem*, que pode, além de outras coisas, levar a diluição do sêmen em fluidos locais que venham a interferir na concentração do mesmo.

Para a *corn snake Elaphe gutatta*, Fahrig et al. (2007) relatam que a concentração média do ejaculado desta espécie é de $0,852 \times 10^9$, muito menor do que o valor encontrado neste trabalho para *B. insularis*. Podemos inferir que uma concentração tão elevada no ejaculado *B. insularis* pode estar relacionado a um tipo de mecanismo compensatório em relação ao seu pequeno volume.

Quanto à morfologia, o espermatozoide da jararaca-ilhoa é bem semelhante ao relatado por Tourmente, Giojalas e Chiaraviglio (2008) para *Bothrops alternatus*, ambos seguindo 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.

Estudos sobre morfologia espermática em serpentes são bastante escassos e nenhum que relacione alterações morfológicas a problemas reprodutivos foi encontrado. No presente trabalho, as amostras de sêmen para a avaliação da morfologia espermática foram colhidas durante o mês de Agosto, durante o inverno. A porcentagem de células defeituosas encontrada foi de 45,76%, semelhante à relatada por Zacariotti (2004) para o sêmen de *Crotalus durissus terrificus* (42,35%), durante a mesma estação. As alterações de peça intermediária também compuseram as maiores porcentagens entre todos os defeitos em ambos os trabalhos.

Alterações da peça intermediária são comumente observadas em preparações seminais rotineiras e podem ser induzidas em diversos momentos durante a preparação laboratorial da amostra. Segundo Mies Filho (1987), o efeito brusco do frio provoca o enrolamento da cauda do espermatozoide, além de fraturas nos envoltórios, decorrente da maior contração da bainha lipoproteica em relação ao conteúdo celular, degeneração do acrossoma e consequentemente perda de enzimas, lipoproteínas, potássio, fosfolipídios e ATP.

Alguns autores sugerem ainda que o aparecimento desta patologia pode estar relacionado também a distúrbios na formação da cauda durante a espermiogênese, à passagem do sêmen pelo epidídimo ou ainda pela exposição a secreções epididimais anormais. (BARTH; OKO, 1989; SWANSON; BOYD, 1962).

No entanto, pouco é conhecido sobre a fisiologia espermática em répteis e o conhecimento já existente na área não nos permite explicar precisamente os efeitos da temperatura ou de outros fatores do meio ou ainda do processamento da amostra sobre a função espermática ou sobre sua morfologia, nem tampouco assegurar de que maneira a presença de tais defeitos afeta a fertilidade da espécie.

As análises de regressão linear mostraram que não há relação entre o tamanho dos animais e cada um dos parâmetros seminais estudados. Tais resultados indicam que animais menores podem ter a mesma qualidade de sêmen encontrada em animais maiores, sugerindo a necessidade de uma análise mais criteriosa quanto a relação existente entre maturidade sexual e comprimento em serpentes. Observou-se ainda que o menor macho de *Bothrops insularis* a apresentar espermatozoides viáveis em seu ejaculado possuía 43,5 cm, sete centímetros a menos do que os 50,5 cm relatados por Kasperoviczus et al. (2013) como menor macho sexualmente maduro encontrado em seu trabalho com animais de coleção. Este dado, bem como os outros resultados deste trabalho, aponta de maneira segura que os machos de *Bothrops insularis* podem atingir a maturidade sexual com tamanhos bem menores.

Zacariotti (2008) ao realizar a avaliação reprodutiva de *Crotalus ruber ruber* relatou a existência de uma correlação entre o volume de sêmen e o CRC do animal, de forma que quanto maior for o CRC do animal, maior o volume de sêmen obtido. Segundo o autor, este fato explica-se pelo sistema de acasalamento da espécie em questão, no qual os machos competem entre si pelas fêmeas e buscam copular com a maior quantidade de parceiras possível. Neste tipo de sistema em especial, sem dúvida, um maior tamanho garante vantagem no acesso à fêmea e, consequentemente, a cópula e fertilização.

No entanto, são necessárias mais pesquisas a respeito da fisiologia geral e, especialmente, a reprodutiva, para que seja possível assegurar quando acontece a puberdade e

quando estes animais adquirem a maturidade sexual. Para que este limiar possa vir a ser identificado de maneira confiável, é preciso levar em consideração não somente os dados histológicos dos órgãos reprodutivos ou a detecção de sêmen viável, mas também é fundamental a realização do acompanhamento hormonal e comportamental destes animais.

Segundo Kasperoviczus (2009), os ductos deferentes apresentam espermatozoides durante todos os meses do ano em *B. insularis*, porém, o número de convoluções e a altura do epitélio dos ductos deferentes são maiores na estação seca (outono e inverno) do que na estação chuvosa (primavera e verão). Além disso, o outono é a estação onde ocorre a espermatogênese e a cópula na espécie (KASPEROVICZUS, 2009), eventos estes que explicariam a melhor qualidade do sêmen nesta estação.

Almeida-Santos et al. (2004) e Zacariotti (2004), ao avaliar o sêmen da cascavel *Crotalus durissus terrificus* também não observaram diferenças significativas no volume de sêmen obtido ao longo das estações.

Quanto à motilidade, foi observada uma diferença significativa entre as médias obtidas no verão ($49,09 \pm 22,34$) e no outono ($73,33 \pm 19,42$), onde $p=0,042$. Segundo Hafez e Hafez (2004) a motilidade é essencial para que os espermatozoides cumpram seu único objetivo: fertilizar o óvulo; e esta motilidade desenvolve-se à medida que a morfologia e a função metabólica destas células amadurecem. De acordo com as análises histológicas realizadas por Kasperoviczus (2009) no trato reprodutor de machos de *B. insularis*, no verão os testículos encontram-se completamente inativos, o que justificaria a motilidade mais baixa encontrada no sêmen nesta estação. Ainda segundo essa autora, os epidídimos também não apresentam atividade espermática e os espermatozoides encontrados nos ductos deferentes parecem ser fruto de estocagem da estação anterior e não de produção recente.

Em relação à concentração espermática, observou-se que a média obtida no inverno é significativamente menor do que as médias das outras estações do ano, que não diferiram entre si. Isto pode estar relacionado ao fato de que embora no inverno os testículos ainda estejam na fase ativa de produção espermatogênica, existe uma desaceleração neste processo a partir da metade desta estação (KASPEROVICZUS, 2009).

Dessa forma os parâmetros seminais encontrados em *B. insularis*, podem elucidar singularidades encontradas na morfofisiologia reprodutiva possibilitando o manejo e o sucesso reprodutivo em cativeiro, dessa espécie ameaçada.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Não há relação entre o CRC, massa e cada um dos parâmetros seminais avaliados (volume, motilidade, vigor e concentração). Este resultado indica que animais menores e mais jovens já podem estar sexualmente maduros;
- Machos de *B. insularis* com CRC igual ou acima de 43,5 cm já são sexualmente maduros;
- O volume e o vigor do sêmen de *B. insularis* não variam ao longo das estações;
- A motilidade e a concentração do sêmen da jararaca-ilhoa variam sazonalmente entre as estações;
- De maneira geral, foi no outono que o sêmen de *B. insularis* apresentou melhor qualidade nos parâmetros avaliados (volume, motilidade, concentração e vigor), coincidindo com a estação de cópula da espécie.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMAO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: HOGGREN, M.; SCHUETT, G. W.; GREENE, H.; DOUGLAS, M. E. **Biology of the vipers**. Eagle Mountain: Eagle Mountain publishing, 2002. p. 445-462.
- 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.
- ALDRIDGE, R. D. Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, v. 1975, n. 3, p. 493-496, 1975.
- AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ophideos do Brasil. A. Parte I. Descrição de uma nova espécie. **Anexos Memórias do Instituto Butantan**, v. 1, p. 18-37, 1921a.
- AMARAL, A. Contribuição para o conhecimento dos ophidios do Brasil. A. Parte II. Biologia da nova espécie, *Lachesis insularis*. **Anexos Memórias do Instituto Butantan**, v. 1, p. 39-44, 1921b.
- AMARAL, A. Excursão a Ilha da queimada grande: notas sobre a biologia de uma *Lachesis* ali existente. **Coleção de Trabalhos do Instituto Butantan**, v. 2, p. 49-57, 1927.
- BARBO, F. E.; GRAZZIOTIN, F. G.; MARTINS, M.; SAWAYA, R. J. A New threatened insular species of lancehead from southeastern Brazil. **Herpetologica**, v. 68, n. 3, p. 418-429, 2012.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ed Ames, Iowa State University, press, 1989. 285 p.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. New York: Cornell University Press, 2004.
- CARRASCO, P. A.; MATTONI, L. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, p. 109-124, 2012.
- CENTENO, F. C.; SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. V. Snakes from coastal islands of State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 63-8, 2008.
- CICCHI, P. J. P.; SENA, M. A.; PECCININI-SEALE, D. M.; DUARTE, M. R. Snakes from coastal islands of State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 7, p. 227-40, 2007.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; RODRIGUES-SIMIONI L. Effect of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v. 31, p.1237-1247,1993.

CULLEN JR, L.; RUDRAN, R.; VALLADARES- PÁDUA, C. Método de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre. 2 ed.: Curitiba. Editora UFPR. 2003, 667 p.

DeNARDO, D. F. Reproductive biology. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**, 2. Ed. California: Saunders Elsevier, 2006. p. 376-390.

DOWLING, H. G.; SAVAGE, J. M. A guide to the snake hemipenis: a survey of basic structure and systematic characteristics. **Zoologica**, v. 45, p. 17-30, 1960.

DUVALL, D.; GIULIETTE, L. J.; JONES, R. E. Environmental control of reptilian reproductive cycles. In: GANS, C.; POUGH, F. H. (Eds.). **Biology of reptilia**. New York: Academic Press, 1982. p. 201-231.

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,

FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R. L.; EVANS, J. A; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FITCH, H. S. Reproductive cycles in tropical reptiles. **Occasional Papers of the Museum of Natural History University of Kansas**, v. 96, p. 1-53, 1982.

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

GOERITZ, F.; QUEST, M.; WAGENER, A.; FASSBENDER, M.; BROICH, A.; HILDEBRANDT, T.; HOFMANN, R.; BLOTTNER, S. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. **Theriogenology**, v. 59, p. 1487–1502. 2003.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 3969-82, 2006.

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.

HOGUE, A. R.; BELLUOMINI, H. E.; SCHREIBER, G.; PENHA, A. M. Sexual abnormalities in *Bothrops insularis* (Amaral, 1921) (Serpentes). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 29, p. 17-88, 1959.

HOGUE, A. R.; ROMANO-HOGUE S. A. R. W. D. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 42/43, p. 373–496, 1981.

HOWARD, J.; BUSH, M.; MORTON, C.; MORTON, F.; WENTZEL, K.; WILDT, D. Comparative semen cryopreservation in ferrets (*Mustela putorius furo*) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 109–118, 1991.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo & wild animal medicine current therapy**. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 390-399.

IUCN. 2014 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/>> Acesso em: 05 jan. 2014.

INTERNATIONAL UNION OF DIRECTORS OF ZOOLOGICAL GARDENS (IUDZG/CBSC). **The word zoo conservation strategy: the role of the zoos and aquaria of the world in global conservation**. Chicago Zoological Society, 1993, 76 p.

JAMIESON, B. G. M. Spermatozoal phylogeny of the vertebrata. 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.

KASPEROVICZUS, K. N.; MARQUES, O. A. V.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive ecology of the threatened pitviper *Bothrops insularis* from Queimada grande island, southeast Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 47, n. 3, p. 393-399, 2013.

LANGLADA, F. G.; LAPORTA-FERRIRA, I. L.; SANTOS, S. Atividade espermática de *Crotalus durissus* e a capacidade de fecundação. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 63, n. 4, p. 427, 1991

LANGLADA, F. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L. Techniques of Artificial Insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae-Crotalinae). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 31, p. 141-144, 1994.

MARINHO, C. E.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARNEIRO, S. M.; YAMASAKI, S. C.; SILVEIRA, P. F. Peptidase activities in *Crotalus durissus terrificus* semen. **Reproduction**, v. 136, p. 767-776, 2008.

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. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic Forest of Brazil. **Amphibia-Reptalia**, v. 17, p. 277-285, 1996.
- MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, v. 58, p. 303-12, 2002a.
- MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A jararaca da ilha da Queimada Grande. **Ciência Hoje**, v. 186, p. 56-9, 2002b.
- MARTINS, M.; ARAÚJO, M. S.; SAWAYA, R. J.; NUNES, R. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of neotropical pitvipers (*Bothrops*). **Journal of Zoology**, v. 254, p. 529-38, 2001.
- 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.
- MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M, (Ed). **Reproductive biology and phylogeny of snakes**. Enfield: Science Publishers, 2011. p. 511-550.
- 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
- 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.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.
- MORGAN, K. N.; TROMBORG, C. T. Sources of stress in captivity. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, p. 262-302, 2007
- MOZAFARI, S. Z.; ABDOLHOSSEIN, S.; FATEMEH, T. Evaluation of reproductive parameters of vas deferens sperms in Caucasian snake (*Gloydius halys caucasicus*). **Veterinary Research Forum**, v. 3, n. 2, p. 119-123, 2012.
- OLIVEIRA, C. A.; SILVA, R. M.; GERMÁN, M. M. S.; MAHECHA, A. B. Location of the ureteral openings in the cloacas of tinamous, some ratite birds, and crocodilians: a primitive character. **Journal of Morphology**, v. 260, p. 234-246, 2004.
- 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.

- PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. In: NASCIMENTO, L. B.; OLIVEIRA, M. E. **Herpetologia no Brasil II**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2007. p. 201-211.
- POPE, C. E.; GÓMEZ, M. C.; DRESSER, B. L. In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. **Theriogenology**, v. 66, p. 59-71, 2006.
- QUINN, H.; BLASEDEL, T.; PLATZ, C. C. Successful artificial insemination in the checkered garter snake. **International Zoo Yearbook**, v. 28, p. 177-183, 1989.
- SALOMÃO, M. G.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. MtDNA Phylogeny of neotropical pitvipers of the genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Kaupia**, v. 8, p. 127-134. 1999.
- SCHULTE-HOSTEDDE, A. I.; MONTGOMERIE, R. Intraspecific variation in ejaculate traits of the northern watersnake (*Nerodia sipedon*). **Journal of Zoology**, v. 270, p. 147-152, 2006.
- SHINE, R. Comparative ecology of three Australian snake species of the genus *Cacophis* (Serpentes: Elapidae). **Copeia**, v. 1980, p. 1831-1838, 1980.
- SHINE, R. Ecology of the Australian elapid snake *Echiopsis curta*. **Journal of Herpetology**, v. 16, p. 388-393, 1982.
- SUZUKI, H.; FURTADO, M. F. D. Mitochondrial DNA Polymorphism in *Bothrops jararaca* and *Bothrops alcatraz* (Serpentes, Viperidae): Evidence from RFLP Analysis, **Current Herpetology**, v. 27, p. 81-92, 2008.
- SWANSON, E.W.; BOYD, L. J. Factors affecting coiled-tail spermatozoa in the bull. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23, p. 300-309, 1962.
- TOURMENTE, M.; CARDOZO, G.; BERTONA, M.; GUIDOBALDI, A.; GIOLAS, L.; CHIARAVIGLIO, M. The ultrastructure of the spermatozoa of *Boa constrictor occidentalis*, with considerations on this mating system and sperm competition theories. **Acta Zoologica**, v. 87, n. 1, p. 25-32, 2006.
- TOURMENTE, M.; CARDOZO, G.; GUIDOBALDI, H.; GIOJALAS, L.; BERTONA, M.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm motility parameters to evaluate the seminal quality of *Boa constrictor occidentalis*, a threatened snake species. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 1, p. 93-98, 2007.
- TOURMENTE, M.; GIOJALAS, L.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm ultrastructure of *Bothrops alternatus* and *Bothrops diporus* (Viperidae, Serpentes), and its possible relation to the reproductive features of the species. **Journal of Zoomorphology**, v. 127, n. 4, p. 241-248, 2008.
- 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.

TRAUTH, S. E.; SEVER, D. M. Male urogenital ducts and cloacal anatomy. In: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes**, Florida: CRC Press, Boca Raton, 2011. p. 411-475.

VALDUJO, P. H.; NOGUEIRA, C.; MARTINS, M. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 36, p. 169-176, 2002.

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

WÜSTER, W.; DUARTE, M. R.; SALOMÃO, M. G. Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic position of *Bothrops insularis*. **Journal of Zoology (London)**, v. 266, p. 1-10. 2005.

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. 155-60, 2007

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

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