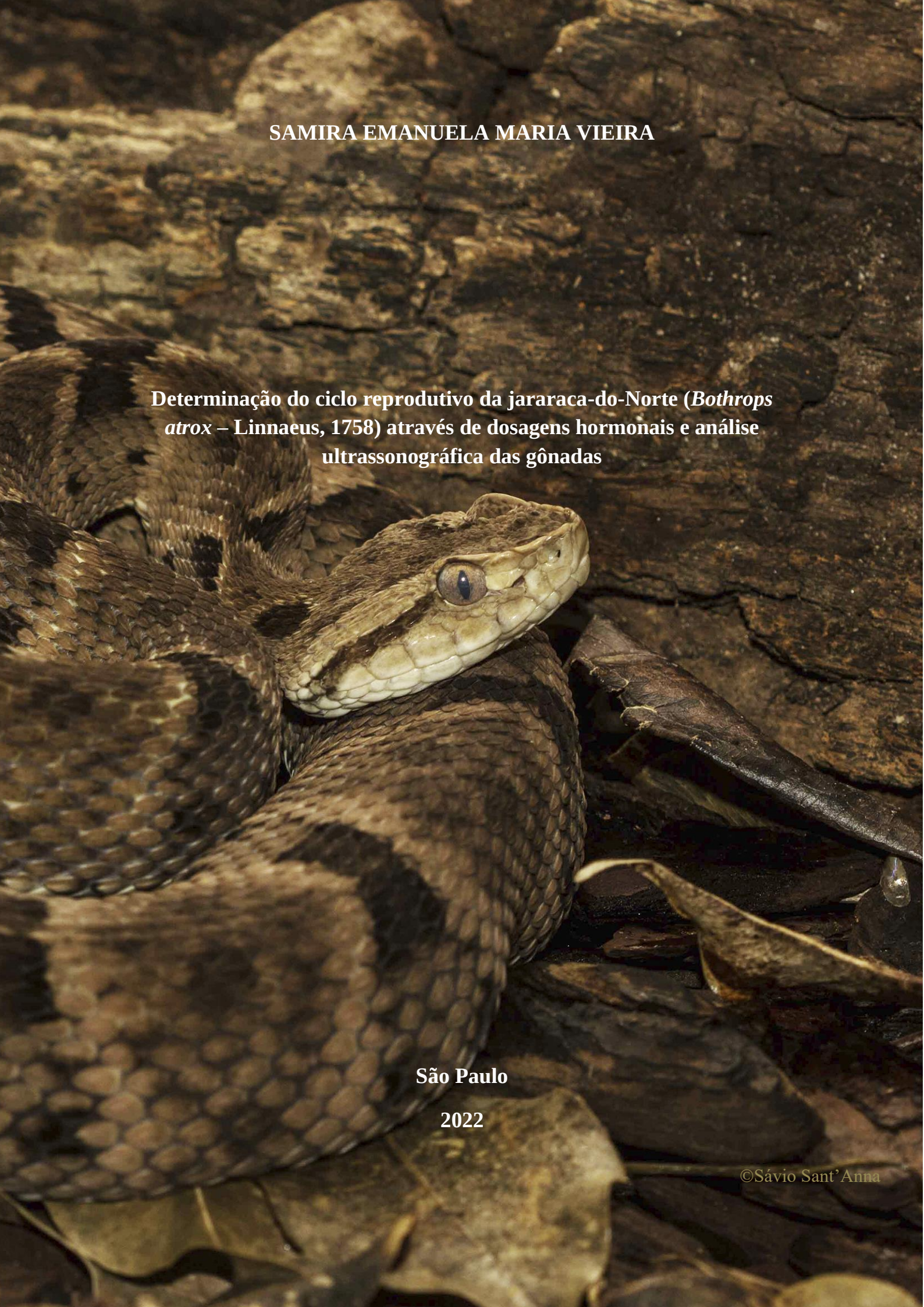


SAMIRA EMANUELA MARIA VIEIRA

Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca-do-Norte (*Bothrops atrox* – Linnaeus, 1758) através de dosagens hormonais e análise ultrassonográfica das gônadas

São Paulo

2022

©Sávio Sant'Anna

SAMIRA EMANUELA MARIA VIEIRA

Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca-do-Norte (*Bothrops atrox* – Linnaeus, 1758) através de dosagens hormonais e análise ultrassonográfica das gônadas

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientação:

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

São Paulo

2022

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. 4199
FMVZ

Vieira, Samira Emanuela Maria
Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca-do-Norte (*Bothrops atrox* - Linnaeus, 1758) através de dosagens hormonais e análise ultrassonográfica das gônadas / Samira Emanuela Maria Vieira. – 2022.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira.

1. Serpentes. 2. Ciclo Reprodutivo. 3. Hormônios. 4. Ultrassonografia. 5. *Bothrops*. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB-8/7070, da FMVZ/USP.

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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca do norte (Bothropsatrox - Linnaeus 1758) através de dosagens hormonais e análiseultrassonográfica das gônadas", protocolada sob o CEUA nº 8814151019 (ID 007964), sob a responsabilidade de **Ricardo José Garcia Pereira** *e equipe; Samira Emanuela Maria Vieira* - 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 17/06/2020.

We certify that the proposal "Reproductive Cycle of the Fer-de-lance (Bothrops atrox - Linneaus 1758) by hormonal assays and ultrasound images of the gonads", utilizing 6 Reptiles (6 females), protocol number CEUA 8814151019 (ID 007964), under the responsibility of **Ricardo José Garcia Pereira** *and team; Samira Emanuela Maria Vieira* - 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 06/17/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 11/2019 a 10/2021 Área: Reprodução de Aves

Origem:	Instituto Butantan						
Espécie:	Répteis	sexo:	Fêmeas	idade:	3 a 5 anos	N:	6
Linhagem:	Bothrops atrox			Peso:	350 a 800 g		

Local do experimento: Coletas de sangue e análises ultrassonográficas: Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Análises hormonais: Departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ/USP.

São Paulo, 11 de maio de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

INSTITUTO BUTANTAN
A serviço da vida

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Manutenção de serpentes em cativeiro no Laboratório de Herpetologia", protocolada sob o CEUA nº 7967310720 (ID 002143), sob a responsabilidade de **Kathleen Fernandes Grego** *e equipe; Sávio Stefanini SantAnna; Jarbas Prado Vidueiros; Patrícia Cilene Marchioretto; Giovanni Perez; Lucas de Carvalho Francisco Alves; Fabíola Rodrigues; Daniel Rodrigues Stuginski* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 27/08/2020.

We certify that the proposal "Maintenance of snake in captivity at the Laboratory of Herpetology", utilizing 1200 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 7967310720 (ID 002143), under the responsibility of **Kathleen Fernandes Grego** *and team; Sávio Stefanini SantAnna; Jarbas Prado Vidueiros; Patrícia Cilene Marchioretto; Giovanni Perez; Lucas de Carvalho Francisco Alves; Fabíola Rodrigues; Daniel Rodrigues Stuginski* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 08/27/2020.

Finalidade da Proposta: Manutenção

Vigência da Proposta: de 09/2020 a 09/2025 Área: Herpetologia

Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	5 a 6 anos	N:	3
Linhagem:	Lachesis muta			Peso:	1500 a 5000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	103
Linhagem:	Bothrops jararaca			Peso:	20 a 1000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 anos	N:	60
Linhagem:	Bothrops jararacussu			Peso:	30 a 3000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 96 meses	N:	62
Linhagem:	Micrurus corallinus			Peso:	8 a 300 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 96 meses	N:	8
Linhagem:	Micrurus frontalis			Peso:	8 a 300 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	60
Linhagem:	Bothrops alternatus			Peso:	30 a 1200 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	72
Linhagem:	Bothrops moojeni			Peso:	8 a 1000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 180 meses	N:	50
Linhagem:	Crotalus durissus collilineatus			Peso:	1 a 3000 g		
Origem:	Não se aplica						

INSTITUTO BUTANTAN
A serviço da vida

Comissão de Ética no Uso de Animais

Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 180 meses	N:	65
Linhagem:	Crotalus durissus terrificus			Peso:	30 a 3000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 180 meses	N:	15
Linhagem:	Crotalus durissus cascavela			Peso:	20 a 150 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	53
Linhagem:	Bothrops atrox			Peso:	50 a 1500 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	33
Linhagem:	Bothrops leucurus			Peso:	600 a 1200 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	50
Linhagem:	Bothrops neuwiedi			Peso:	8 a 1000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	35
Linhagem:	Bothrops matogrossensis			Peso:	6 a 800 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	45
Linhagem:	Bothrops leucurus			Peso:	8 a 1500 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	7
Linhagem:	Bothrops insularis			Peso:	6 a 800 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	2
Linhagem:	Bothrops cotiara			Peso:	6 a 1000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	12
Linhagem:	Bothrops fonsecai			Peso:	8 a 1000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	21
Linhagem:	Bothrops erythromelas			Peso:	6 a 300 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	30
Linhagem:	Bothrops paoloensis			Peso:	6 a 600 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	26
Linhagem:	Boa constrictor			Peso:	30 a 5000 g		
Origem:	Não se aplica						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	205
Linhagem:	Pantherophis gutttatus			Peso:	8 a 800 g		
Origem:	Recepção LECZ						
Espécie:	Répteis	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 120 meses	N:	183
Linhagem:	Várias espécies de serpentes			Peso:	8 a 2000 g		

Local do experimento: Laboratório de Herpetologia

INSTITUTO BUTANTAN
A serviço da vida

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 20 de junho de 2022

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VIEIRA, Samira Emanuela Maria

Título: **Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca-do-Norte (*Bothrops atrox* – Linnaeus, 1758) através de dosagens hormonais e análise ultrassonográfica das gônadas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, d. Carmelia, por todo amor, paciência, suporte e dedicação para que eu chegasse até aqui, ainda que meu caminho fosse mais longo, e maiores os obstáculos a vencer. Obrigada por me ensinar a determinação, retidão e a fé em Deus necessárias para essa caminhada. Com seu apoio, não há falta de recursos nem de saúde que me impeça de seguir.

Ao Rogério, amor da minha infância e da minha vida. Você dá toda a leveza e suavidade pra que eu encare quaisquer desafios da vida. Obrigada pela paciência, pelo abraço apertado na hora do cansaço, e por se alegrar com minhas alegrias.

Às minhas tias Graça, Socorro e Lúcia, por serem meu porto seguro bem presente, e por também serem a base da formação do meu caráter. Às minhas primas Cybéria, Lahyna e Renatta por deixarem minha vida mais colorida.

Aos meus irmãos Clistenes, Antônio, Ângela, Neuma, Zaira e Soraia, por me amarem e me tornarem um ser completo.

Às minhas amigas Emiliana Amaral, Carolina "Bilhões", Débora Valle, Viviane Silva, Fernanda Costa, Gabriela Bertin, Gisele e Gislene Azevedo. Vocês são luz na minha vida. Tudo o que tenho de melhor é formado por um pedacinho de cada uma de vocês.

À minha vó Lourdes e meu tio Zé Luiz, in memorian.

Aos meus professores e mestres que inspiraram minha vida, em especial dr. Luiz Afonso V. Figueiredo e dr. José Luiz Laporta, que me plantaram no coração o sonho de trabalhar com pesquisa científica.

A todos os jovens (ou nem tanto, como eu) moradores de periferia, que vêem o ingresso nesta tão admirada Universidade como um sonho distante, muitas vezes inalcançável, como um dia eu vi. Nada é impossível, e nunca é tarde.

AGRADECIMENTOS

À minha diretora, **dra. Kathleen Fernandes Grego**, por toda a generosidade desde o primeiro dia em que me recebeu no Laboratório de Herpetologia. Por me treinar além das minhas atribuições, em dar oportunidades e incentivar meu desenvolvimento profissional e pessoal. Você é referência de mulher na Ciência e Ser Humano. Obrigada por enxergar, em meio ao meu tratamento oncológico, um momento tão difícil em minha vida, que seria o melhor momento para realizar esse sonho de ingressar no mestrado. Além de tudo, viabilizou o caminho e coorientou este trabalho.

Ao meu orientador, **prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira**, por toda a disposição em abraçar o campo da Herpetologia, contribuindo com sua expertise para que as serpentes um dia alcancem o status de animais de produção que merecem ser. Obrigada pela gentileza e paciência em me receber como aluna, por ensinar as bases fundamentais da Reprodução Animal, e a partir delas mostrar tantas possibilidades de experimentação com o uso de Biotecnologia. Que esta seja uma longa e produtiva parceria entre nossos laboratórios.

Ao **Dr. Sávio Stefaninni Sant'Anna**, por tanta ajuda nos momentos de dificuldade com as análises estatísticas dos resultados, por compartilhar sua experiência acadêmica que norteou minhas decisões neste trabalho em vários momentos, pela bela imagem desta capa, e por ser sempre um grande amigo, parceiro e orientador no dia a dia do trabalho, no Laboratório de Herpetologia.

À amiga, companheira **Dra. Luciana Carla Rameh de Albuquerque Zanotti**, que quando desejei continuar a vida acadêmica, após um período de estagnação, me disse: "*Se tu quiser ir trabalhar na Herpetologia, pode ir procurar a Kathleen em meu nome*". Nesta vida, muitas vezes precisamos de um amigo que nos aponte um caminho!

Aos companheiros do biotério de serpentes do Laboratório de Herpetologia **Fabíola, Lucas, Aninha, Jarbas,** e nossa aluna especialista **Caroline Tié** por me substituírem trato diário com as serpentes e nas viagens a Juquitiba-SP, durante meu longo período de afastamento medico destas atividades, e principalmente nesta reta final do mestrado. Ao amigo **Dr. Daniel Stuginski** por ser nossa inspiração acadêmica do laboratório. Aos essenciais **D. Lúcia, Toninho, Fabiano, Sr. Severo, Adilson, Diogo, Grazy, Zefinha e d. Eliana,** pelo trabalho em preparar todo nosso material disponível para a realização das nossas atividades diárias. Às amigas e parceiras **Dra. Anita Azevedo, Dra. Karen Zani** e **Dra. Marisa Rocha** por toda a troca profissional e pessoal enriquecedora. E por fim a todos os colegas que tornam a Herpetologia um lugar incrível para se trabalhar.

Ao amigo **Ms. Rafael Amorim de Castro** pela amizade, troca de experiência, por me mostrar pontos de vista que trouxeram serenidade em meio a desafios. Sem você, não conseguiria superá-los.

Em especial aos amigos e colegas do Instituto Butantan **Gianfranco Marino, Juliana Medeiros, Giovanni Perez, Cibele Barbarini e Vanessa Ritschel,** cada um de um modo muito especial, me dão suporte profissional, emocional e amizade diariamente. Não há palavras suficientes para expressar a relevância de vocês no meu dia-a-dia.

Aos meus colegas do Grupo de Estudos para Multiplicação de Aves (GEMA), **Marcel Blanck** e **Gabriel Novaes**, pela parceria, pelo auxílio técnico, pelas análises estatísticas e apoio nas interpretações dos resultados, inclusive em fora de horário comercial (rsrs). Grata pela amizade. Me orgulho muito de vocês.

À **dra. Selma Maria Almeida-Santos** do Laboratório Especial de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan, pelo auxilio em fornecer prontamente a literatura essencial para este trabalho, desde a introdução até a discussão dos resultados.

À **profa. Dra. Airlane Alencar** e os alunos **Karine, Yugo** e **HeiYin** do Centro de Estatística Aplicada do IME-USP, pela consultoria estatística para este estudo.

“Quem quer vencer um obstáculo deve armar-se da força do leão e da prudência da serpente”

- Píndaro (517-437 a.C.)

RESUMO

VIEIRA, S.E.M. **Determinação do ciclo reprodutivo da jararaca do norte (*Bothrops atrox* - Linnaeus 1758) através de dosagens hormonais e análise ultrassonográfica das gônadas**. 2022. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A jararaca-da-Amazônia (*Bothrops atrox*, Linnaeus 1758) é uma serpente peçonhenta, de importância em saúde, encontrada por toda a região da Amazônia. Além de ser a serpente mais envolvida em acidentes ofídicos na região, sua importância consiste na promoção do avanço em pesquisas farmacológicas obtidas a partir de sua peçonha. No passado, o Instituto Butantan recebia as serpentes através dos colaboradores rurais, porém com a diminuição das áreas naturais e a matança indiscriminada desses animais, a recepção das serpentes tem diminuído significativamente nas últimas décadas. Portanto, é importante o instituto tornar-se independente no que se refere a manutenção do plantel de serpentes em número adequado, para atender não só às demandas de pesquisas farmacológicas e produção de venenos, como também por questões conservacionistas. A fim de aprimorar as técnicas de reprodução das serpentes no cativeiro, foi proposto um estudo com 6 jararacas-da-Amazônia fêmeas, cujo objetivo é determinar os níveis dos hormônios progesterona (P_4) e estradiol (E_2) dessas serpentes ao longo das estações do ano e associar esses valores ao ciclo ovariano monitorado por ultrassonografia. As serpentes foram examinadas periodicamente com o uso de equipamento ultrassonográfico, com o qual foram contabilizados os folículos ovarianos, ovos e embriões no oviduto. No mesmo dia das análises ultrassonográficas, foram coletadas amostras sanguíneas para dosagem das concentrações de progesterona e estradiol. Os folículos ovarianos foram classificados como E-I e E-II (não vitelogênicos), E-III e E-IV(vitelogênicos), conforme o estágio de vitelogênese em que se encontravam. Nos meses correspondentes ao outono e inverno, as fêmeas participaram de pareamentos reprodutivos. Na maioria das imagens ultrassonográficas, as fêmeas apresentaram vários estágios foliculares simultaneamente. O número de folículos ovarianos em cada estágio, e as estruturas no oviduto, foram relacionados com as respectivas concentrações de E_2 e P_4. A comparação de médias apontou tendência de efeito do estradiol na presença de folículos vitelogênicos (E-III e E-IV), ovos e embriões no oviduto, o que reforça a influência deste hormônio sobre a vitelogênese. Apontou também efeito significativo da

progesterona na presença de ovos e embriões no oviduto, confirmando o papel deste hormônio no sustento da gestação das serpentes. A comparação das médias de concentrações hormonais ao longo das estações do ano apontaram efeito significativo do inverno sobre o estradiol, e da primavera sobre a progesterona. Em concordância com estes efeitos, as análises descritivas dos ciclos das serpentes gestantes, apontaram maior número de folículos vitelogênicos E-III e E-IV durante o inverno, e gestações ocorrendo predominantemente na primavera. O uso de imagens ultrassonográficas associadas às dosagens sanguíneas hormonais, como metodologia minimamente invasiva, mostrou ser uma relevante técnica que pode ser aplicada em estudos reprodutivos em serpentes *in vivo*. Ainda há muito a ser investigado na biologia reprodutiva da jararaca-da-Amazônia assim como em todo o gênero *Bothrops*, para que estas espécies, com alto valor farmacológico, alcancem o domínio reprodutivo, associando utilização de técnicas de biotecnologia, como colheita de sêmen, indução hormonal e inseminação artificial, que já são aplicadas nos demais animais de produção.

Palavras-chave: Serpentes. Ciclo Reprodutivo. Hormônios. Ultrassonografia. *Bothrops*.

ABSTRACT

VIEIRA, S.E.M. **Reproductive Cycle of the Fer-de-lance (*Bothrops atrox* - Linneaus 1758) by hormonal assays and ultrasound images of the gonads**. 2022. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The Fer-de-lance pit viper (*Bothrops atrox*, Linnaeus 1758) is a venomous snake of health importance found throughout the Amazon region. Besides being the venomous snake most involved in snakebites in the region, its venom promotes advances in pharmacological researches. In the past, Butantan Institute received snakes by rural collaborators, but with the reduction of natural areas and the indiscriminate killing of these animals, the reception of snakes has significantly decreased in recent decades. Therefore, it is important that the institute becomes independent when it comes to maintaining snakes in adequate numbers, not only to meet pharmacological research demands and antiserum venom production, but also for conservation reasons. In order to improve snake reproduction techniques in captivity, a study was proposed with 6 female Amazon pit vipers, with the objective of determining the levels of progesterone (P4) and estradiol (E2) hormones throughout the year, and to associate these values with the ovarian cycle monitored by ultrasound. The snakes were periodically examined using ultrasound equipment, with which the ovarian follicles, eggs and embryos in the oviducts were counted. Right after the ultrasound exam, blood samples were collected to measure serum concentrations of progesterone and estradiol. Ovarian follicles were classified as E-I and E-II (non-vitellogenic), E-III and E-IV (vitellogenic), according to the vitellogenesis stage in which they were found. It was common to visualize several follicular stages at the same moment. In autumn and winter seasons, females were paired for breeding events. The number of ovarian follicles at each stage, and the presence of ova in the oviduct, were related to the concentrations of E2 and P4, respectively. Results showed a trend of estradiol effect in the presence of vitellogenic follicles (E-III and E-IV), eggs and embryos in the oviducts, which reinforces the influence of this hormone on vitellogenesis. Besides, our results pointed out a significant effect of progesterone levels in the presence of eggs and embryos in the oviducts, confirming the role of this hormone in sustaining snakes' pregnancy. The results of hormone concentration throughout the seasons showed a significant effect of winter on estradiol levels, and of spring on progesterone levels. In agreement with these results, the descriptive analyzes of pregnant

snakes' cycles indicated a greater number of E-III and E-IV vitellogenic follicles during winter, and pregnancies occurring predominantly in spring. The use of ultrasound images associated with blood hormone levels, proved to be a relevant technique that can be easily applied in reproductive studies. There is still much to be investigated about the reproductive biology of the entire *Bothrops* genus. To reach the reproductive domain of this species with high pharmacological value, we must use biotechnology techniques, such as semen collection, hormonal induction and artificial insemination, already applied to other production animals, to optimize captive breeding.

Keywords: Snakes. Reproductive Cycle. Hormones. Ultrasonography. *Bothrops*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Serpentário semi-intensivo em uso até início da década de 1960 (A). Atualmente é atração turística (B) 24

Figura 2 - Sala de manejo e extração de veneno. 25

Figura 3 - Aparelho reprodutor feminino de jararaca (*B. jararaca*).....30

Figura 4 - Diferentes estágios foliculares e influência hormonal (estrógeno e progesterona) nos folículos ovarianos de cascavéis e jararacas. 31

Figura 5: Fêmea de jararaca-da-Amazônia mantida em caixa plástica, forrada com papelão corrugado e água à disposição.....38

Figura 6: Machos e fêmea reunidos para cópula 39

Figura 7: (A) Swab vaginal e (B) presença de espermatozóides na observação ao microscópio ótico (40x).....39

Figura 8: Exame ultrassonográfico e punção da veia coccígea 41

Figura 9: Exemplos de imagens de estágios foliculares, ovos e embriões observados nas análises ultrassonográficas 43

Figura 10: Fêmea Bax05 logo após o parto.....44

Figura 11: Junção comparativa dos gráficos individuais de cada serpente, com suas respectivas oscilações hormonais, estágios hormonais e gestação durante o período do estudo.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das fêmeas de jararaca-do-Norte (*Bothrops atrox*) utilizadas no estudo, com seus respectivos dados biométricos, data de nascimento e procedência 37

Tabela 2 - Análises de comparação de médias entre os perfis dos hormônios E_2 e P_4 com as estações do ano. Os dados foram apresentados pela média e erro padrão da média. Os valores de estradiol foram transformados em $\log E_2$, e os valores de P_4 foram transformados em $1/\sqrt{P_4}$. Houve diferença estatística quando $p<0,05$. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre as estações. 52

Tabela 3 - Análises de comparação de médias entre os perfis dos hormônios E_2 e P_4 com os diferentes estágios foliculares e presença de ovos e embriões no oviduto. Os dados foram apresentados pela média e erro padrão da média. Houve diferença estatística quando $p<0,05$. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os estágios.....54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - (A) Variação dos perfis médios hormonais e (B) Estágios foliculares/estruturas observadas no oviduto ao longo das estações do ano. 50

Gráfico 2 - Perfis médios hormonais (A e C) e proporção das quantidades de estágios foliculares e estruturas observadas no oviduto (B e D), relacionando dados de ciclos gestantes e não gestantes. 51

Gráfico 3 - Distribuição das concentrações hormonais ao longo das estações do ano, sendo (A) representando Estradiol e (B) representando Progesterona. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os estágios. 52

Gráfico 4 - Perfis médios hormonais em relação aos estágios foliculares e estruturas presentes no oviduto (O/E= ovos/embriões) 53

Gráfico 5 - Concentrações hormonais em relação a observação de cada estágio folicular e estruturas no oviduto, sendo (A) representando Estradiol e (B) representando Progesterona. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os estágios. 54

Gráfico 6 - Perfis médios hormonais no período pré-ovulatório e pós-ovulatório (gestacional), considerando o mês 0 (zero) como mês da ocorrência da ovulação. (*) indica ausência de dados no mês 3. 55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Representação dos eventos reprodutivos no gênero *Bothrops*.....28

Quadro 2 - Classificação das estruturas observadas imagens ultrassonográficas 40

Quadro 3 - Resumo da estimativa dos períodos de estocagem de esperma, ovulação e período de gestação do grupo experimental. (*) indica ausência de confirmação de cópula antes desta gestação 47

Quadro 4 - Resumo estimado dos eventos reprodutivos apresentados pelo grupo de jararacas-do-Norte 47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 22
2. REVISÃO DE LITERATURA 24
2.1. MANUTENÇÃO DE SERPENTES PEÇONHENTAS PARA PRODUÇÃO DE VENENO NO BRASIL 24
2.2. CICLOS REPRODUTIVOS NO GÊNERO *BOTHROPS* 27
2.3. APARELHO REPRODUTOR FEMININO E A VITELOGÊNESE EM SERPENTES 29
2.4. HORMÔNIOS QUE REGULAM O CICLO REPRODUTIVO FEMININO EM SERPENTES 32
2.5. IMAGENS ULTRASSONOGRÁFICAS EM ESTUDOS REPRODUTIVOS 34
2.6. ANÁLISES DOS HORMÔNIOS SEXUAIS EM SORO SANGUÍNEO 36
3. MATERIAIS E MÉTODOS 37
3.1. ANIMAIS 37
3.2. PAREAMENTO REPRODUTIVO 38
3.3. EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS 40
3.4. DOSAGENS HORMONAIS 40
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 42
4. RESULTADOS 42
4.1. ANÁLISES DESCRITIVAS INDIVIDUAIS DAS FÊMEAS 44
4.2. ANÁLISES DESCRITIVAS CONJUNTAS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS 49
5. DISCUSSÃO 54
6. CONCLUSÃO 58
REFERÊNCIAS 60
APÊNDICES 67
ANEXOS 77

1. INTRODUÇÃO

A jararaca-da-Amazônia (*Bothrops atrox*, Linnaeus 1758) é uma serpente peçonhenta, de importância em saúde, encontrada por toda a região da Amazônia, desde o leste da Colômbia até o Norte do Brasil, incluindo a Guiana, Guiana Francesa, Suriname, além de algumas regiões do Peru, Venezuela e Bolívia (WÜSTER et al., 1997; OLIVEIRA; MARTINS, 2001; MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002; CAMPBEL; LAMAR, 2004; TURCI et al., 2009; HAMDAN et al., 2020). Seu habitat é a floresta equatorial caracterizada por temperaturas e umidade relativa altas que variam pouco ao longo do ano, diferenciando-se apenas em estações chuvosa e seca (AB'SABER, 1977; FORTI; MOREIRA-NORDEMANN, 1991). Sua dieta é generalista, incluindo centopeias, peixes, anfíbios anuros, lagartos, outras serpentes, aves, e pequenos mamíferos, conferindo à espécie uma constante oferta de alimento durante todo o ano (MARTINS; GORDO, 1993; MARTINS; OLIVEIRA, 1998; BERNARDE; ABE, 2010; SILVA et al., 2017; BISNETO; KAEFER, 2019). Todavia, sua ampla distribuição e abundância fazem com que essa serpente peçonhenta seja a mais envolvida em acidentes ofídicos na região, por ser frequentemente encontrada em torno de assentamentos humanos, como pastagens, plantações, e áreas urbanas (BERNARDE, 2014; WEN et al., 2015; MONTEIRO et al., 2020).

Os envenenamentos causados por serpentes peçonhentas constituem um sério problema de saúde pública não só na região Amazônica, como em outras partes do Brasil. Na maioria das vezes, são acometidas populações pobres que vivem em áreas rurais, e as possíveis sequelas dos envenenamentos podem causar desencadear discriminação, abandono, perda de renda, dívidas, problemas de saúde mental e redução da qualidade de vida. Por esse motivo os acidentes ofídicos foram incluídos pela OMS na lista de doenças tropicais negligenciadas (WILLIAMS et al., 2019). Dados do Ministério da Saúde mostram que, desde 2010, o maior número de acidentes ofídicos no Brasil é causado por jararacas (gênero *Bothrops*, 86,2%), depois por cascavéis (gênero *Crotalus*, 9,7%), surucucu-pico-de-jaca (gênero *Lachesis*, 3%) e corais-verdadeiras (gênero *Micrurus*, 1,1%) (SINAN, 2021). Os acidentes ofídicos são de notificação obrigatória no país, permitindo uma relação de troca de informações epidemiológicas entre as Secretarias Estaduais e o Ministério da Saúde. Com este sistema, dados sobre ofidismo são atualizados, mostrando características epidemiológicas e clínicas que permitem o

planejamento de ações de controle (OLIVEIRA; WEN; SIFUENTES, 2009; SINAN, 2016).

A manutenção de populações de serpentes peçonhentas em cativeiro é importante tanto para a produção de soros antiofídicos (GREGO et al., 2021), como para pesquisas farmacológicas (GALIZIO et al., 2018), haja visto o exemplo de medicações já elaboradas a partir da sintetização de compostos obtidos a partir de peçonha de jararaca (*Bothrops jararaca*) (CUSHMAN; ONDETTI, 1991), o que destaca o interesse das empresas farmacêuticas. Apesar de ser uma atividade centenária no Brasil, e da grande relevância em se manter populações *ex situ* de serpentes peçonhentas, o sucesso reprodutivo de muitas espécies é ainda difícil. Há espécies que ainda são mantidas pela chegada de novos indivíduos de vida livre, o que as categoriza como não sustentável. Uma das razões desse insucesso reprodutivo baseia-se na falta de conhecimento sobre a biologia reprodutiva básica dessas serpentes, o que limita a aplicação efetiva de manejos e biotecnologias ligadas à reprodução, para maximização na produção de indivíduos em cativeiro.

Portanto, na tentativa de melhor compreender o ciclo reprodutivo das jararacas-da-Amazônia mantidas em cativeiro, este trabalho buscou determinar as oscilações anuais dos níveis plasmáticos de estrógeno e progesterona em fêmeas dessa espécie, e associar esses valores com os dados ultrassonográficos ovarianos. Nas últimas décadas, uma grande contribuição sobre a reprodução de viperídeos brasileiros foi obtida por meio de pesquisas realizadas com animais depositados em coleções científicas, associadas a registros pontuais de campo e cativeiro (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2020). Porém, esse material fornece características apenas do momento em que o animal foi abatido e integrado coleção.

Contudo, o acompanhamento hormonal, ultrassonográfico e comportamental a longo prazo, dos mesmos indivíduos da espécie de interesse, trará informações relevantes que poderão ser incorporadas, não só na melhoria do manejo reprodutivo em cativeiro, como também na aplicação de biotecnologias reprodutivas. O objetivo principal desse trabalho foi o de contribuir com o conhecimento da biologia reprodutiva da jararaca-da-Amazônia, obtendo dados endócrinos, ultrassonográficos e comportamentais básicos sobre o ciclo ovariano desta espécie em cativeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MANUTENÇÃO DE SERPENTES PEÇONHENTAS PARA PRODUÇÃO DE VENENO NO BRASIL

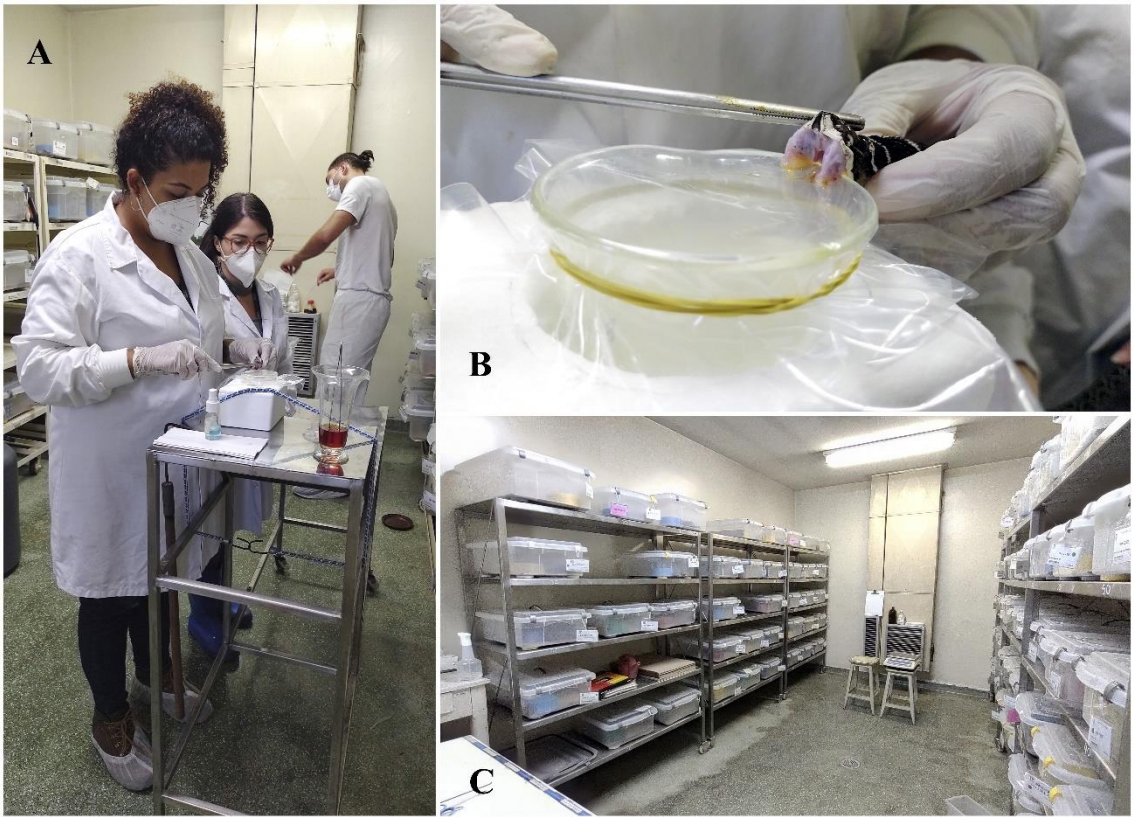
O Brasil é pioneiro na experiência de manutenção de serpentes peçonhentas de importância em saúde, como animais de produção de venenos destinado à pesquisa e fabricação de biofármacos (MELGAREJO, 2002). O início se deu no Instituto Butantan, que começou as suas atividades oficialmente em 1901, tendo como primeiro diretor o Dr. Vital Brazil, médico sanitarista muito impressionado com o número de pacientes picados por serpentes. Com os estudos para tratamento dos pacientes, iniciou-se a manutenção de serpentes em cativeiro para a extração de veneno, destinado à produção de soro antiofídico (VITAL-BRAZIL, 1911; DONATO, 1954; GREGO et al., 2021). Até 1962 os animais eram mantidos num serpentário semi-intensivo com abrigos em forma de iglu, onde a extração de veneno era realizada a cada 15 dias, com exposição ao público. Na época, as serpentes eram fornecidas por colaboradores, e tinham uma longevidade média de quinze dias e resistiam a apenas uma extração (BELLUOMINI, 1964; MELGAREJO, 2002).

Figura 1: Serpentário semi-intensivo em uso até início da década de 1960 (A). Atualmente é atração turística (B).

Fonte: https://butantan.gov.br/atracoes/predios-historicos

Ao longo dos anos houve uma evolução nas técnicas de manejo e melhoria das instalações, com a mudança dos animais para um serpentário intensivo (atualmente chamado Laboratório de Herpetologia). Hoje em dia, as serpentes são mantidas em caixas plásticas individuais, em salas com controle ambiental da umidade relativa, temperatura, ventilação e fotoperíodo. Cada animal é alimentado quinzenal ou mensalmente com 10 a 20% de seu peso em roedores. É instituída a medicina higiênico-sanitária e profilática, como vermifugação e quarentena dos animais. As extrações são realizadas a cada 60 dias, com auxílio de CO_2 (dióxido de carbono) para *adormecer* as serpentes, o que diminui o estresse dos animais e os acidentes com o corpo técnico. Presentemente, as serpentes do Laboratório de Herpetologia têm uma longevidade média de 10 anos, e aproximadamente 60% dos animais são nascidos em cativeiro (GREGO et al., 2021).

Figura 2: Sala de manejo e extração de veneno.



Fonte: Acervo pessoal (2022)
Legenda: (A e B) Momento de extração de veneno (C) Serpentes mantidas em caixas individualizadas, organizadas em estantes.

Existe a necessidade de institutos de pesquisa e produção de biofármacos serem menos dependentes de serpentes provenientes da natureza, mantendo os animais em condições higiênico-sanitárias adequadas e de bem-estar, que atendam as demandas da

produção. Como os venenos apresentam uma razoável variação inter e intraespecífica, individual (GALIZIO et al., 2018), ontogenética (AGUIAR et al., 2020) e geográfica (SILVA-JÚNIOR et al., 2020), é importante que os biotérios tenham uma boa representatividade no pool de venenos destinados à imunização dos cavalos, que fazem parte da cadeia produtiva de soros (MELGAREJO, 2002). Além do Instituto Butantan, a produção de soro brasileira conta com os serpentários da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, Instituto Vital Brazil e o Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP.

Desde a fundação do Instituto Butantan até 1977 foram recebidas cerca de 1,1 milhão de serpentes, sendo 80% peçonhentas (BELLUOMINI, 1984). No decorrer das décadas, o Instituto Butantan percebeu um declínio na recepção de serpentes. Um fato relacionado à redução dos biomas, que têm sido dramaticamente afetados por queimadas, desmatamento, grilagens, avanço das fronteiras agrícolas e garimpo, mudanças climáticas, ocupação humana, o que têm contribuído com a redução da biodiversidade (GIBBONS et al., 2000; SILVA, 2020). Outras influências são as dificuldades para o envio e transporte dos animais até o Instituto, e a matança indiscriminada causada pela aversão das pessoas às serpentes, resultante de desinformação e preconceito, que afetam até serpentes inofensivas (BERNARDE, 2014). Assim, o incremento de técnicas de manutenção, criação e sucesso reprodutivo de serpentes em cativeiro tem grande importância para a autossuficiência do Instituto.

As serpentes peçonhentas de importância em saúde, enquanto produtoras de matéria prima para a pesquisa e produção de biofármacos, ainda não tem status de animal de produção, nem seu domínio reprodutivo. Nas últimas décadas houve um incremento no conhecimento da biologia reprodutiva das serpentes neotropicais, entretanto, a maioria desses estudos investigaram exemplares depositados em coleções científicas e museus, além de dados pontuais registrados em campo e cativeiro (PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006).

O Laboratório de Herpetologia possui uma longevidade alta das serpentes, como resultado de procedimentos higiênico-sanitários e de bem-estar animal, possibilitando a realização de estudos reprodutivos capazes de acompanhar os mesmos indivíduos, ao logo de várias estações. O acompanhamento de longa duração pode identificar características comportamentais e da biologia reprodutiva, somente possível de serem observados em animais vivos, tais como ciclos hormonais, acompanhamento das fases da vitelogênese, parâmetros seminais, e o momento da indução da ovulação. Esses conhecimentos

contribuem para a eficiência reprodutiva em cativeiro e oferecem subsídios para a aplicação de técnicas de reprodução assistida para espécies que não reproduzem naturalmente em cativeiro, assim como para a conservação de espécies vulneráveis.

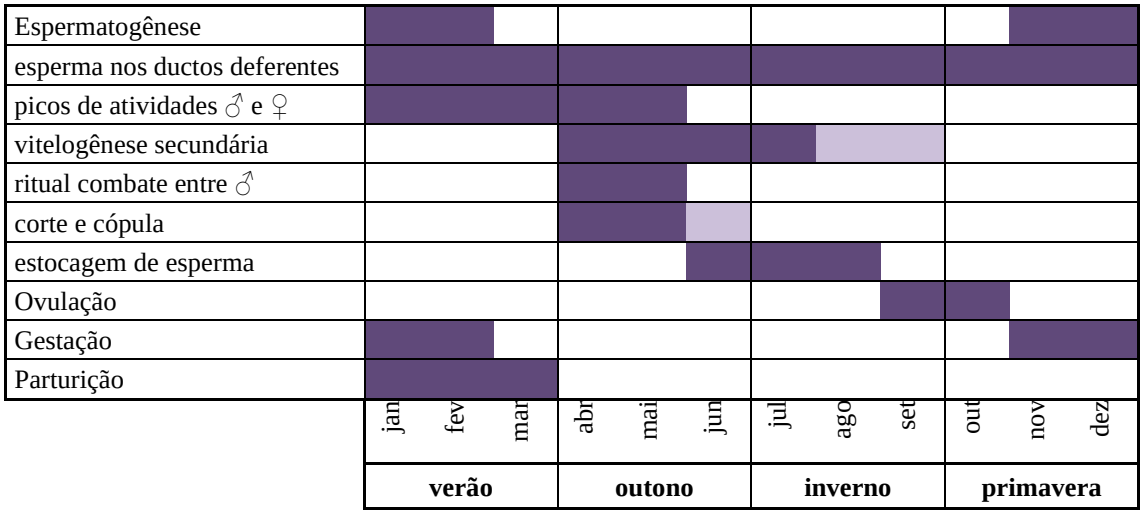
2.2. CICLOS REPRODUTIVOS NO GÊNERO *BOTHROPS*

A jararaca-da-Amazônia (*Bothrops atrox*) pertence à família Viperidae, a qual inclui cascavéis, surucucus-pico-de-jaca, víboras europeias, africanas e asiáticas, sendo assim uma família de ampla distribuição geográfica, desde regiões temperadas até equatoriais (PYRON; BURBRINK; WIENS, 2013; HAMDAN et al., 2020; THE REPTILE DATABASE, 2021). O gênero *Bothrops*, que inclui cerca de 30 espécies de jararacas em território brasileiro, é caracterizado por serpentes vivíparas, com dimorfismo sexual, cujas fêmeas são maiores que machos (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; HAMDAN et al., 2020; BARBO et al., 2022a, 2022b). Segundo Almeida-Santos & Salomão (2002), o ciclo reprodutivo de fêmeas de jararacas mostra-se similar ao da maioria dos viperídeos de regiões temperadas, permitindo a extrapolação do conhecimento destas espécies a seus congêneres neotropicais. Muitas espécies de viperídeos apresentam reprodução do tipo sazonal com frequência anual, e seus ciclos reprodutivos são categorizados conforme a época de ocorrência do acasalamento, espermatogênese, vitelogênese, ovulação, gestação ou postura, eclosão ou parturição (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; TAYLOR; DENARDO, 2011). Diversos fatores bióticos e abióticos influenciam a reprodução destas serpentes entre eles temperatura, pluviosidade, altitude, filogenia, modo de forrageamento, tamanho do corpo e a condição corporal (VITT, 1992; ALDRIDGE; DUVALL, 2002).

No Brasil, o ciclo reprodutivo do gênero *Bothrops* se inicia com o período de corte e acasalamento no outono, e a vitelogênese secundária ocorrendo do início do outono (estação seca) até o início da primavera (quadro 1). Passado o período de cópula, os espermatozoides ejaculados permanecem estocados no trato reprodutor feminino ao longo do inverno, para que posteriormente se desencadeie a ovulação, fertilização e embriogênese durante a primavera e verão (períodos mais quentes e úmidos do ano) (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). A distribuição destes eventos reprodutivos ao longo das estações do ano são condizentes com aqueles relatados para viperídeos de áreas temperadas (SHINE, 1977; MACARTNEY; GREGORY, 1988; ALMEIDA-SANTOS;

SALOMÃO, 2002). Na maioria das espécies estudadas, os nascimentos de filhotes ou postura de ovos ocorrem em épocas de maior disponibilidade de recursos alimentares e melhores condições climáticas (SAINT-GIRONS, 1982). Dentro de uma mesma população, nem todas as fêmeas estão reprodutivas. Individualmente, as fêmeas podem apresentar reprodução bienal ou maior, pois a condição corporal individual interfere diretamente na frequência reprodutiva (DUVALL; ARNOLD; SCHUETT, 1992; BONNET; NAULLEAU; MAUGET, 1994).

Quadro 01: Representação dos eventos reprodutivos no gênero *Bothrops*.



Fonte: Almeida-Santos & Salomão (2002)
Legenda: Faixas em tom roxo indicam abrangência dos períodos. Faixas em lilás indicam possível extensão do período.

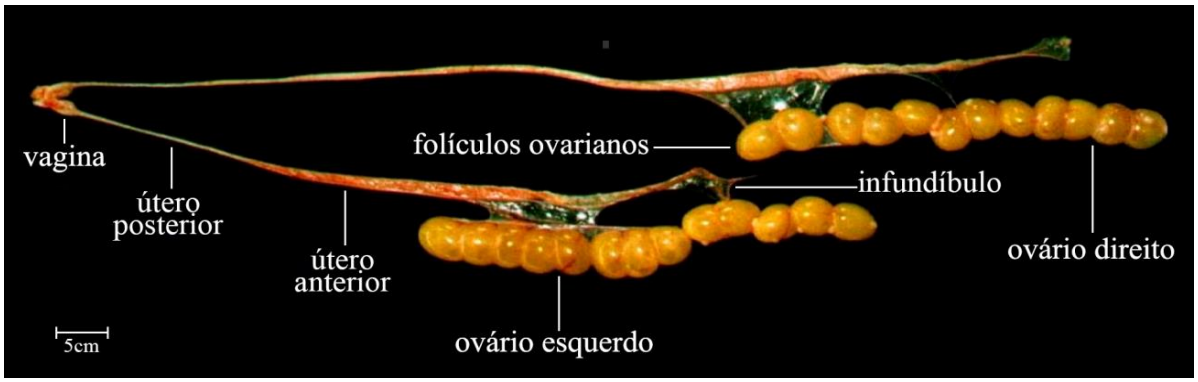
Por habitar uma região equatorial, a jararaca-da-Amazônia apresenta alta plasticidade na cronologia de seus eventos reprodutivos, visto que tanto gestação quanto parturição podem ocorrer ao longo do ano com picos discretos em determinadas épocas (BISNETO; KAEFER, 2019; SILVA et al., 2019, 2020a). A viviparidade é outra característica reprodutiva das jararacas (gênero *Bothrops*), em que há a retenção do embrião no útero da mãe até o desenvolvimento embrionário se completar, resultando em um recém-nascido completamente desenvolvido (GUILLETTE, 1993; ALBERGOTTI; GUILLETTE, 2011). A vitelogênese concentra-se na transição da estação úmida para a estação seca (abril), coincidindo com a estação de acasalamento e estocagem de esperma. Na ocasião da cópula, é praticado o ritual de dança-combate entre machos, onde se estabelecem os papéis de dominância e subordinação, e status de prioridade para ter acesso à fêmea (WÜSTER et al., 1997; CAMPBEL; LAMAR, 2004; AUERBACH, 2005; SANT'ANNA et al., 2007a; SILVA et al., 2017, 2019; BISNETO; KAEFER, 2019).

2.3. APARELHO REPRODUTOR FEMININO E A VITELOGÊNESE EM SERPENTES

O aparelho reprodutor das serpentes é composto por dois ovários dispostos assimetricamente, sendo o ovário direito mais cranial em relação ao ovário esquerdo. Possui também dois ovidutos, cada qual ligado ao seu respectivo ovário, dividido em infundíbulo, útero anterior (granular) e útero posterior (longo e sem pregas). Por fim, possui uma vagina bilobada (figura 4). Esses órgãos estão fixos à parede dorsal do corpo pelo mesovário (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Os ovários podem apresentar folículos sem deposição de vitelo (esbranquiçados e transparentes) ao longo do ano, tanto em fêmeas jovens quanto em adultas não-reprodutivas. Já os folículos com deposição de vitelo (amarelados) são encontrados em fêmeas reprodutivas do grupo das jararacas, geralmente no outono e inverno (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; PIZZATTO; ALMEIDA-SANTOS; MARQUES, 2006; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2020). O infundíbulo (localizado paralelo aos ovários) é uma estrutura fina que recebe os folículos durante a ovulação. O útero é responsável pelo desenvolvimento embrionário e possui diversas câmaras onde permanece cada ovo/embrião. Em jararacas e cascavéis, o útero posterior apresenta uma torção onde ocorre a estocagem de esperma após a cópula, e dilata-se durante a gestação; esta torção é chamada Uterine Muscular Twist (UMT), e permite que as fêmeas façam este armazenamento até o momento da ovulação (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 1997; ALMEIDA-SANTOS, 2005). Algumas espécies, como a jararaca-da-Amazônia, além do útero posterior, também fazem estocagem de esperma no infundíbulo, em glândulas que funcionam como receptáculos de estocagem de esperma (SILVA et al., 2019, 2020b).

Figura 3: Aparelho reprodutor feminino de jararaca (*B. jararaca*).



Fonte: Almeida-Santos (2005).

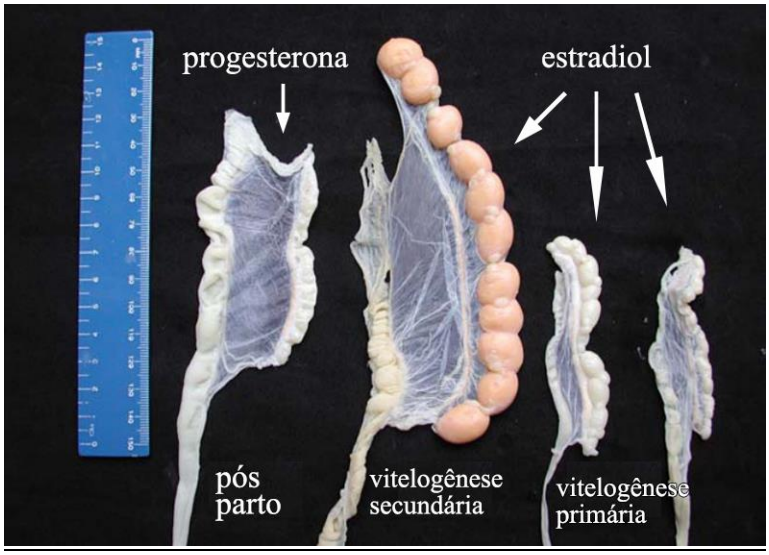
Entre os vertebrados, um folículo ovariano compreende o oócito, com sua zona pelúcida acelular, além de camadas circundantes associadas de células da granulosa e tecal separadas por membrana própria (NORRIS; CARR, 2021). Em répteis, em contraste com aves e mamíferos, a oogênese e a foliculogênese continuam ao longo da vida reprodutiva da fêmea (JONES et al., 1982). Na maioria dos répteis, o crescimento do folículo e a vitelogênese (produção de gema) ocorrem sazonalmente, de modo que a morfologia ovariana e a produção de hormônios variam muito ao longo do ciclo anual, embora a atividade ovariana seja contínua em algumas espécies tropicais (LICHT, 1984).

Os folículos ovarianos das serpentes, numa análise anatômica macroscópica, podem ser observados a olho nu após a remoção da membrana pleuroperitoneal (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2020). Apresentam dois estágios de crescimento: a vitelogênese primária (V1), que é a fase quiescente, e a vitelogênese secundária (V2), que é a fase ativa do desenvolvimento folicular (figura 5) (ALDRIDGE, 1979). Na vitelogênese primária os folículos apresentam tamanho pequeno e pouco cálcio em sua composição. No processo da vitelogênese secundária ocorre aumento do tamanho dos folículos, com a deposição de vitelo, tornando o folículo rico em cálcio, lipídeos, proteínas e fosfoproteínas (DESSAUER; FOX, 1959; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014).

A vitelogênese consiste no processo de aumento da dimensão folicular, com o acúmulo de íons, sais minerais e vitelo, que vão nutrir o embrião até o seu nascimento (DESSAUER; FOX, 1959). Em répteis, o crescimento folicular e a maturação geralmente envolvem a deposição de grandes quantidades de vitelo, que é derivado da molécula precursora vitelogenina, uma lipofosfoglicoproteína de grande peso molecular que é sintetizada no fígado (WALLACE, 1985). Portanto, vitelogênese é o processo de síntese hepática de vitelogenina e seu transporte para os oócitos. A vitelogenina é sequestrada pelos oócitos via endocitose mediada por receptor e, em seguida, armazenada em

compartimentos ligados à membrana (POLZONETTI-MAGNI et al., 2004). Este processo requer a mobilização de reservas maternas significativas, o que torna a condição corpórea maternal em um fator chave na reprodução de serpentes, pois estas substâncias são recrutadas a partir de suas reservas de energia, armazenada em forma de gordura celomática (BONNET; NAULLEAU; MAUGET, 1994; BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2020).

Figura 4: Diferentes estágios foliculares e influência hormonal (estrógeno e progesterona) nos folículos ovarianos de cascavéis e jararacas.



Fonte: Almeida-Santos (2005).

A capacidade da fêmea acumular reservas de energia corpórea para investir em reprodução é diretamente dependente da disponibilidade de presas em seu habitat (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2020). Este requisito impede a reprodução anual em fêmeas de algumas espécies, como as víboras vivíparas (*Vipera* spp.) (BONNET; NAULLEAU; MAUGET, 1994) e explica a presença de fêmeas adultas reprodutivas e não-reprodutivas dentro de uma mesma população (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). O investimento energético é representado na ninhada, com a geração de filhotes que já nascem prontos e independentes, considerando que o cuidado parental é raro em serpentes assim como na maioria dos répteis (BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2020). A deposição de vitelo é coincidente com a regressão de gordura corpórea em serpentes, tornando assim a vitelogênese o evento central na reprodução (DESSAUER; FOX, 1959; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

2.4. HORMÔNIOS QUE REGULAM O CICLO REPRODUTIVO FEMININO EM SERPENTES

O controle endócrino em répteis, assim como em todos os vertebrados, é realizado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (ou hipotálamo-pituitário-gonadal, HPG). Fatores ambientais naturais, como temperatura e fotoperíodo, a presença de locais de nidificação adequados e disponibilidade de alimentos, influenciam o sistema nervoso central e o eixo HPG (CALLARD; CHAN; POTTS, 1972; POLZONETTI-MAGNI et al., 2004). A princípio, a glândula pineal faz a mediação entre as condições ambientais e reprodução, através da secreção de melatonina, comunicando as mudanças de fotoperíodo e temperatura, e afetando o ciclo circadiano, termorregulação e atividade reprodutiva (TOSINI, 1997). O hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotrofina hipotalâmico (GnRH), que regula a liberação de gonadotrofinas (GTHs) pela hipófise: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH). Em fêmeas, as GTHs estimulam a produção de hormônios esteroides pelos ovários. Esses esteroides – andrógenos, estrógenos e progestágenos - são sintetizados a partir do colesterol, e podem exercer controle de feedback sobre a secreção de GTH no nível do hipotálamo (CALLARD; CHAN; POTTS, 1972). Os andrógenos são produzidos pelas células da teca interna sob estimulo do LH e são então transportados através da membrana basal folicular para a granulosa, onde são aromatizados em estrógenos sob a influência do FSH (WEBB et al., 2004).

Entretanto, comparado ao mesmo tema em mamíferos, o conhecimento aprofundado sobre o controle do HPG em répteis, especialmente em serpentes neotropicais, é escasso. Até o momento, não temos nenhuma evidência experimental de que um sistema semelhante opere em répteis. Bluhm et al. (2004) não conseguiram encontrar evidências de um receptor de LH em jararaca (*Bothrops jararaca*); eles foram capazes de clonar um cDNA para o receptor FSH (FSHR), e o FSHR foi expresso no ovário e testículos. Isso fornece evidências de que elas possuem apenas um único GTH que combina atividade semelhante a FSH e LH. O ovário é a principal glândula endócrina responsável pela secreção de hormônios esteroides sexuais em fêmeas de répteis. Estrogênios, androgênios e progestágenos são sintetizados e secretados pelo ovário e transportados pela corrente sanguínea até seus tecidos-alvo (JONES, 2011). Os estudos hormonais em reprodução de serpentes basicamente relacionam a concentração plasmática de esteroides sexuais com os eventos reprodutivos, incluindo cópula,

espermatogênese, vitelogênese e gestação. Os principais hormônios atuantes nos ciclos reprodutivos em fêmeas de serpentes são o 17ß-estradiol (E_2), Progesterona (P_4) e Testosterona (T) (TAYLOR; DENARDO; JENNINGS, 2004; JONES, 2011; TAYLOR; DENARDO, 2011). Pelo menos algumas das enzimas das vias esteroidogênicas parecem ser sensíveis à temperatura em répteis, sugerindo um mecanismo pelo qual a temperatura ambiente pode indicar mudanças sazonais na atividade do eixo HPG (GIRLING; JONES, 2006; JONES, 2011).

Segundo Almeida-Santos (2005) o ciclo ovariano em jararacas está sob influência de E_2 e P_4. As jararacas apresentam baixos níveis de estrógenos e progesterona quando em V1. A concentração de estrógenos aumenta significativamente na fase V2, decrescendo significativamente na fase ovulatória e mantendo-se baixa durante a gestação. E_2 é relacionado à promoção da vitelogênese e preparo do oviduto para a gestação (BONNET; NAULLEAU; MAUGET, 1994). O 17ßestradiol (E_2) estimula o fígado a sintetizar vitelogenina que, além do seu papel exercido na vitelogênese, também participa da composição de feromônios sexuais das fêmeas, para atração dos machos (CREWS; GARSTKA, 1982; HO et al., 1982; CALLARD; RILEY; PEREZ, 1990). Em jararacas, o período de vitelogênese secundária coincide com o período de cópula (verão e outono), portanto as fêmeas em V2 estão mais atrativas, o que favorece o encontro com os machos para fazer corte e acasalamento (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

A ovulação, ou liberação do oócito do ovário, é o culminar da vitelogênese e da maturação folicular, marcando a transição desta fase dominada por E_2 para a fase lútea dominada por P_4. As concentrações plasmáticas de estrogênios aumentam significativamente durante a vitelogênese tardia, à medida que os folículos amadurecem, e o pico ovulatório é estimulado por uma ação de feedback positivo de E_2 ao nível do hipotálamo (NISWENDER et al., 2000). Após a ovulação, as concentrações plasmáticas de E_2 diminuem rapidamente para os níveis pré-reprodutivos, à medida que o folículo pós-ovulatório é transformado no corpo lúteo, um órgão endócrino transitório responsável pela secreção de progesterona (P_4) (JONES, 2011).

Estudos em concentrações de P_4 indicam que este hormônio é sempre elevado durante a gestação em serpentes vivíparas, demonstrando seu papel na manutenção do evento (NAULLEAU; FLEURY, 1990; YAMANOUYE et al., 2004; TAYLOR; DENARDO, 2005, 2011). Almeida-Santos (2005) observou aumento da concentração de P_4 em jararacas (*Bothrops jararaca*), em vitelogênese secundária, o que poderia estar relacionado ao crescimento do epitélio ovidutal. Esta concentração se manteve

significativamente alta durante o período de ovulação e todas as fases da gestação. P_4 é secretada pelo corpo lúteo na fase pós-ovulatória, e tem sido vista como antagonista do estradiol, inibindo a vitelogênese via "feedback" negativo, agindo diretamente no fígado (HO et al., 1982; NAULLEAU; FLEURY, 1990; BONNET et al., 2001; GIRLING, 2002; TAYLOR; DENARDO, 2011). Bonnet et al. (2001) estima que o aumento de P_4 no inverno, observado especialmente em fêmeas pós-reprodutivas de *Vipera aspis*, pode agir como bloqueadora da vitelogênese em fêmeas emaciadas, pois P_4 pode inibir a síntese hepática de vitelogenina. Desta forma, estas fêmeas não-vitelogênicas tornam-se não-atrativas para cópula, e permite que façam um investimento energético em outro ciclo reprodutivo (CALLARD et al., 1992; ALMEIDA-SANTOS, 2005).

O tamanho da ninhada depende diretamente dos folículos que se tornam vitelogênicos, com exceção daqueles que se tornam degenerados (atrésicos) antes da ovulação. Níveis elevados de atresia observados durante a gestação estão positivamente correlacionados com concentrações plasmáticas elevadas de P_4 durante esta fase reprodutiva e podem refletir a inibição da secreção de gonadotropinas por P_4, resultando na inibição do desenvolvimento folicular (JONES, 2011).

A testosterona é sintetizada pelo ovário, e é encontrada em baixas concentrações durante o ano em fêmeas reprodutivas, com uma ligeira elevação na primavera, o que pode ser devido à produção de E_2, já que T é precursora de E_2 na biossíntese esteroide (EDWARDS; JONES, 2001; EDWARDS; JONES; DAVIES, 2003; TAYLOR; DENARDO, 2011). O aumento de T durante a vitelogênese foi observado em *Naja naja* e nas espécies de serpentes marinhas filipinas *Acrochordus granulatus*, *Cerberus rhynchops* e *Laticauda colubrina* (86,87). Entretanto as duas classes de esteroides mais intimamente associadas com a reprodução em fêmeas de serpentes são os estrogênios e os progestágenos (JONES, 2011).

2.5. IMAGENS ULTRASSONOGRÁFICAS EM ESTUDOS REPRODUTIVOS

O modo de vida secreto das serpentes dificulta as observações em campo e a possibilidade de acompanhar o mesmo animal por períodos mais longos. Por isso, vários estudos da biologia reprodutiva de serpentes têm sido majoritariamente anatômicos, limitados à histologia dos órgãos reprodutivos masculinos para quantificar o momento da espermatogênese, e o exame dos tratos reprodutivos femininos para evidências de vitelogênese e gestação (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; LIRA-DA-SILVA,

2009). Neste sentido, estudos de biologia reprodutiva com animais *in vivo* podem ser realizados com técnicas minimamente invasivas. A imagem ultrassonográfica em tempo real fornece uma técnica não invasiva e não disruptiva para obter imagens da anatomia interna e externa das gônadas, e para caracterizar eventos reprodutivos, tais como: estágios foliculares, ovulação, desenvolvimento embrionário e fetal (GRIFFIN; GINTHER, 1992). A técnica permite a avaliação frequente ou contínua de animais individuais, permitindo o acompanhamento de relações sequenciais dentro e entre as estruturas.

Há algumas décadas as análises ultrassonográficas do trato reprodutivo, com aplicações clínicas e de pesquisa, têm sido utilizadas para acompanhar os eventos reprodutivos em grandes animais domésticos como equino, bovinos, caprinos e ovinos (GINTHER, 1986; PIERSON; GINTHER, 1988; ADAMS, 1999; IRELAND et al., 2000). Também tem sido uma técnica aliada no acompanhamento reprodutivo de espécies ameaçadas da fauna silvestre, como grandes mamíferos: elefantes, rinocerontes e girafas (ADAMS et al., 1991; HILDEBRANDT et al., 2006), mamíferos de menor porte como primatas neotropicais (DOMINGUES et al., 2007; COUTINHO et al., 2013; MIRANDA et al., 2018), e outras ordens (CAMPOS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; PEIXOTO et al., 2019).

Em serpentes, os estudos de monitoramento reprodutivo por imagens ultrassonográficas têm sido aplicados ainda em menor proporção que os estudos histológicos. Ocorre uma concentração maior em espécies não peçonhentas gigantes, que estão entre as mais comumente presentes na criação em cativeiro. O acompanhamento do ciclo reprodutivo da jiboia (*Boa constrictor*) e outros boídeos neotropicais como a sucuri (*Eunectes murinus*), cobra-veadeira (*Corallus hortulanus*) e jiboia arco-íris (*Epicrates cenchria*) foi realizado utilizando unicamente acompanhamento de imagens ultrassonográficas (BERTOCCHI et al., 2021; GARCIA; ALMEIDA-SANTOS, 2021). No acompanhamento do ciclo reprodutivo de píton-bola (*Python regius*) foram utilizadas as imagens ultrassonográficas associadas com níveis hormonais encontrados em amostras fecais (BERTOCCHI et al., 2018). A técnica também se mostrou eficiente para a determinação sexual em pitonídeos (GNUDI et al., 2009).

O uso de equipamento ultrassonográfico portátil possibilita estudos de ecologia do desenvolvimento e reprodutiva *in situ*, tais como o realizado em uma população de cascavel do deserto de Sonora (*Crotalus atrox*), a qual foi acompanhada com a associação do uso de radiotelemetria (TAYLOR; DENARDO, 2005); e com duas populações

simpátricas de *Tamnophis sirtalis* e *Tamnophis elegans*, em que fora constatada a diferença no timming do desenvolvimento embrionário entre estas espécies, mesmo estando inseridas no mesmo contexto ambiental (SPARKMAN et al., 2018).

2.6. ANÁLISES DOS HORMÔNIOS SEXUAIS EM SORO SANGUÍNEO

O monitoramento por USG, de mudanças morfológicas, podem ser associados com o acompanhamento de variações hormonais, comportamentais e outros eventos, proporcionando assim avanços nas pesquisas reprodutivas em animais vivos (GRIFFIN; GINTHER, 1992). Considerando o mecanismo de funcionamento do eixo HPG, no qual os GnRH e GRH são liberados na corrente sanguínea para atuação nos tecidos específicos, torna-se essencial dosar as concentrações hormonais plasmáticas, para acompanhar o ciclo reprodutivo de um determinado organismo.

É importante considerar técnicas minimamente invasivas para obtenção de amostras para dosagens hormonais, com o intuito de causar mínimo stress ao animal, quando se trata de acompanhamento contínuo. Para isso são utilizadas técnicas de obtenção de amostras a partir de análise fecal, onde são obtidos metabolitos de hormônios sexuais. Em mamíferos, como exemplo o rinoceronte, o intervalo entre a alimentação, formação do bolo fecal e excreção, pode ser em média um a dois dias. Como resultado, os metabólitos encontrados nas fezes deste animal podem representar as oscilações hormonais ocorridas dentro deste intervalo (BERKELEY et al., 1997).

Considerando o metabolismo típico de animais ectotérmicos, como é o caso das serpentes, os metabólitos presentes no bolo fecal representam um acúmulo dentro do intervalo entre a alimentação e a excreção, que pode ser em média uma semana ou mais. Um estudo realizado com píton-bola (*Python regius*) relacionou achados de ultrassonografia com concentrações hormonais obtidas a partir de metabolitos fecais, porém com a limitação de que ainda não foi estudada a correlação de hormônios plasmáticos com hormônios fecais em serpentes, para que haja a validação da técnica (BERTOCCHI et al., 2018). Portanto a opção mais precisa, para dosagens hormonais, é a colheita de sangue pela veia coccígea. Estudos já realizados em répteis vivíparos, como o lagarto-de-língua-azul *Tiliqua nigrolutea*, a víbora áspide, *Vipera aspis,* e a jararaca (*Bothrops jararaca*) demonstraram a viabilidade da colheita de amostra sanguínea como técnica minimamente invasiva (NAULLEAU; FLEURY, 1990; EDWARDS; JONES,

2001; GREGO, 2006; SANT'ANNA et al., 2007b) .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para a realização deste monitoramento foram utilizadas 6 fêmeas adultas de jararaca-da-Amazônia nascidas em cativeiro, de uma mesma ninhada, com 4 anos de idade no início do experimento, primíparas, pertencentes ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em caixas plásticas transparentes com medidas de 56x38x20cm, substrato de papelão corrugado e água à vontade (figura 7). A temperatura e umidade do ambiente foram mantidas à 20-25ºC e 70%, respectivamente. As serpentes foram alimentadas mensalmente com 10 a 20% do seu peso em roedores, previamente abatidos. Vale ressaltar que todas as fêmeas eram saudáveis e sexualmente maduras no momento do experimento, tendo como referência Silva et al. (2019) que encontraram em seus estudos fêmeas reprodutivas com tamanho mínimo de comprimento rostro-cloacal (CRC) de 66,5cm.

Tabela 1: Relação das fêmeas de jararaca-do-Norte (*Bothrops atrox*) utilizadas no estudo, com seus respectivos dados biométricos, data de nascimento e procedência.

serpente	crc-ct (cm)	Peso (g)	data nascimento	procedência
Bax01	102-117	864	28/nov/17	São Bento - MA
Bax02	107-120	890		
Bax03	107-123	780		
Bax04	99,5-112	813		
Bax05	105-120	860		
Bax06	120-135	943		

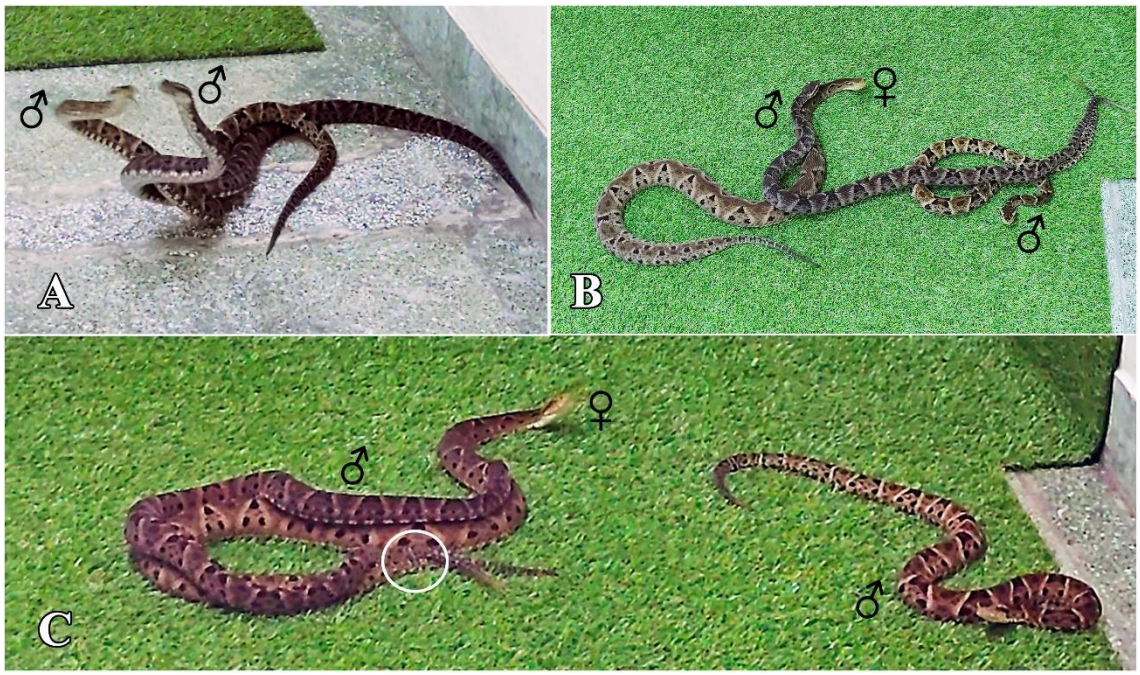
Figura 5: Fêmea de jararaca-da-Amazônia mantida em caixa plástica, forrada com papelão corrugado e água à disposição

Fonte: Acervo pessoal (2021)

3.2. PAREAMENTO REPRODUTIVO

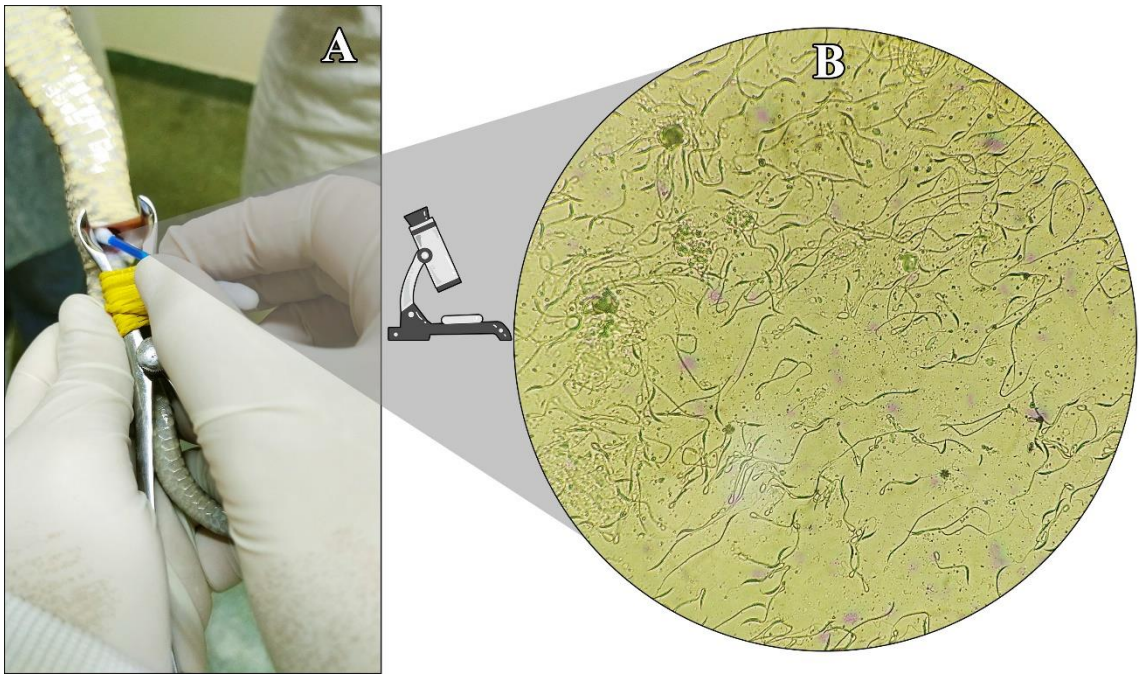
O presente estudo teve 2 períodos de tentativas de cópula, correspondendo à época reprodutiva e vitelogênese secundária do grupo das jararacas (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002) , durante o Outono e Inverno dos anos I e II do estudo. Em uma sala destinada apenas para este fim, cada fêmea foi pareada com 2 machos. Esta espécie realiza ritual de dança combate, sendo este confronto importante para o estímulo da cópula em jararacas do grupo *Bothrops atrox* (WÜSTER et al., 1997; SILVA et al., 2019). Em cada tentativa, os grupos permaneciam no recinto por pelo menos 24 horas. Após a retirada dos animais, as fêmeas eram submetidas a um *swab* na vagina bilobada, e o material analisado ao microscópio, em busca de espermatozoides, o que poderia confirmar a ocorrência de cópula.

Figura 6: Machos e fêmea reunidos para cópula.



Fonte: Acervo pessoal (2022)
Legenda: (A) Machos em posição de ritual combate. (B) Presença da fêmea (serpente maior e mais clara), com macho escuro iniciando alinhamento dorsal sobre ela. (C) Macho vencedor do combate alinhando-se dorsalmente sobre a fêmea, e macho perdedor ao lado. Círculo indica região genital acoplada.

Figura 7: (A) Swab vaginal e (B) presença de espermatozóides na observação ao microscópio ótico (40x)



3.3. EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS

Mensalmente, no mesmo dia da colheita de sangue, foram realizados exames ultrassonográficos nas fêmeas, para a verificação do estágio em que se encontravam os folículos ovarianos. O equipamento utilizado para as análises foi o aparelho de ultrassom portátil Sonosite Titan com transdutor de 7 a 10mHz. Os animais foram contidos fisicamente em tubos transparentes e imersos em água morna para a realização do exame (figura 9 A e B). Folículos ovarianos foram categorizados segundo o estudo de Janeiro-Cinquini et al. (1993) em 4 estágios de acordo com a vitelogênese e diâmetro dos folículos:

Quadro 2: Classificação das estruturas observadas nas imagens ultrassonográficas.

estágios		dimensões	
não vitelogênico	**E-I**	≤0,5 cm	
	E-II	≥0,6 e ≤1,0cm	
vitelogênico	**E-III**	≥1,1 e ≤2,0cm	
	E-IV	≥2,1 e ≥3,0cm	
Gestação **(O/E)**	ovo / embrião no oviduto: >3,0cm		

3.4. DOSAGENS HORMONAIS

De março de 2020 até novembro de 2021, mensalmente, foram colhidos 1mL de sangue de cada fêmea para dosagens hormonais. O sangue foi colhido pela punção da veia coccígea com agulha e seringa descartáveis (figura 9 C) e acondicionado em tubo de

ensaio sem anticoagulante. Posteriormente o soro foi separado e armazenado a -80ºC até a sua utilização para dosagens séricas hormonais.

As dosagens hormonais séricas de estradiol e progesterona foram realizadas através da técnica de radioimunoensaio (RIE) pela Provet Veterinária Diagnóstica. O princípio desta técnica baseia-se na reação antígeno-anticorpo, usando-se como competidor o hormônio a ser dosado, marcado com ^{125}I. As concentrações hormonais foram medidas em:

- Progesterona: P_4, em ng/mL
- Estradiol: E_2 em pg/mL

Figura 8: Exame ultrassonográfico e punção da veia coccígea:

Fonte: Acervo pessoal (2021)

Legenda: (A) Animal contido em tubo de borracha e imerso em água morna. (B) Punção da veia coccígea para obtenção de amostra sanguínea. (C) Equipe técnica na qual o primeiro técnico contém a serpente, o segundo movimenta o transdutor, o terceiro faz a contagem das estruturas e registra as imagens.

3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos dados foram realizadas através do programa SAS System for Windows 9.3 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Primeiramente as variáveis foram avaliadas quanto às premissas estatísticas da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias por meio do pacote “Guided Data Analysis-SAS”. Avaliamos separadamente o efeito de cada hormônio (estradiol e progesterona) em cada estágio folicular (E-I, II, III, IV) e estruturas no oviduto, através do teste de Fisher (LSD). Também através do teste de Fischer, avaliamos separadamente o efeito das estações (outono, inverno, primavera e verão) sobre as concentrações de cada hormônio ao longo do estudo. O nível de significância utilizado para rejeitar a Hipótese nula (H0) foi de 5% ($p<0,05$). Os dados foram descritos através da média e erro padrão da média.

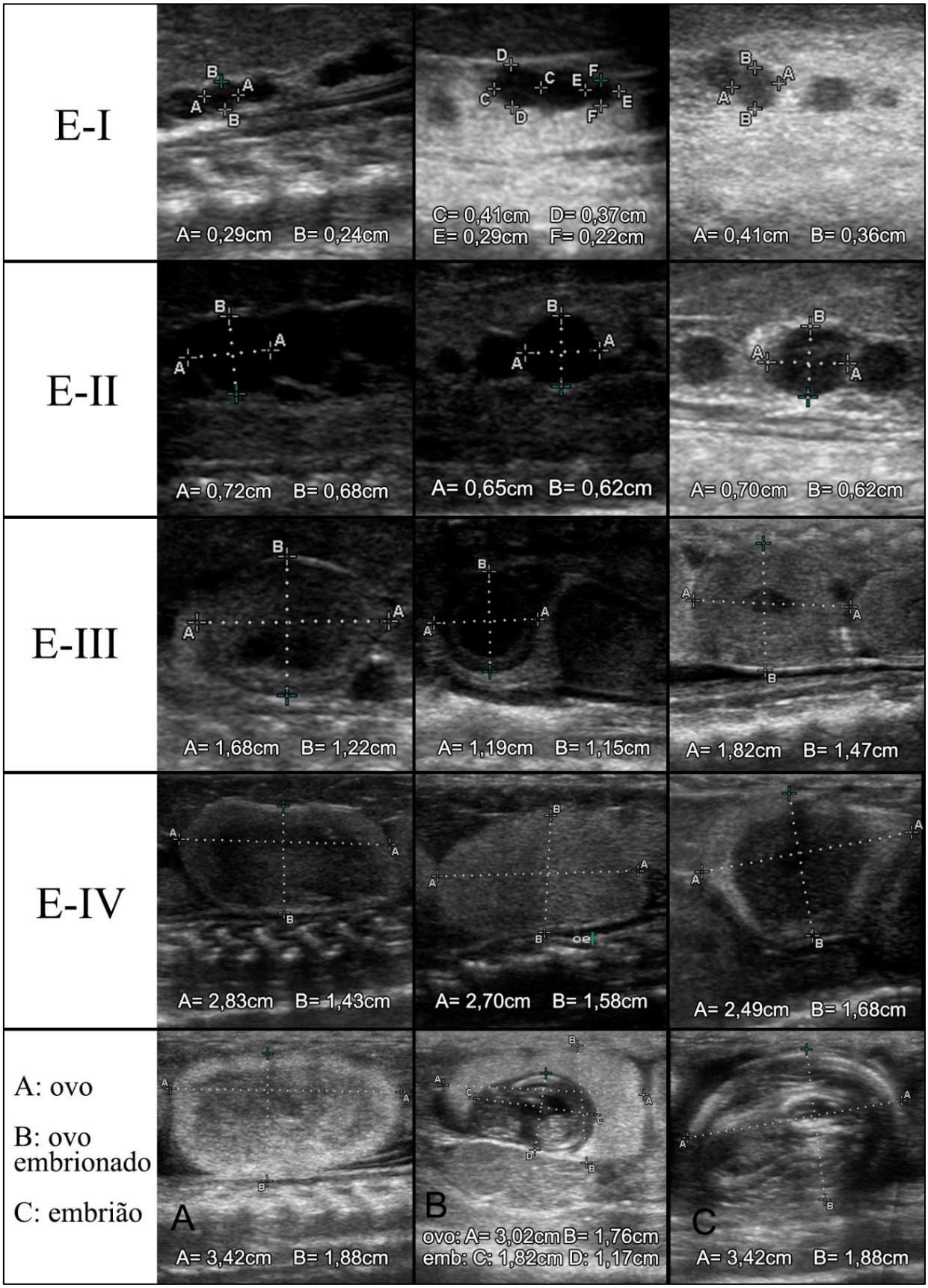
Devido as particularidades apresentadas por cada serpente, também foram realizadas análises descritivas individuais.

4. RESULTADOS

O período de colheita de dados do presente estudo ocorreu de março/2020 a novembro/2021, o que abrangeu dois períodos de outono (março a maio/2020 e março a maio/2021), dois períodos de inverno (junho a agosto/2020 e junho a agosto/2021), dois períodos de primavera (setembro a novembro/2020 e setembro a novembro/2021) e um período de verão (dezembro/2020 a fevereiro/2021). Portanto, para melhor descrição dos resultados e discussão, alguns eventos serão relacionados a ano I e ano II.

Houve um total de 90 tentativas de colheita de sangue, com um sucesso de 83 colheitas, representando eficiência de 92%. Em algumas serpentes houve a dificuldade de punção na veia coccígea, o que explica a ausência de dados hormonais em algumas datas. Também foram realizados 90 exames ultrassonográficos, 15 em cada serpente. Em alguns meses ocorreram impedimentos técnicos para a realização das atividades, devido a contratempos com a equipe de trabalho. A colheita sanguínea e os exames ultrassonográficos foram realizados pela mesma equipe técnica, com funções definidas, para garantir a padronização na obtenção dos dados.

Figura 9: Exemplos de imagens de estágios foliculares, ovos e embriões observados nas análises ultrassonográficas.



Fonte: Acervo pessoal (2021)

Em todas as fêmeas foram observados vários estágios foliculares simultaneamente. Os folículos não-vitelogênicos E- I e E-II são anecogênicos ao exame ultrassonográfico, apresentando-se na cor preta nas imagens. Os folículos vitelogênicos E-III, E-IV, e os ovos, são ecogênicos e aparecem em escala de cinza (figura 8). Devido à suas dimensões, os folículos vitelogênicos, ovos e embriões são vistos eventualmente encobrem a visão dos folículos E-I e E-II nos exames ultrassonográficos. Sendo assim, todos os dados expostos são referentes a estruturas que foram possíveis observar e quantificar no exame ultrassonográfico, podendo não representar fielmente a presença de todas as categorias de folículos das serpentes examinadas.

Em relação aos partos, as serpentes que ficaram prenhes geraram tanto ovos fertilizados que deram origem a filhotes vivos e natimortos, quanto ovos que não se desenvolveram, conforme exemplo da fêmea Bax05 em seu primeiro parto, na figura 10.

Figura 10: Fêmea Bax05 logo após o parto

Imagem: Caroline Tié Vespasiano (2020)

4.1. ANÁLISES DESCRITIVAS INDIVIDUAIS DAS FÊMEAS

Apesar da padronização do grupo experimental e das condições de manejo, visando o melhor controle das variáveis que pudessem interferir no estudo, as fêmeas apresentaram padrão reprodutivo diferentes entre si. Entretanto, no gráfico 1 é possível

observar ocorrências em comum: os picos de E_2 que em meses de outono e inverno, as concentrações elevadas de E_2 em meses de gestação, as concentrações de P_4 que se mantém sempre baixas, elevando-se nos meses de gestação, além da completa ausência de folículos vitelogênicos nos meses de verão e outono em algumas fêmeas.

A fêmea Bax01 não teve cópulas comprovadas nem gestações durante o estudo, sendo a única com níveis de P_4 baixos em todas as dosagens. Apresentou oscilações na concentração de E_2 ao longo do estudo, com picos nos meses de outono, em comum com as demais fêmeas do estudo. Apresentou folículos vitelogênicos E-IV somente na primavera do ano II do estudo. Em agosto (ano II) não houve sucesso na obtenção de amostra de sangue.

A fêmea Bax02 apresentou duas gestações durante o estudo. Foi a única fêmea em que foi possível observar vários estágios foliculares durante as gestações. Teve cópulas confirmadas em junho e agosto (ano I), mas a cópula relativa à gestação do ano II não foi confirmada. Os níveis de E_2 se mantiveram elevados durante os meses da primeira gestação. O primeiro parto ocorreu 12 dias após a colheita de dados de dezembro e, após este evento, ainda apresentou folículos vitelogênicos por dois meses após o primeiro parto. Houve picos de P_4 durante a primeira gestação, mas na segunda gestação não foi detectado pico de P_4. O segundo parto desta fêmea ocorreu em meados do verão (fevereiro), após conclusão da colheita de dados.

Na fêmea Bax03 houve dificuldade na punção da veia coccígea em maio (ano I), gerando um volume de amostra sanguínea insuficiente para dosagem de E_2, e em agosto do mesmo ano, quando o volume da amostra foi insuficiente para ambas as dosagens hormonais. Houve cópula confirmada por *swab* somente no mês de maio do ano II. As concentrações de P_4 foram baixas durante todo o estudo, ocorrendo um pico durante a gestação, na última colheita do estudo, juntamente com o segundo pico de E_2. Esta serpente pariu no verão (janeiro), após conclusão da colheita de dados.

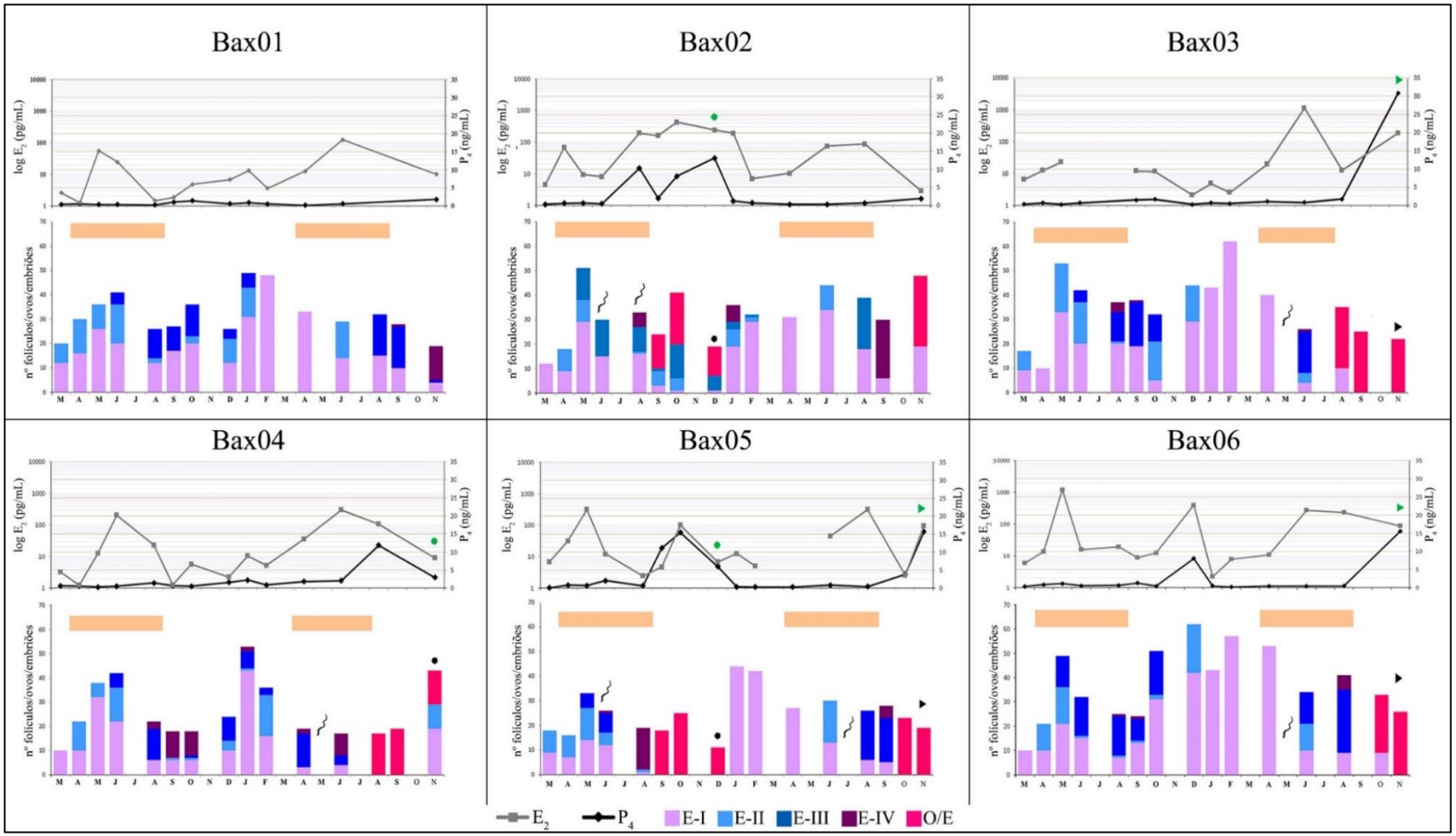
Bax04 apresentou folículos vitelogênicos a partir do primeiro pico de E_2, no início do inverno do ano I, e a partir de então foram observados folículos vitelogênicos até a sua gestação no final do inverno do ano II. Assim como Bax02 apresentou folículos E-III e E-IV no verão. Teve cópula confirmada por *swab* cloacal em maio do ano II. O pico de P_4 foi observado também no final do inverno juntamente com alta concentração de E_2, e tendência a queda na concentração dos dois hormônios no mês do parto. O parto ocorreu dez dias após a última colheita de dados, esta última colheita também mostrou tendência de queda de concentração de P_4 e E_2.

Bax05 também apresentou 2 gestações durante o estudo. Ocorreu cópula confirmada em junho, e a gestação ocorreu durante a primavera até início do verão (setembro a dezembro – ano I). Pariu 8 filhotes vivos e 9 ovos atrésicos, 15 dias após a colheita de dados. Neste período vale destacar que houve um pico de E_2 juntamente com pico de P_4 no mês de outubro. A segunda cópula foi confirmada em junho (ano II), enquanto os ovos e embriões foram observados a partir de outubro. As concentrações de P_4 se mantiveram baixas desde a última parturição, até ocorrer um pico em novembro (ano II) também coincidindo com um pico de E_2. Pariu no final do verão (fevereiro), após conclusão da colheita de dados. Em abril (ano II) não foi possível obter amostra de sangue suficiente para a dosagem de E_2.

A fêmea Bax06 se mostrou semelhante às fêmeas Bax03 e Bax04 pelo sucesso de cópula somente no ano II do estudo. Em relação a P_4, apresentou um pico atípico no mês de dezembro do ano I, quando só foram observados folículos não vitelogênicos, sem haver qualquer sinal de ovulação ou gestação em seguida. Esta fêmea também apresentou concentração elevada de E_2 junto com pico de P_4 durante a gestação, na última observação do estudo. Pariu no final do verão (fevereiro) após a conclusão do estudo.

Para uma análise comparativa dos resultados hormonais, foliculares e gestacionais de cada fêmea, a figura 11 apresenta o conjunto dos gráficos individuais, onde pode-se observar as oscilações dos hormônios E2 e P4 alinhadas verticalmente com os períodos em que ocorreram as cópulas, vitelogênese primaria e secundária, e gestação. Pode-se notar que alguns eventos ocorreram nos mesmos períodos em algumas serpentes. Entretanto, para confirmar ou refutar qualquer semelhança, os dados de todas as serpentes foram agrupados e submetidos aos testes de comparação de médias. Os gráficos individuais encontram-se separadamente no Apêndice deste trabalho.

Figura 11: Junção comparativa dos gráficos individuais de cada fêmea, com as respectivas oscilações hormonais, estágios foliculares e gestação durante o período do estudo.



Legenda: As faixas ( ) indicam períodos de pareamento; ( )indica cópula. (✹) indica parto; (►) indica ocorrência de parto após conclusão do estudo. E-I e E-II: estágios foliculares não-vitelogênicos; E-III e E-VI: estágios foliculares vitelogênicos; O/E: gestação (ovo e embriões observados no oviduto).

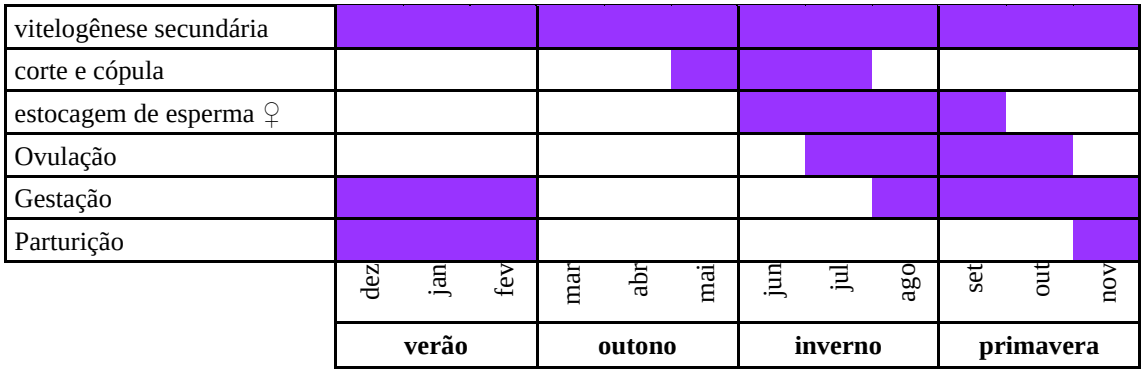
O quadro 3 apresenta os resultados individuais em que cada fêmea apresentou seus respectivos eventos reprodutivos, tais como mês de cópula, estimativa de ovulação (que será melhor explicada na apresentação do gráfico 6), meses de observação da gestação e resultado das parturições. O período de estocagem de esperma foi calculado considerando a diferença entre o mês de ocorrência da cópula e o mês de estimativa da ovulação. Assim como o período de gestação foi calculado considerando a diferença entre o mês de estimativa da ovulação e o mês de ocorrência do parto.

Quadro 3: Resumo da estimativa dos períodos de estocagem de esperma, ovulação e período de gestação do grupo experimental. (*) indica ausência de confirmação de cópula antes desta gestação

CÓPULAS E GESTAÇÕES							
Fêmea	*mês de cópula*	*estimativa ovulação*	*1ª observação no oviduto*	*parto*	tempo estimado		*prole*
					estocagem de esperma	*gestação*	
Bax02	jun/20	ago/20	set-20	dez-20	1 mês	4 meses	5 filhotes vivos, 1 teratogênico morto e 9 ovos atrésicos
Bax02	*	out/21	nov-21	fev-22	*	4 meses	6 filhotes e 24 ovos atrésicos
Bax03	mai/21	jul/21	ago-21	jan-22	1 mês	6 meses	14 filhotes vivos, 2 natimortos e 1 ovo atrésico
Bax04	mai/21	jul/21	ago-21	nov-21	1 mês	4 meses	3 filhotes vivos, 3 teratogênicos mortos, 1 teratogênico vivo, 7 ovos atrésicos
Bax05	jun/20	ago/20	set-20	dez-20	1 mês	4 meses	8 filhotes vivos e 9 ovos atrésicos
Bax05	jul/21	set/21	out-21	fev-22	2 meses	5 meses	7 filhotes vivos e 14 ovos atrésicos
Bax06	mai/21	set/21	out-21	fev-22	3 meses	5 meses	1 natimorto e 27 ovos atrésicos

O quadro 4 apresenta um resumo do período de cada evento reprodutivo que o grupo experimental de jararaca-do-Norte apresentou em cativeiro na realização deste estudo.

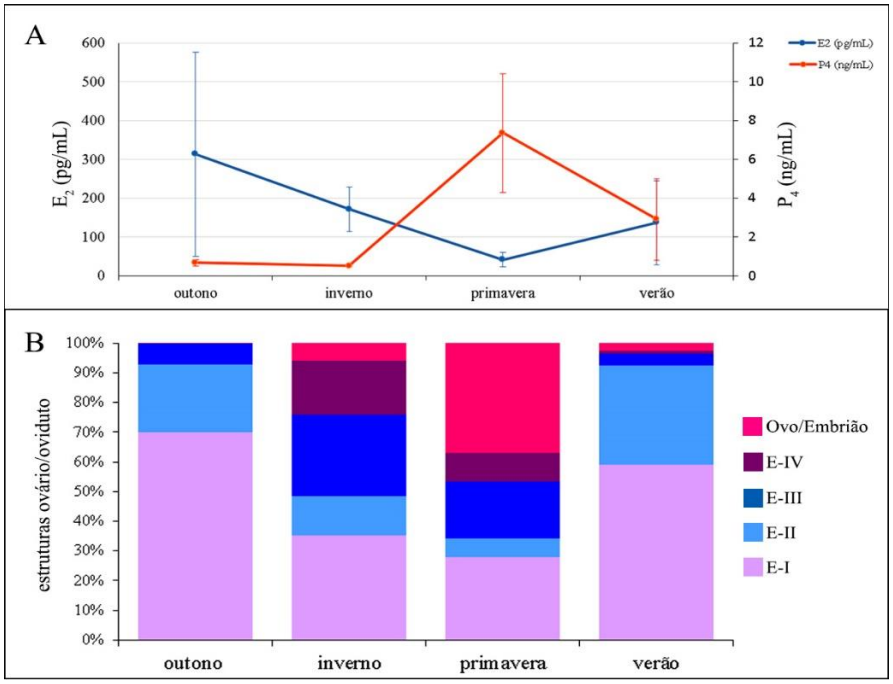
Quadro 4: Resumo estimado dos eventos reprodutivos apresentados pelo grupo de jararacas-do-Norte.



4.2. ANÁLISES DESCRITIVAS CONJUNTAS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Devido as diferenças apresentadas pelas fêmeas, representadas pelos dados individuais de concentrações hormonais, estágios foliculares e gestação ao longo do estudo, os dados foram agrupados e processados para a busca de possíveis tendências sazonais na presença e predominância das estruturas das gônadas, bem como tendências nas concentrações hormonais. O gráfico 1 apresenta a junção destes dados, numa primeira análise, onde as oscilações hormonais (gráfico 1A) estão alinhadas com o a presença e predominância de cada estágio folicular e gestação (gráfico 1B) ao longo das estações. Observa-se que as maiores concentrações de E_2 foram registradas no outono, e as menores na primavera. Também na primavera observamos as maiores concentrações de P_4. O gráfico 1B apresenta maior número de folículos vitelogênicos no inverno, e maior número de estruturas no oviduto na primavera.

Gráfico 1: (A) Variação dos perfis médios hormonais e (B) Estágios foliculares/estruturas observadas no oviduto ao longo das estações do ano.

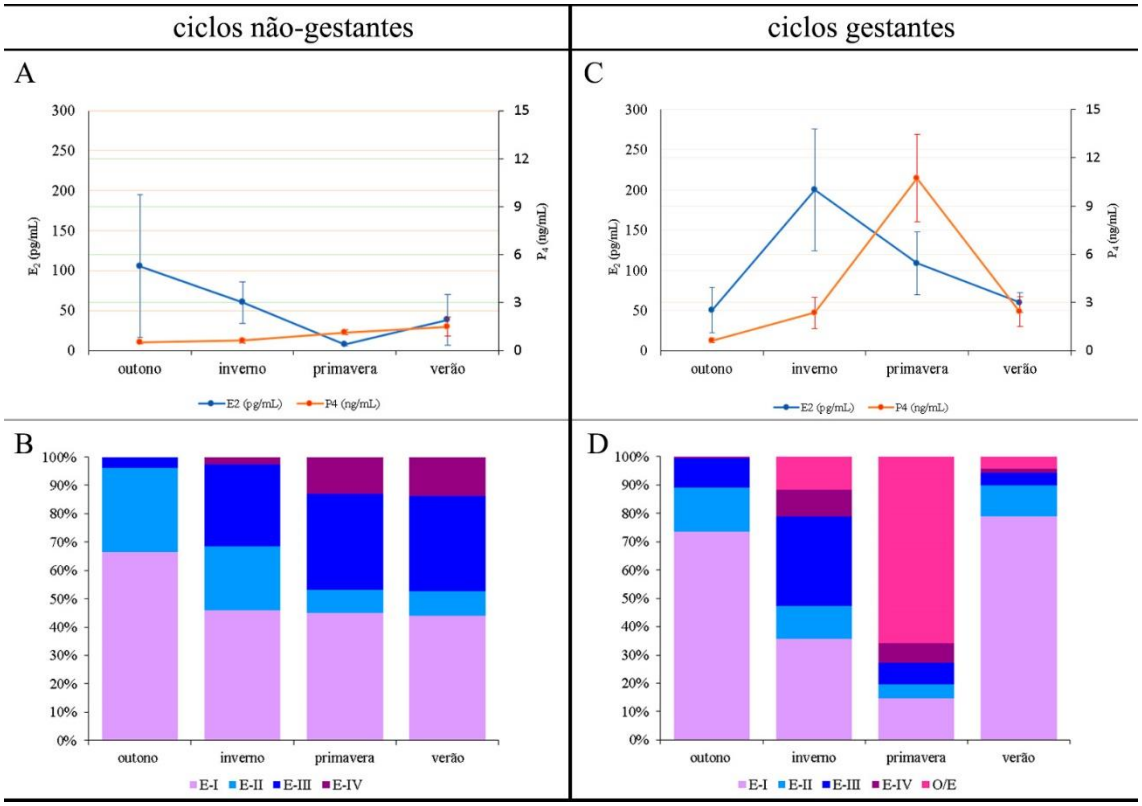


Legenda: E-I e E-II: estágios foliculares não-vitelogênicos; E-III e E-IV: estágios foliculares vitelogênicos; Ovo/Embrião: estruturas de gestação observadas no oviduto.

Considerando que as serpentes apresentaram resultados diferentes quanto à gestação, em que houve uma fêmea que não gestou durante o estudo, fêmeas que gestaram duas vezes, e fêmeas que gestaram apenas no ano II, os dados de cada serpente foram

divididos em ciclos. O gráfico 2 apresenta os resultados hormonais dos ciclos não gestantes (A) alinhados com os respectivos dados das observações ultrassonográficas (B), bem como os resultados hormonais dos ciclos gestantes (C) alinhados com suas respectivas observações ultrassonográficas (D). No gráfico 2A não ocorre elevação dos níveis de P_4 em estação alguma, enquanto o gráfico 2C mostra elevação das concentrações de P_4 na primavera, na mesma estação em que se observa maior número de estruturas nos ovidutos (ovos/embriões) nos exames ultrassonográficos (gráfico 2D). Em relação às concentrações de E_2, o gráfico 3A mostra nos ciclos não-gestantes uma queda de concentrações do outono até a primavera, o que difere do gráfico 2C em que ocorre picos de concentração no inverno nos ciclos gestantes. No gráfico 2B há semelhança na proporção de folículos vitelogênicos E-III e E-IV na primavera e verão, enquanto no gráfico 2D vê-se a maior proporção de folículos vitelogênicos no inverno, o que está alinhada com a maior concentração de E_2, observada no gráfico 2C.

Gráfico 2: Perfis médios hormonais (A e C) e proporção das quantidades de estágios foliculares/ estruturas no oviduto (B e D), relacionando dados de ciclos gestantes e não gestantes.



Legenda: E-I e E-II: estágios foliculares não-vitelogênicos; E-III e E-VI: estágios foliculares vitelogênicos; Ovo/Embrião representam as estruturas de gestação observadas no oviduto

Analisando a distribuição das concentrações hormonais em relação às estações do ano, observa-se no gráfico 3A que E_2, apesar dos picos no outono, apresenta as maiores concentrações no inverno. O gráfico 3B mostra, semelhantemente aos gráficos anteriores, as maiores concentrações de P_4 na primavera, ainda que ocorram picos importantes no inverno e no verão. Na análise de comparação de médias, para testar o efeito das estações do ano sobre as concentrações hormonais, os valores de E_2 foram transformados em $\log_{10}$, e os valores de P_4 foram transformados no inverso da raiz quadrada. Em relação a E_2, o teste mostrou diferença significante entre o inverno e as demais estações (gráfico 3A). Em relação a P_4, o teste assinalou a primavera com diferença significante em relação às demais estações, enquanto houve semelhança entre o outono e o inverno, entre o inverno e o verão, porém, com diferença entre outono e verão (gráfico 3B).

Gráfico 3: Distribuição das concentrações hormonais ao longo das estações do ano, sendo (A) representando Estradiol e (B) representando Progesterona. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os estágios.

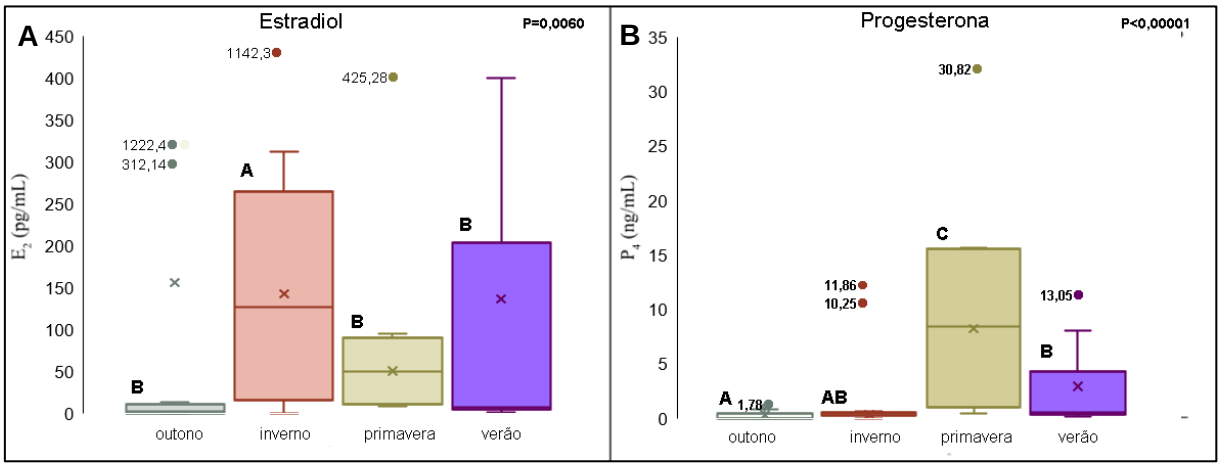
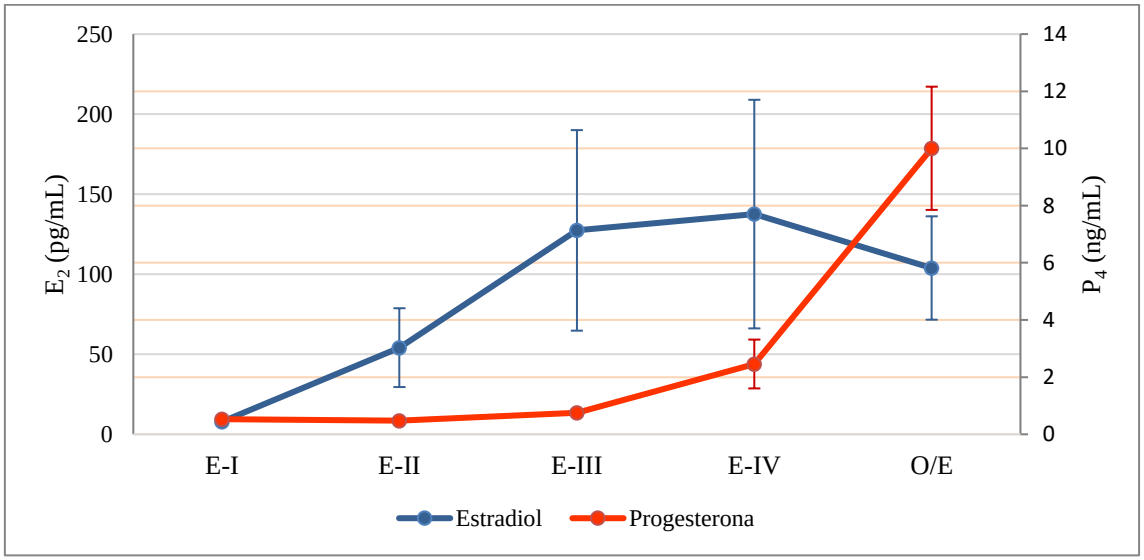


Tabela 2: Análises de comparação de médias entre os perfis dos hormônios E_2 e P_4 com as estações do ano. Os dados foram apresentados pela média e erro padrão da média. Os valores de estradiol foram transformados em $\log E_2$, e os valores de P_4 foram transformados em $1/\sqrt{P_4}$. Houve diferença estatística quando $p<0,05$. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre as estações.

hormônio	outono	inverno	primavera	verão	P
E_2	**81,72 ±53,53^{B}**	**153,70 ± 54,56^{A}**	**60,86 ± 24,28^{B}**	**51,29 ± 26,06^{B}**	**0.0060**
P_4	**1,73 ± 0,66^{A}**	**0,59 ± 0,08^{AB}**	**4,82 ± 1,33^{C}**	**2,20 ± 0,81^{B}**	**<0,0001**
N	24	22	19	18	

O gráfico 4 mostra uma análise de perfis médios hormonais comparando as concentrações em cada estágio folicular e na presença de ovos e/ou embriões no oviduto, isoladamente. Ou seja, é um comparativo das médias hormonais na presença de uma estrutura num determinado estágio, sem a presença de outras estruturas em estágios com nível de vitelogênese mais avançado ou na presença de alguma estrutura no oviduto. As concentrações de E_2 apresentam-se nos menores níveis nos folículos E-I, tendendo a elevar-se nos estágios foliculares subsequentes, alcançando maiores concentrações no estágio E-IV. As concentrações de E_2 tentem a cair quando ocorre gestação. Em relação à P_4, as concentrações tendem a elevar na presença de folículos E-IV e alcança os maiores níveis na gestação.

Gráfico 4: Perfis médios hormonais em relação aos estágios foliculares e estruturas presentes no oviduto (O/E= ovos/embriões).



O gráfico 5 representa a distribuição das médias de concentrações hormonais em relação a cada estágio folicular e gestação, utilizando os dados selecionados para o gráfico 4. Utilizamos a comparação de médias para analisar o efeito das concentrações hormonais de E_2 e P_4 sobre as estruturas examinadas por ultrassonografia. O gráfico 4A apresenta uma tendência estatística apontando uma diferença nas concentrações elevadas de E_2 sobre os folículos vitelogênicos E-III, E-IV e nas gestações (O/E). Em relação às concentrações de P_4, as médias se mostraram significantemente elevadas na presença de ovos e embriões no oviduto (O/E), como mostra o gráfico 4B. Também houve diferença nas médias de P_4 entre os folículos E-IV com os ovos e embriões no oviduto, enquanto as

médias deste hormônio esteve semelhante na presença dos folículos E-I, E-II e E-III (gráfico 4B).

Gráfico 5: Concentrações hormonais em relação a observação de cada estágio folicular e estruturas no oviduto, sendo (A) representando Estradiol e (B) representando Progesterona. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os estágios.

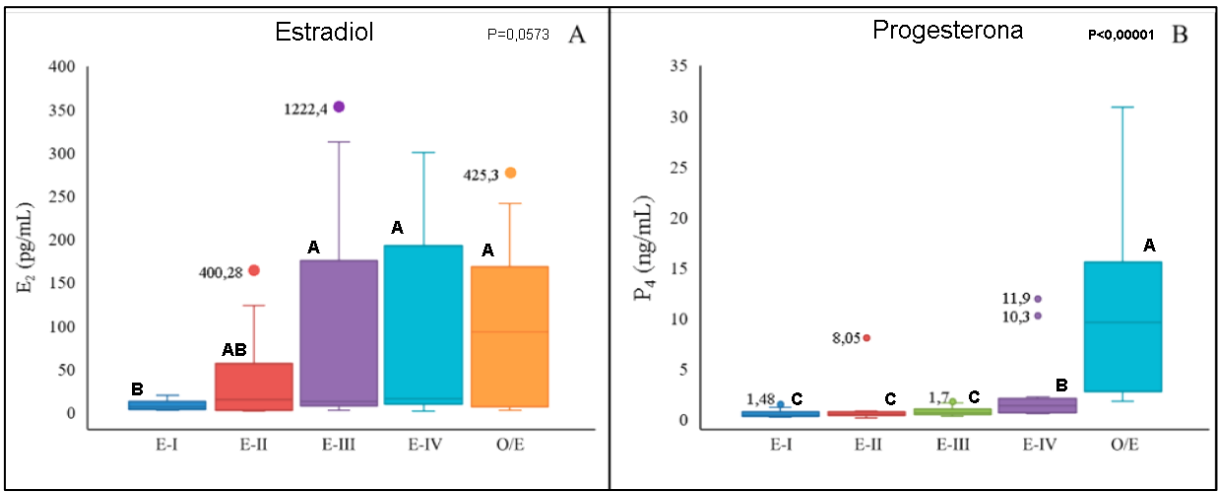


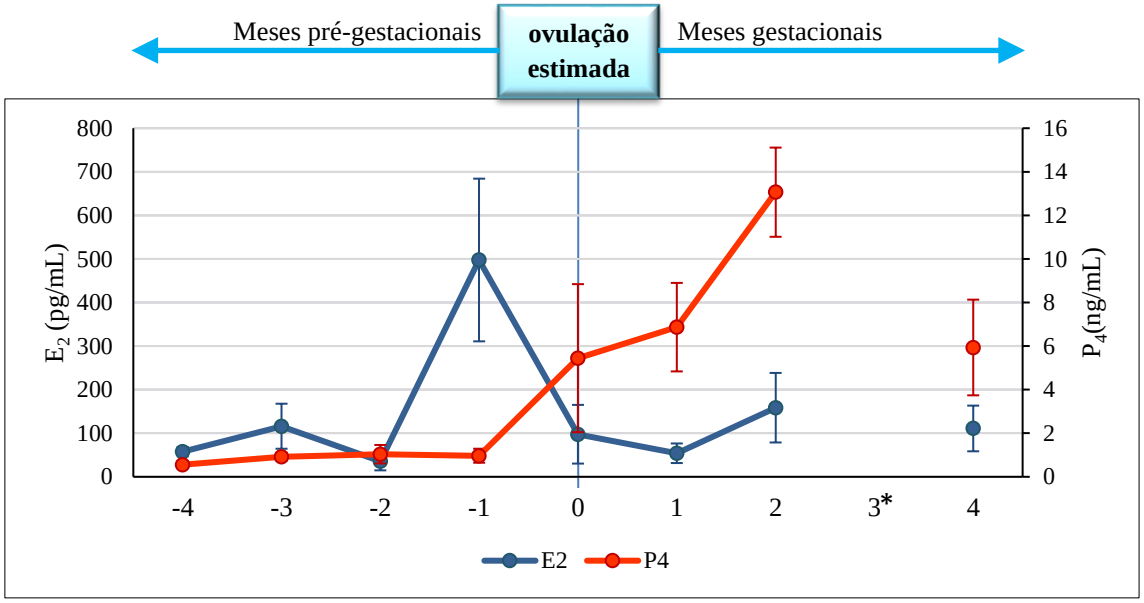
Tabela 3: Análises de comparação de médias entre os perfis dos hormônios E_2 e P_4 com os diferentes estágios foliculares e presença de ovos e embriões no oviduto. Os dados foram apresentados pela média e erro padrão da média. Houve diferença estatística quando p<0,05. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os estágios.

hormônio	E-I	E-II	E-III	E-IV	O/E	P
E_2	7,86 ±1,29^{B}	54,13 ± 24,62^{AB}	127,38 ± 62,65^{A}	137,56 ± 71,40^{A}	103,89 ± 32,29^{A}	0.0573*
P_4	**0,53 ± 0,09^{C}**	**0,48 ± 0,06^{C}**	**0,75 ± 0,09^{C}**	**2,46 ± 0,85^{B}**	**10,01 ± 2,16^{A}**	**<0,0001**
N	14	16	20	16	15	

(*) Indica tendência estatística.

O gráfico 6 mostra as variações hormonais conjuntas nos quatro meses que precederam a gestação (números negativos no eixo) e nos quatro meses em que ocorreram a gestação. No mês Zero estima-se que ocorreu a ovulação. Considerando assim, as concentrações de P_4 se mantiveram baixas nos meses pré-ovulatórios. Na sequência demonstra-se uma tendência a elevação no mês de ovulação, que vai culminar com um pico no mês dois de gestação. O mês quatro, após o qual a maioria dos partos foram registrados, já demonstra tendência à queda dos níveis. Os níveis hormonais zerados no mês três se deve à ausência de dados por impedimento de atividade da equipe técnica (coincidentemente nos anos I e II). As concentrações de E_2 apresentam um pico importante no mês estimado como pré-ovulatório.

Gráfico 6: Perfis médios hormonais no período pré-ovulatório e pós-ovulatório (gestacional), considerando o mês 0 (zero) como mês da ocorrência da ovulação. (*) indica ausência de dados no mês 3.



5. DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo reprodutivo *in vivo*, onde foi acompanhado o ciclo de um grupo de fêmeas do gênero *Bothrops* por um extenso período, avaliando suas concentrações hormonais associadas à variação das estruturas gonadais. A análise geral dos dados demonstram que, em cativeiro, os eventos do grupo experimental tenderam à similaridade com período reprodutivo padrão geral do grupo *Bothrops* (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002), porém, com algumas características da plasticidade no *timming* reprodutivo já observadas em outros estudos, tal como a vitelogênese secundária estendida (SANT'ANNA et al., 2007a; GREGO et al., 2011; ALMEIDA-SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2019).

O inverno foi a estação com destaque para maior liberação de E_2 (gráficos 2C e 3A), alinhado à maior contabilidade de folículos vitelogênicos dos estágios E-III e E-IV (gráfico 2D). Para reforçar esta relação, a comparação de médias mostrou tendência estatística entre E2 e os folículos vitelogênicos em estágio E-III e E-IV (gráfico 5A). Nota-se, ainda no gráfico 5A, semelhança nas concentrações de E2 na presença dos estágios vitelogênicos e na presença de estruturas de gestação. Isto pode ser explicado pela presença de folículos vitelogênicos e gestação ao mesmo tempo na fêmea Bax02 (gráfico 11). Considerando que a contabilidade dos folículos foi feita a partir da

possibilidade da visualização nas análises ultrassonográficas, vale lembrar que as grandes dimensões de ovos e embriões no oviduto geralmente encobrem a visão de possíveis folículos em outros estágios presentes no ovário. Este fato sugere que, as demais serpentes que também apresentaram concentrações elevadas de E_2 durante a gestação, possivelmente também estivessem com folículos vitelogênicos. O destaque é a diferença significante das concentrações de P_4 na presença de folículos E-IV, como indicado no gráfico 5B. Sendo assim, ocorrendo gestação e vitelogênese ao mesmo tempo, pode-se explicar as altas concentrações de E_2 durante as gestações, como mostrados pelos gráficos 4 e 5A.

Entretanto o gráfico 6 sugeriu com mais clareza o papel desempenhado por E2 na vitelogênese e preparo do oviduto para gestação, e que este hormônio seja responsável pela ovulação devido ao seu aumento gradativo antes, e queda após este evento, tal como descrito por Bonnet et al (1994). Este padrão assemelha-se ao apresentado por mamíferos (SCHWARTZ, 2000). Portanto, no que se refere à atividade de E_2, os resultados deste estudo reforçam o papel que este hormônio exerce na promoção da vitelogênese, preparo do oviduto para gestação e influência no comportamento reprodutivo desta espécie, assim como já fora observado em outras espécies de viperídeos, tais como *Vipera aspis*, *Crotalus durissus* e *Bothops jararaca*, bem como em *Thamnophis sirtalis parietalis* (Colubridae), além de observado em estudos comparativos entre tartarugas e lagartos (CREWS; GARSTKA, 1982; HO et al., 1982; BONNET; NAULLEAU; MAUGET, 1994; ALMEIDA-SANTOS, 2005).

As concentrações de P_4 se mostraram significantemente elevadas na primavera em todas as análises, e na mesma época foram observadas a presença de ovos e embriões no oviduto com maior frequência e quantidade. Na comparação de médias entre P_4 e as estações do ano (gráfico 3B), nota-se que as gestações iniciadas no final do inverno (Bax03 e Bax04 no ano II – figura 11), assim como as gestações que finalizaram no verão (Bax02 e Bax05 – figura 11), influenciaram na semelhança estatística das concentrações deste hormônio entre inverno e verão. A queda das concentrações de P_4 ocorreu com maior frequência no verão, mesma época em que também ocorreu a maioria dos nascimentos (gráfico 2C, quadro 3 e 4). Sendo assim, os dados reforçam o papel de P_4 na manutenção da gestação destas fêmeas, assim como já comprovada a influência deste hormônio em *Bothrops jararaca*, *Crotalus atrox*, além de outras serpentes vivíparas (TAYLOR; DENARDO; JENNINGS, 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005; TAYLOR; DENARDO, 2011).

Segundo Taylor & DeNardo (2011), os estudos já realizados em serpentes indicam fortemente que estas utilizam o eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal semelhante ao de outros vertebrados, com ciclo influenciado pelo fotoperíodo anual. As fêmeas desse estudo foram mantidas sob o mesmo fotoperíodo artificial durante o ano, com umidade e temperaturas também controladas. É sugestivo que a filogenia tenha exercido influência no ciclo destas fêmeas, porém, para afirmar se é significante a influência da sazonalidade da região geográfica onde são mantidas, sobre o ciclo reprodutivo do grupo de jararaca-do-Norte, é necessária a realização de um estudo semelhante, agregando dados mais precisos da variação de temperatura e umidade do biotério, para nos dar maiores informações de qual variável influencia no ciclo reprodutivo, quando estes animais são mantidos em biotério. A influência do outono e inverno sugere o estímulo para as elevações das concentrações de E_2 nestes períodos e assim dar início aos processos de vitelogênese e receptividade para cópula. No geral, o pico vitelogênico ocorreu durante a época seca da região Sudeste (final do outono e durante o inverno), em especial a região de domínio da Mata Atlântica. Estes achados assemelham-se em parte aos descritos por Silva (2019), em que a jararaca-do-Norte apresentou ciclo vitelogênico no final da estação chuvosa e início da seca amazônica, correspondendo aos meses de janeiro a agosto, bem como o extenso período de vitelogênese secundária.

O intervalo entre as datas de confirmação de cópula e a estimativa da ovulação sugerem que ocorreu estocagem de esperma obrigatória em condições de cativeiro (quadros 3 e 4), enquanto no habitat da espécie a estocagem pode ser facultativa, devido a haver condições favoráveis para reprodução durante todo o ano (ALMEIDA-SANTOS, 2005; BISNETO; KAEFER, 2019; SILVA, 2019; SILVA et al., 2019, 2020b).

A realização deste estudo nos leva a elaborar questões que necessitam de futuras investigações, referentes à regulação do ciclo hormonal das jararacas. É preciso determinar o mecanismo de regulação/inibição da progesterona e estradiol nas serpentes, pois é sugestivo que são hormônios não atuantes de forma antagonista. Importante determinar o momento e as condições da ovulação, e o período mais exato de gestação, para os quais há somente estimativas bastante imprecisas. Se faz necessário investigar os folículos que não geraram filhotes: os que não foram fertilizados, os que tiveram morte embrionária inicial, bem como qual a carga de espermatozóides viáveis mínima necessária para fertilizar todos os folículos que ovularam. Outro evento a ser investigado é a reabsorção de folículos. As análises ultrassonográficas das serpentes que não gestaram no ano I, permitiram acompanhar o surgimento e aumento de número de folículos

vitelogênicos no outono-inverno, e a posterior redução do número destes folículos no verão. Se os folículos em estágio IV são reabsorvidos, então faz-se necessário o estímulo no momento da cópula para que ocorra a ovulação? As espículas dos hemipênis dos machos têm alguma função além da fixação? A fêmea Bax01 chegou a formar folículos E-IV, porém não houve sucesso nos pareamentos, bem como as serpentes que não pariram no ano I. Somente as fêmeas que copularam expeliram ovos que não geraram filhotes. Outra questão a ser investigada é o que induz e qual o mecanismo de reprogramação celular que leva à reabsorção de folículos.

O grupo de serpentes deste estudo teve o máximo de variáveis controladas, sendo irmãs da mesma ninhada, primíparas, mantidas em igual condições de alimentação, abrigo, temperatura e umidade, mesmas tentativas de pareamento. Entretanto nem todas as fêmeas foram reprodutivas, ou não o foram no ano I. Supostamente, todo o grupo tinha vitelogenina circulante, o que poderia promover a receptividade e interação com os machos para acasalamento. Sendo assim, este estudo mostra que, mesmo em cativeiro com condições controladas, nem todas as fêmeas de uma mesma população são reprodutivas na estação de acasalamento, corroborando os estudos de Taylor & DeNardo (2011) e Almeida-Santos et al (2014). Vale também considerar a disposição individual dos machos pareados no momento da cópula. É importante investigar os parâmetros hormonais sexuais mínimos, em fêmeas e machos com comportamento receptivo e estimulado para a cópula.

Em viperídeos do hemisfério norte, como *Crotalus atrox* (distribuída pelo Mexico e centro-sul dos Estados Unidos) foram observadas baixas concentrações de E_2 e P_4, ao longo do ano, em fêmeas não reprodutivas, enquanto nas fêmeas reprodutivas E_2 foi elevado durante a primavera, que é o período de vitelogênese da espécie e outras de regiões temperadas (TAYLOR; DENARDO, 2005, 2011). *Vipera aspis*, viperídeo europeu, possui o mesmo padrão sazonal reprodutivo de *C. atrox*, com vitelogênese na primavera e parturição no final do verão. Esta espécie apresentou altos níveis de E_2 plasmático em fêmeas reprodutivas na primavera, com declínio no início do verão, permanecendo basal (SAINT GIRONS; BRADSHAW; BRADSHAW, 1993). Esses períodos diferem do que foi apresentado no presente estudo por *B. atrox*, que mostrou, em cativeiro, picos de E_2 e maior contagem de folículos vitelogênicos no outono e inverno, se assemelhando com a víbora verde arborícola chinesa *Trimeresurus stejnegeri*, além das cascavéis neotropicais e jararacas (TSAI; TU, 2001; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005;

BARROS; ROJAS; ALMEIDA-SANTOS, 2020).

Os picos de P_4 foram observados nas serpentes reprodutivas, sempre associados à presença de ovos e embriões no oviduto, iniciando nos meses de agosto ou setembro (final do inverno/início da primavera), com queda no final da primavera e, na maioria das vezes, durante o verão, com os nascimentos dos filhotes. Isso relaciona a função de P_4 ao período de gestação, assim como na cascavel *C. atrox*, na qual P_4 é elevado em fêmeas reprodutivas de meados da primavera até meados do verão, com picos no início do verão, correspondendo com o período de gestação da espécie. Os dados deste estudo também assemelham-se ao da cascavel neotropical (*C. durissus terrifcus*), na qual observou-se altos níveis de P_4 do fim do inverno até o verão, especialmente durante a gestação (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002; ALMEIDA-SANTOS et al., 2004; ALMEIDA-SANTOS, 2005). Em *N. naja* as concentrações de P_4 são semelhantemente elevadas da ovulação até a ovoposição (BONA-GALLO et al., 1980). Em fêmeas reprodutivas de *V. aspis*, as concentrações plasmáticas de P_4 são elevadas durante a gestação, que ocorre de meados da primavera até meados do verão; entram em declínio na parturição, no início do outono, e volta a aumentar durante o inverno (BONNET et al., 2001).

Ainda que as fêmeas demonstrassem padrões diferenciados entre si, o agrupamento de dados deste estudo foi importante para buscar tendências, que podem orientar aplicações futuras de protocolos de biotecnologia, para reprodução em cativeiro. Tais informações são necessárias para que as jararacas alcancem o domínio reprodutivo, seja por reprodução natural ou assistida, e assim colaborar com a autossuficiência dos plantéis destinados à produção de biofármacos, como também colaborar com a conservação das espécies vulneráveis.

6. CONCLUSÃO

O uso de imagens ultrassonográficas associadas às dosagens sanguíneas hormonais, como metodologia minimamente invasiva, mostrou ser uma relevante técnica a ser aplicada em estudos reprodutivos em serpentes *in vivo*, especialmente no acompanhamento dos mesmos animais por longos períodos. Não houve qualquer baixa nem estresse excessivo detectado, que causasse debilidade nas serpentes do grupo

experimental, devido a metodologia.

A jararaca-do-Norte é conhecida pela plasticidade em seu timming reprodutivo, como exemplo podemos citar a vitelogênese secundária estendida e a estocagem facultativa de esperma. Entretanto o grupo experimental, em cativeiro, mostrou altas concentrações de estradiol relacionadas à vitelogênese secundaria e ao período do inverno, bem como estocagem obrigatória de esperma. Além disso, as fêmeas apresentaram altas concentrações de progesterona relacionadas ao período de gestação e ao período da primavera, com queda em especial no verão, quando ocorreu a maioria dos partos.

Este trabalho contribui para agregar à literatura, tão escassa de estudos reprodutivos em viperídeos neotropicais, de ciclos reprodutivos de indivíduos acompanhados por um extenso período de tempo. Ainda há muitos estudos *in vivo* a serem desenvolvidos para melhor investigar a biologia reprodutiva da jararaca-do-Norte, quanto a de outras espécies do gênero *Bothrops*. Em especial as espécies que participam da cadeia de produção de soros antiofídicos, e cujo sucesso de cópula é raro em cativeiro, tal como a jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). É necessário que estas espécies alcancem o domínio reprodutivo, associando utilização de técnicas de biotecnologia, tais como colheita de sêmen, inseminação artificial e indução hormonal, como é amplamente utilizado em demais animais de produção domésticos.

REFERÊNCIAS

AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: primeira aproximação. **Geomorfologia**, v. 52, p. 1–22, 1977.

ADAMS, G. P. et al. Feasibility of characterizing reproductive events in large nondomestic species by transrectal ultrasonic imaging. **Zoo Biology**, v. 10, n. 3, p. 247–259, 1991.

ADAMS, G. P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 54, p. 17–32, 1999.

AGUIAR, W. S. et al. Ontogenetic study of *Bothrops jararacussu* venom composition reveals distinct profiles. **Toxicon**, v. 186, n. July, p. 67–77, 2020.

ALBERGOTTI, L. C.; GUILLETTE, L. J. Viviparity in Reptiles: Evolution and Reproductive Endocrinology. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. (Ed.). **Hormones and Reproduction of Vertebrates - Reptiles**. Academic Press, 2011. 3p. 247–275.

ALDRIDGE, R. D. Female Reproductive Cycles of the Snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, v. 35, n. 3, p. 256–261, 1979.

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

ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. Seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 143–150, 2004.

ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos Reprodutivos em Serpentes: estocagem de esperma e placentação em Crotalus durissus e Bothrops jararaca (Serpentes: Viperidae)**. 2005. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

ALMEIDA-SANTOS, S. M. et al. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 14–24, 2014.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. D. G. Long-Term Sperm Storage in the Female Neotropical Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese journal of herpetology**, v. 17, n. 2, 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. et al. (Ed.). **Biology of the Vipers**. USA: Eagle Mountain Publishing, 2002. 1p. 445–462.

AUERBACH, P. S. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 119, n. 3, p. 148, 2005.

BARBO, F. E. et al. Isolated by dry lands: integrative analyses unveil the existence of a new species and a previously unknown evolutionary lineage of Brazilian Lanceheads (Serpentes: Viperidae: Bothrops) from a Caatinga moist-forest enclave. **Canadian Journal of Zoology**, v. 100, n. 2, p. 147–159, 2022a.

BARBO, F. E. et al. Speciation process on Brazilian continental islands, with the description of a new insular lancehead of the genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae). **Systematics and Biodiversity**, v. 20, n. 1, p. 1–25, 2022b.

BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Biologia Reprodutiva das Serpentes Jararacas: Ciclos e Comportamentos, Dimorfismo e Maturidade Sexual**. São Paulo: Novas Edições Acadêmicas, 2020.

BELLUOMINI, H. E. Produção de veneno de serpentes em cativeiro: Comparação dos resultados entre serpentário exposto e aquecido. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 31, n. 4, p. 149–154, 1964.

BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 12, n. 45, p. 82–96, 1984.

BERKELEY, E. V et al. Serum and Fecal Steroid Analysis of Ovulation, Pregnancy, and Parturition in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*). **Zoo Biology**, v. 16, p. 121–132, 1997.

BERNARDE, P. S. **Serpentes Peçonhentas E Acidentes Ofídicos no Brasil**. 2ª ed. São Paulo: Anolis Books, 2014.

BERNARDE, P. S.; ABE, A. S. Hábitos alimentares de serpentes em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil Paulo. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 167–173, 2010.

BERTOCCHI, M. et al. Monitoring the reproductive in captive bred female ball pythons (*P. regius*) by ultrasound evaluation and noninvasive analysis of faecal reproductive hormone. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–29, 2018. Disponível em: <https://iris.unito.it/handle/2318/1670188>.

BERTOCCHI, M. et al. Monitoring of the reproductive cycle in captive-bred female *Boa constrictor*: Preliminary ultrasound observations. **Animals**, v. 11, n. 11, p. 16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani11113069>.

BISNETO, P. F.; KAEFER, I. L. Reproductive and feeding biology of the common lancehead *Bothrops atrox* (Serpentes, viperidae) from Central and Southwestern Brazilian Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 2, p. 105–113, 2019.

BLUHM, A. P. C. et al. Molecular cloning, sequence analysis and expression of the snake follicle-stimulating hormone receptor. **General and Comparative Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 300–311, 2004.

BONA-GALLO, A. et al. Annual cycles in levels of pituitary and plasma gonadotropin, gonadal steroids, and thyroid activity in the Chinese cobra (*Naja naja*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 42, n. 4, p. 477–493, 1980.

BONNET, X. et al. Changes in Plasma Progesterone in Relation to Vitellogenesis and Gestation in the Viviparous Snake *Vipera aspis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, n. 1, p. 84–94, 1 jan. 2001.

BONNET, X.; NAULLEAU, G.; MAUGET, R. The Influence of Body Condition on 17-β Estradiol Levels in Relation to Vitellogenesis in Female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 93, n. 3, p. 424–437, 1 mar. 1994.

CALLARD, I. P. et al. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. **Integrative and Comparative Biology**, v. 32, n. 2, p. 264–275, 1992.

CALLARD, I. P.; CHAN, S. W. C.; POTTS, M. A. The Control of the Reptilian Gonad. **American Zoologist**, v. 12, n. 2, p. 273–287, 1972.

CALLARD, I. P.; RILEY, D.; PEREZ, L. Vertebrate vitellogenesis: molecular model for multihormonal control of gene regulation. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 342, p. 343–348, 1990.

CAMPBEL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: Comstock Publishing /Cornell University Press, 2004.

CAMPOS, L. B. et al. Monitoring the reproductive physiology of six-banded armadillos

(*Euphractus sexcinctus*, Linnaeus, 1758) through different techniques. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 5, p. 736–742, 2016.

COUTINHO, L. N. et al. Analysis of follicular events in owl monkeys (*Aotus azarai infulatus*) using B-mode and Doppler ultrasound. **Theriogenology**, v. 80, n. 2, p. 99–103, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.03.018>.

CREWS, D.; GARSTKA, W. R. The Ecological Physiology of a Garter Snake. **Scientific American**, v. 247, n. 5, p. 158–168, 1982.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589–592, 1991.

DESSAUER, H. C.; FOX, W. Changes in ovarian follicle composition with plasma levels of snakes during estrus. **The American journal of physiology**, v. 197, p. 360–366, 1959.

DOMINGUES, S. F. S. et al. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (capuchin monkeys). **Theriogenology**, v. 68, n. 9, p. 1251–1259, 2007.

DONATO, H. Achegas para a história de Botucatu. p. 218p, 1954.

DUVALL, D.; ARNOLD, S.; SCHUETT, G. Pitviper mating systems: ecological potential, sexual selection and microevolution. **Biology of the Pitvipers**, v. 321, n. January, p. 321–336, 1992. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/259217937%0APitviper>.

EDWARDS, A.; JONES, S. M. Changes in plasma progesterone, estrogen, and testosterone concentrations throughout the reproductive cycle in female viviparous blue-tongued skinks, *Tiliqua nigrolutea* (Scincidae), in Tasmania. **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 260–269, 1 jun. 2001.

EDWARDS, A.; JONES, S. M.; DAVIES, N. W. Sex and season influence gonadal steroid biosynthetic pathways, end-product production and steroid conjugation in blotched blue-tongued lizards (*Tiliqua nigrolutea*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 134, n. 2, p. 131–138, 1 nov. 2003.

FORTI, M. C.; MOREIRA-NORDEMANN, L. M. Rainwater and throughfall chemistry in a Terra Firme' rain forest: Central Amazonia. **Journal of Geophysical Research**, v. 96, n. D4, p. 7415–7421, 1991.

GALIZIO, N. da C. et al. Compositional and functional investigation of individual and pooled venoms from long-term captive and recently wild-caught *Bothrops jararaca* snakes. **Journal of Proteomics**, v. 186, n. May, p. 56–70, 2018.

GARCIA, V. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive cycles of Neotropical boid snakes evaluated by ultrasound. **Zoo Biology**, v. 41, n. 1, p. 1–10, 2021.

GIBBONS, J. W. et al. The Global Decline of Reptiles, *Déjà vu* amphibians. **Bioscience**, v. 50, n. 8, p. 653–666, 2000.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare**. Wiscosin, U.S.A: Cross Plains, 1986.

GIRLING, J. E. The reptilian oviduct: A review of structure and function and directions for future research. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, n. 2, p. 141–170, 2002.

GIRLING, J. E.; JONES, S. M. In vitro steroid production by adrenals and kidney-gonads from embryonic southern snow skinks (*Niveoscincus microlepidotus*): Implications for the control of

the timing of parturition? **General and Comparative Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 169–176, 2006.

GNUDI, G. et al. Use of ultrasonography and contrast radiography for snake gender determination. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 50, n. 3, p. 309–311, 2009.

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

GREGO, K. F. et al. Ovarian Cycle of *Bothrops atrox*. In: Resumos da XIII Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. **Anais**... São Paulo, Brasil: Memórias do Instituto Butantan, 2011.

GREGO, K. F. et al. Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present: a scoping history. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, n. December 2020, p. 1–11, 2021.

GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 3, p. 953–972, 1992.

GUILLETTE, L. J. The Evolution of Viviparity in Lizards. **BioScience**, v. 43, n. 11, p. 742–751, 1993.

HAMDAN, B. et al. A complex biogeographic history of diversification in Neotropical lancehead pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 49, n. 2, p. 145–158, 2020.

HILDEBRANDT, T. B. et al. Aspects of the reproductive biology and breeding management of Asian and African elephants (*Elephas maximus* and *Loxodonta africana*. **Int. Zoo Yb**, v. 40, p. 20–40, 2006.

HO, S. K. et al. Regulation of Vitellogenesis in Reptiles. **Herpetologica**, v. 38, n. 1, p. 40–50, 1982. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3892360>.

IRELAND, J. J. et al. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: Key concepts, studies, advancements, and terms. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1648–1658, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75033-8>.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; LEINZ, F. F.; FARIAS, E. C. Ovarian Cycle Of The snake *Bothrops jararaca*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 5, n. 1, p. 33–36, 1993.

JONES, R. E. et al. The Comparative Anatomy of Lizard Ovaries, with Emphasis on the Number of Germinal Beds. **Journal of Herpetology**, v. 16, n. 3, p. 240–252, 1982.

JONES, S. M. Hormonal Regulation of Ovarian Function in Reptiles. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. (Ed.). **Hormones and Reproduction of Vertebrates - Reptiles**. Academic Press, 2011. 3p. 89–115.

LICHT, P. Reptiles. In: LAMMING, G. E. (Ed.). **Marshall's Physiology of Reproduction**. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingston, 1984. Ip. 206–282.

LIRA-DA-SILVA, R. M. *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 (Serpentes; Viperidae): natural history, venom and envenomation. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 31, p. 56–65, 2009.

MACARTNEY, J. M.; GREGORY, P. T. Reproductive Biology of Female Rattlesnakes (*Crotalus viridis*) in British Columbia. **Copeia**, n. 1, p. 47–57, 1988.

MARTINS, M.; GORDO, M. *Bothrops atrox* (Common Lancehead) Diet. **Herpetological Review**, v. 24, n. 4, p. 151–152, 1993.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers (Genus *Bothrops*). n. 1992, p. 307–328, 2002.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. Natural History of Snakes in Forests of the Manaus Region, Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 6, n. 2, p. 78–150, 1998.

MELGAREJO, A. R. Criação e manejo de serpentes. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. DE (Ed.). **Animais de Laboratório: Criação e Experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 388.

MIRANDA, S. A. et al. Gestational ultrasonography and Dopplerfluxometry in capuchin monkeys (*Sapajus apella*) zoometric. **Theriogenology**, v. 108, n. November, p. 63–73, 2018.

MONTEIRO, W. M. et al. *Bothrops atrox*, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. **Toxicon: X**, v. 6, 2020.

NAULLEAU, G.; FLEURY, F. Changes in plasma progesterone in female *Vipera aspis* L. (Reptilia, Viperidae) during the sexual cycle in pregnant and nonpregnant females. **General and Comparative Endocrinology**, v. 78, n. 3, p. 433–443, 1990.

NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the *corpus luteum*. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.

NORRIS, D. O.; CARR, J. A. **Vertebrate Endocrinology**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2021.

OLIVEIRA, G. B. et al. Post-implantation development of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **Animal Reproduction Science**, v. 182, n. May, p. 35–47, 2017.

OLIVEIRA, M. E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v. 8, n. 2, p. 101–110, 2001.

OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. H.; SIFUENTES, D. N. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C. et al. (Ed.). **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2. ed. São Paulo: Savier, 2009. p. 6–21.

PEIXOTO, G. C. X. et al. Single injection of eCG/hCG leads to successful estrous synchronization in the collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Animal Reproduction Science**, v. 208, n. March, p. 1–9, 2019.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 21–37, 1988.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; MARQUES, O. A. V. Biologia Reprodutiva de Serpentes Brasileiras. **Herpetologia No Brasil II**, n. January, p. 201–221, 2006. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/316190993_Biologia_reprodutiva_de_serpentes_brasileiras>.

POLZONETTI-MAGNI, A. M. et al. Multihormonal Control of Vitellogenesis in Lower Vertebrates. In: JEON, K. W. (Ed.). **International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology**. 239, Supplement C, p. 1–46.

PYRON, R. A.; BURBRINK, F. T.; WIENS, J. J. A phylogeny and revised classification of

Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, 2013.

SAINT-GIRONS, H. Reproductive Cycles of Male Snakes and Their Relationships with Climate and Female Reproductive Cycles. **Herpetologica**, v. 38, n. 1, p. 5–16, 1982.

SAINT GIRONS, H.; BRADSHAW, S. D.; BRADSHAW, F. J. Sexual activity and plasma levels of sex steroids in the Aspic viper *Vipera aspis* L. (Reptilia, Viperidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 91, n. 3, p. 287–297, 1993.

SANT'ANNA, S. S. et al. Reproduction of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae) in captivity. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 64, 2007a.

SANT'ANNA, S. S. et al. Reproductive aspects of *Bothrops leucurus* (Serpentes, Viperidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 64, 2007b.

SCHWARTZ, N. B. Neuroendocrine Regulation of Reproductive Cyclicity. **Neuroendocrinology in Physiology and Medicine**, p. 135–145, 2000.

SHINE, R. Reproduction in Australian Elapid snakes II. Female reproductive cycles. **Australian Journal of Zoology**, v. 25, n. 4, p. 655–666, 1977.

SILVA-JÚNIOR, L. N. et al. Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, n. August, p. 1–16, 2020.

SILVA, A. M. et al. Epidemiological and clinical aspects of snakebites in the Upper Juruá River Region, Western Brazilian Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 50, n. 1, p. 90–99, 2020a.

SILVA, K. M. P. da. **Biologia reprodutiva de serpentes neotropicais dos grupos *Bothrops atrox* e *Bothrops jararacussu* (Viperidae : Crotalinae)**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

SILVA, F. M. et al. Sexual dimorphism and ontogenetic changes of Amazonian pit vipers (*Bothrops atrox*). **Zoologischer Anzeiger**, v. 271, p. 15–24, 1 nov. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcz.2017.11.001>. Acesso em: 7 jun. 2021.

SILVA, K. M. P. et al. Reproductive Biology of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) from the Brazilian Amazon. **Herpetologica**, v. 75, n. 3, p. 198–207, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1655/D-18-00023>.

SILVA, K. M. P. et al. Infundibular sperm storage and uterine muscular twisting in the Amazonian lancehead, *Bothrops atrox*. **Anatomical Record**, v. 303, n. 12, p. 3145–3154, 2020b.

SILVA, K. V. **Distribuição Geográfca de Serpentes Ameaçadas e com Dados Insuficientes do Cerrado em Cenários de Mudança climática: Lacuna Wallaceana e Conservação**. 2020. Instituto Federal De Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/1819>.

SINAN. **Acidente por Animais Peçonhentos**. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>. Acesso em: 5 set. 2021.

SINAN. **Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvdf.def>. Acesso em: 3 jun. 2021.

SPARKMAN, A. M. et al. Use of field-portable ultrasonography reveals differences in developmental phenology and maternal egg provisioning in two sympatric viviparous snakes. **Ecology and Evolution**, v. 8, p. 3330–3340, 2018. Disponível em: <www.ecolevol.org>.

TAYLOR, E. N.; DENARDO, D. F. Reproductive Ecology of Western Diamond-Backed Rattlesnakes (*Crotalus atrox*) in the Sonoran Desert. **Copeia**, v. 1, p. 152–158, 2005.

TAYLOR, E. N.; DENARDO, D. F. Hormones and Reproductive Cycles in Snakes. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. H. (Ed.). **Hormones and Reproduction of Vertebrates - Reptiles**. Academic Press, 2011. 3p. 355–372.

TAYLOR, E. N.; DENARDO, D. F.; JENNINGS, D. H. Seasonal steroid hormone levels and their relation to reproduction in the Western Diamond-backed Rattlesnake, Crotalus atrox (Serpentes: Viperidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 328–337, 2004.

THE REPTILE DATABASE. **Higher Taxa in Extant Reptiles**. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser>. Acesso em: 10 jun. 2021.

TOSINI, G. The pineal complex of reptiles : physiological and behavioral roles. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 9, n. 4, p. 313–333, 1997.

TSAI, T.-S.; TU, M.-C. Reproductive Cycle of Female Chinese Green Tree Vipers, *Trimeresurus stejnegeri stejnegeri*, in Northern Taiwan. **Herpetologica**, v. 57, n. 2, p. 157–168, jun. 2001. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3893180>.

TURCI, L. C. B. et al. Uso do hábitat, atividade e comportamento de *Bothriopsis bilineatus* e de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) na floresta do Rio Moa, Acre, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 197–206, 2009.

VITAL-BRAZIL. **A Defesa Contra o Ophidismo**. São Paulo: Pocai Weiss, 1911.

VITT, L. J. Diversity of Reproductive Strategies Among Brazilian Lizards and Snakes: The Significance of Lineage and Adaptation. **Reproductive Biology of South American Vertebrates**, p. 135–149, 1992.

WALLACE, R. A. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. **Developmental Biology**, v. 1, p. 127–177, 1985.

WEBB, R. et al. Control of follicular growth : Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 63–74, p. 2299–2302, 2004.

WEN, F. H. et al. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2015.

WILLIAMS, D. J. et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 12–14, 2019.

WÜSTER, W. et al. Systematics of the Bothrops atrox species complex: insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. **Venomous Snakes: Ecology, Evolution and Snakebite**, n. January, p. 99–113, 1997.

YAMANOUYE, N. et al. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 151–157, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Dados individuais da fêmea Bax01. *1ª barra*: Identificação, valores biométricos, data de nascimento, procedência dos pais. *Planilha a partir da 2ª barra*: Dados relacionados em colunas com data colheita de dados (separadas por estações do ano), dosagens hormonais de E_2 (estradiol) e P_4 (progesterona), contabilidade de folículos E-I e E-II (não-vitelogênicos), E-III e E-IV (vitelogênicos), ovos e embriões (O/E) observados nas análises ultrassonográficas, datas de cópula e parto, observações de intercorrências. Não houve cópula.

Fêmea: **Bax 01**	crc-ct (cm): 102-117 cm				peso: 864g				nascimento: 28/nov/17		procedência: São Bento - MA
data	*estação*	*dosagens hormonais* **P_4 (ng/mL)**	**E_2 (pg/mL)**	**E-I** <0,5cm	**E-II** >0,6 e <1,0cm	**E-III** >1,1 e <2,0cm	**E-IV** >2,1 e <3,0cm	**O/E**	*cópula*	*parto*	*observações*
1-mar-20	outono	0,41	2,58	12	8	0	0	0	-	-	
13-abr-20		0,54	1,25	16	14	0	0	0	-	-	
18-mai-20		0,36	55,65	26	10	0	0	0	-	-	
16-jun-20	inverno	0,33	24,35	20	16	5	0	0	-	-	
13-ago-20		0,24	1,44	12	2	12	0	0	-	-	Nenhuma cópula confirmada após vários pareamentos
16-set-20	primavera	1,02	1,85	17	0	10	0	0	-	-	
14-out-20		1,4	4,78	20	3	13	0	0	-	-	
15-dez-20	verão	0,57	6,72	12	10	4	0	0	-	-	
6-jan-21		0,87	12,99	31	12	6	0	0	-	-	
24-fev-21		0,48	3,56	48	0	0	0	0	-	-	
26-abr-21	outono	0,15	12,47	33	0	0	0	0	-	-	
29-jun-21	inverno	0,56	122,78	14	15	0	0	0	-	-	
24-ago-21		.	.	15	0	17	0	0	-	-	volume de sangue insuficiente para dosagens
28-set-21	primavera	.	.	10	0	17	1	0	-	-	não houve coleta sanguínea
17-nov-21		1,74	9,95	4	0	1	14	0	-	-	

APÊNDICE B: Dados brutos da fêmea Bax02. *1ª barra*: Identificação, valores biométricos, data de nascimento, procedência dos pais. *Planilha a partir da 2ª barra*: Dados relacionados em colunas com data colheita de dados (separadas por estações do ano), dosagens hormonais de E_2 (estradiol) e P_4 (progesterona), contabilidade de folículos E-I e E-II (não-vitelogênicos), E-III e E-IV (vitelogênicos), ovos e embriões (O/E) observados nas análises ultrassonográficas, datas de cópula, parto, e observações de intercorrências e dados de parto.

Fêmea: **Bax 02**		crc-ct (cm): 107/120 cm			peso: 890g				nasc: 28/nov/17		procedência: São Bento - MA
data	*estação*	*dosagens hormonais* **P_4 (ng/mL)**	**E_2 (pg/mL)**	**E-I** <0,5cm	**E-II** >0,6 e <1,0cm	**E-III** >1,1 e <2,0cm	**E-IV** >2,1 e <3,0cm	**O/E**	*cópula*	*parto*	*observação*
1-mar-20		0,29	4,58	12	0	0	0	0	-	-	
13-abr-20	outono	0,56	66,56	9	9	0	0	0	-	-	
18-mai-20		0,63	9,36	29	9	13	0	0	-	-	
16-jun-20	inverno	0,45	8,11	15	0	15	0	0	24/jun/20	-	
13-ago-20		10,25	192,9	16	1	10	6	0	12/ago/20	-	
16-set-20	primavera	2,01	161,24	3	6	1	0	14	-	-	
14-out-20		8,05	425,28	1	5	14	0	21	-	-	
15-dez-20		13,05	241,12	1	0	6	0	15	-	27/dez/20	pariu 5 filhotes vivos, 1 teratogênico morto e 9 ovos atrésicos
6-jan-21	verão	1,19	189,89	19	7	3	7	0	-	-	
24-fev-21		0,68	6,88	29	2	1	0	0	-	-	
26-abr-21	outono	0,26	10,22	31	0	0	0	0	-	-	
29-jun-21	inverno	0,29	74,59	34	10	0	0	0	-	-	
24-ago-21		0,59	86,46	18	0	21	0	0	-	-	
28-set-21	primavera	.	.	6	0	0	24	0	-	-	não houve coleta sanguínea
1-nov-21		1,9	2,88	19	0	0	0	29	-	27/fev/22	pariu 26 filhotes e 24 ovos atrésicos

APÊNDICE C: Dados brutos da fêmea Bax03. *1ª barra*: Identificação, valores biométricos, data de nascimento, procedência dos pais. *Planilha a partir da 2ª barra*: Dados relacionados em colunas com data colheita de dados (separadas por estações do ano), dosagens hormonais de E_2 (estradiol) e P_4 (progesterona), contabilidade de folículos E-I e E-II (não-vitelogênicos), E-III e E-IV (vitelogênicos), ovos e embriões (O/E) observados nas análises ultrassonográficas, datas de cópula, parto, e observações de intercorrências e dados de parto.

Fêmea: **Bax 03**		crc-ct (cm): 107-123 cm				peso: 780g			nasc: 28/nov/17	procedência: São Bento - MA
data	*estação*	*dosagens hormonais*		**E-I**	**E-II**	**E-III**	**E-IV**	**O/E**	*cópula*	*parto*	*observação*
		P_4 (ng/mL)	**E_2 (pg/mL)**	<0,5cm	>0,6 e <1,0cm	>1,1 e <2,0cm	>2,1 e <3,0cm				
1-mar-20	outono	0,36	6,55	9	8	0	0	0	-	-	
13-abr-20		0,72	12,45	10	0	0	0	0	-	-	
18-mai-20		0,34	22,89	33	20	0	0	0	-	-	
16-jun-20	inverno	0,77	.	20	17	5	0	0	-	-	vol. Sangue insuficiente para dosagem de E_2
13-ago-20		.	.	20	1	12	4	0	-	-	volume de sangue insuficiente para dosagens
16-set-20	primavera	1,54	12,13	19	0	18	1	0	-	-	sem cópulas confirmadas após pareamentos
14-out-20		1,7	11,61	5	16	11	0	0	-	-	
15-dez-20	verão	0,33	2,14	29	15	0	0	0	-	-	
6-jan-21		0,77	4,89	43	0	0	0	0	-	-	
24-fev-21		0,55	2,55	62	0	0	0	0	-	-	
26-abr-21	outono	1,14	19,6	40	0	0	0	0	02/mai/21	-	
29-jun-21	inverno	0,89	1142,3	4	4	17	1	0	-	-	
24-ago-21		1,76	12,64	10	0	0	0	25	-	-	
28-set-21	primavera	.	.	0	0	0	0	25	-	-	não houve coleta sanguínea
1-nov-21		30,82	186,99	0	0	0	0	22	-	02/jan/22	pariu 14 filhotes vivos, 2 natimortos e 1 ovo atrésico

APÊNDICE D: Dados brutos da fêmea Bax04. *1ª barra*: Identificação, valores biométricos, data de nascimento, procedência dos pais. *Planilha a partir da 2ª barra*: Dados relacionados em colunas com data colheita de dados (separadas por estações do ano), dosagens hormonais de E_2 (estradiol) e P_4 (progesterona), contabilidade de folículos E-I e E-II (não-vitelogênicos), E-III e E-IV (vitelogênicos), ovos e embriões (O/E) observados nas análises ultrassonográficas, datas de cópula, parto, e observações de intercorrências e dados de parto.

Fêmea: **Bax 04**	crc-ct (cm): 99,5-112 cm			peso: 813g					nasc: 28/nov/17		procedência: São Bento - MA
data	*estação*	*dosagens hormonais* **P_4 (ng/mL)**	**E_2 (pg/mL)**	**E-I** <0,5cm	**E-II** >0,6 e <1,0cm	**E-III** >1,1 e <2,0cm	**E-IV** >2,1 e <3,0cm	**O/E**	*cópula*	*parto*	*observação*
1-mar-20	outono	0,63	3,22	10	0	0	0	0	-	-	
13-abr-20		0,55	1,22	10	12	0	0	0	-	-	
18-mai-20		0,29	12,45	32	6	0	0	0	-	-	
16-jun-20	inverno	0,49	204,27	22	14	6	0	0	-	-	
13-ago-20		1,42	23,06	6	0	13	3	0	-	-	sem cópulas confirmadas após pareamentos
16-set-20	primavera	0,63	1,25	6	1	0	11	0	-	-	
14-out-20		0,51	5,69	6	1	1	10	0	-	-	
15-dez-20	verão	1,56	2,22	10	4	10	0	0	-	-	
6-jan-21		2,2	10,45	43	1	7	2	0	-	-	
24-fev-21		0,81	5,18	16	17	3	0	0	-	-	
26-abr-21	outono	1,78	35,01	3	0	14	2	0	02/mai/21	-	
29-jun-21	inverno	2,04	299,89	4	0	4	9	0	-	-	
24-ago-21		11,86	105,99	0	0	0	0	17	-	-	
28-set-21	primavera	.	.	0	0	0	0	19	-	-	não houve coleta sanguínea
1-nov-21		2,92	8,96	19	10	0	0	14	-	11/nov/21	pariu 7 ovos atrésicos, 3 filhotes vivos, 3 teratogênicos mortos, 1 teratogênico vivo

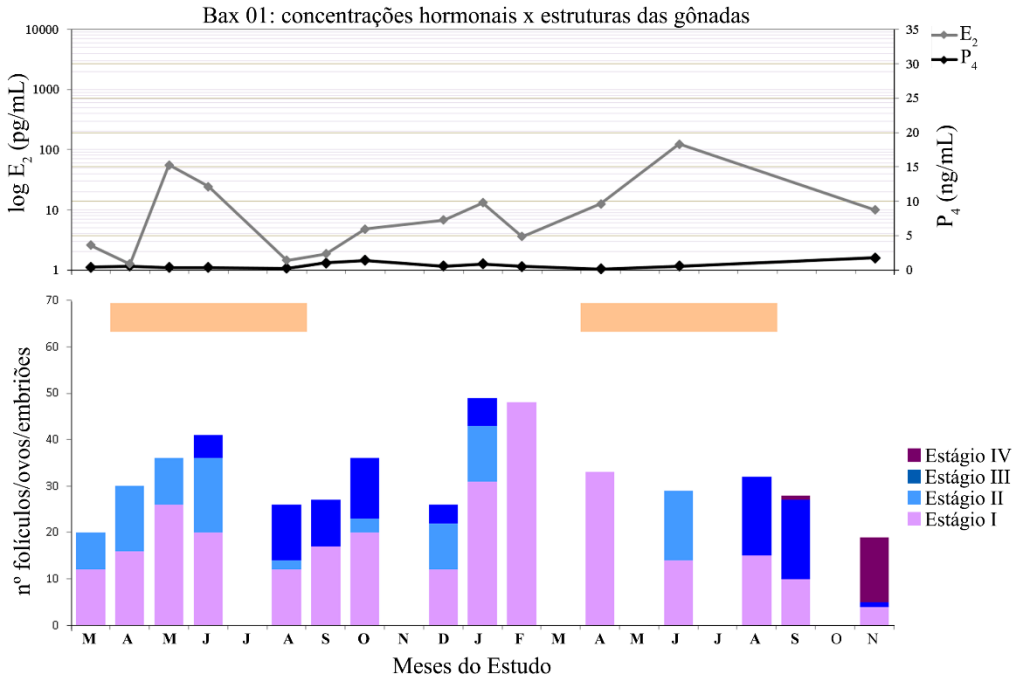
APÊNDICE E: Dados brutos da fêmea Bax05. 1ª barra: Identificação, valores biométricos, data de nascimento, procedência dos pais. Planilha a partir da 2ª barra: Dados relacionados em colunas com data colheita de dados (separadas por estações do ano), dosagens hormonais de E_2 (estradiol) e P_4 (progesterona), contabilidade de folículos E-I e E-II (não-vitelogênicos), E-III e E-IV (vitelogênicos), ovos e embriões (O/E) observados nas análises ultrassonográficas, datas de cópula, parto, e observações de intercorrências e dados de parto.

Fêmea: **Bax 05**		crc-ct (cm): 105-120 cm				peso: 860g			nasc: 28/nov/17		procedência: São Bento - MA
data	*estação*	*dosagens hormonais*		**E-I**	**E-II**	**E-III**	**E-IV**	**O/E**	*cópula*	*parto*	*observação*
		P_4 (ng/mL)	**E_2 (pg/mL)**	<0,5cm	>0,6 e <1,0cm	>1,1 e <2,0cm	>2,1 e <3,0cm				
1-mar-20		0,1	6,71	9	9	0	0	0	-	-	
13-abr-20	outono	0,82	31,62	7	9	0	0	0	-	-	
18-mai-20		0,72	312,14	14	13	6	0	0	-	-	
16-jun-20	inverno	2,07	12,13	12	5	8	1	0	15/jun/20	-	
13-ago-20		0,64	2,45	1	1	0	17	0	-	-	
16-set-20	primavera	11,12	4,66	0	0	0	0	18	-	-	
14-out-20		15,45	100,25	0	0	0	0	25	-	-	
15-dez-20		6,01	6,72	0	0	0	0	11	-	30/dez/20	8 filhotes vivos e 9 ovos atrésicos
6-jan-21	verão	0,37	12,47	44	0	0	0	0	-	-	
24-fev-21		0,32	4,99	42	0	0	0	0	-	-	
26-abr-21	outono	0,32	.	27	0	0	0	0	-	-	vol. Sangue insuficiente para dosagem de E2
29-jun-21	inverno	0,84	44,96	13	17	0	0	0	18/jul/21	-	
24-ago-21		0,44	312,14	6	0	20	0	0	-	-	
28-set-21		.	.	5	0	18	5	0	-	-	não houve coleta sanguínea
31-out-21	primavera	3,85	2,55	0	0	0	0	23	-	-	
17-nov-21		15,69	95,88	0	0	0	0	19	-	23/fev/22	pariu 7 filhotes vivos e 14 ovos atrésicos

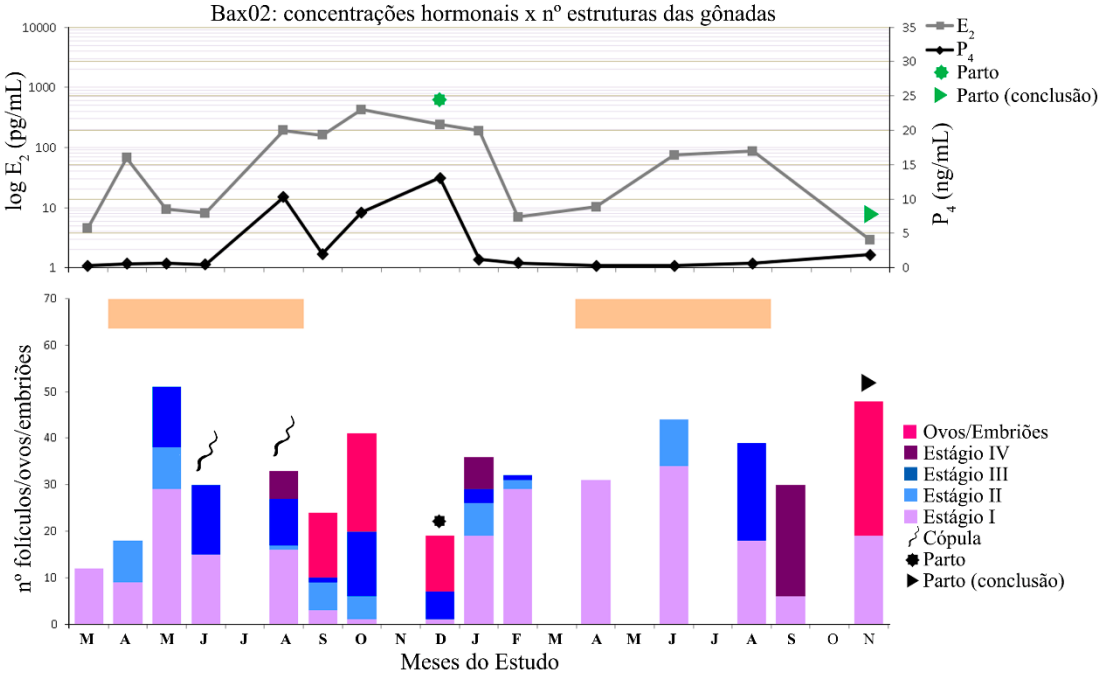
APÊNDICE F: Dados brutos da fêmea Bax06. *1ª barra*: Identificação, valores biométricos, data de nascimento, procedência dos pais. *Planilha a partir da 2ª barra*: Dados relacionados em colunas com data colheita de dados (separadas por estações do ano), dosagens hormonais de E_2 (estradiol) e P_4 (progesterona), contabilidade de folículos E-I e E-II (não-vitelogênicos), E-III e E-IV (vitelogênicos), ovos e embriões (O/E) observados nas análises ultrassonográficas, datas de cópula, parto, e observações de intercorrências e dados de parto.

Fêmea: **Bax 06**	crc-ct (cm): 120-135 cm			peso: 943g					nasc: 28/nov/17		procedência: São Bento - MA
data	*estação*	*dosagens hormonais* **P_4 (ng/mL)**	**E_2 (pg/mL)**	**E-I** <0,5cm	**E-II** >0,6 e <1,0cm	**E-III** >1,1 e <2,0cm	**E-IV** >2,1 e <3,0cm	**O/E**	*cópula*	*parto*	*observação*
1-mar-20		0,34	5,95	10	0	0	0	0	-	-	
13-abr-20	outono	0,81	13,88	10	11	0	0	0	-	-	
18-mai-20		1,1	1222,4	21	15	13	0	0	-	-	
16-jun-20	inverno	0,52	16	15	1	16	0	0	-	-	
13-ago-20		0,62	19,22	7	1	16	1	0	-	-	sem cópulas confirmadas após pareamentos
16-set-20	primavera	1,25	8,79	13	1	9	1	0	-	-	
14-out-20		0,45	12,44	31	2	18	0	0	-	-	
15-dez-20		8,05	400,28	42	20	0	0	0	-	-	
6-jan-21	verão	0,5	2,22	43	0	0	0	0	-	-	
24-fev-21		0,2	7,89	57	0	0	0	0	-	-	
26-abr-21	outono	0,42	10,78	53	0	0	0	0	02/mai/21	-	
29-jun-21	inverno	0,44	275,23	10	11	13	0	0	-	-	
24-ago-21		0,5	235,78	9	0	26	6	0	-	-	
31-out-21	primavera	.	.	9	0	0	0	24	-	-	não houve coleta sanguínea
17-nov-21		15,57	88,23	0	0	0	0	26	-	13/fev/22	pariu 1 natimorto e 27 ovos atrésicos

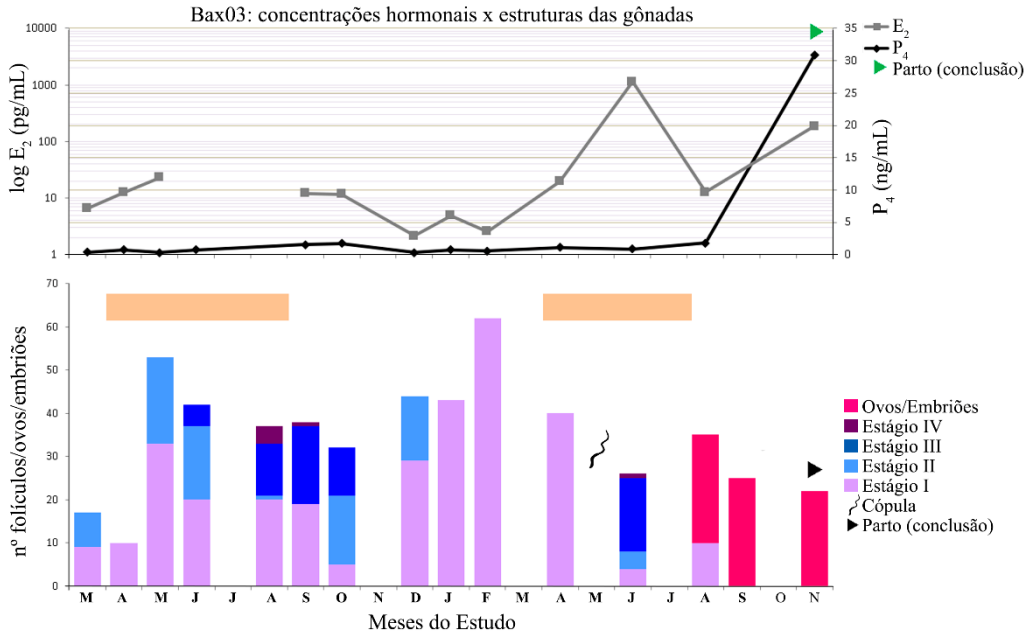
APÊNDICE G: Relação entre hormônios e folículos em Bax01 nos meses de estudo: Gráfico de oscilações hormonais (linhas - superior) alinhado ao gráfico de contabilidade de folículos (barras empilhadas), relacionando as concentrações de estradiol e progesterona com a contabilidade de folículos não-vitelogênicos (estágios I e II), vitelogênicos (estágios III e IV). As faixas ( ) indicam períodos de pareamento



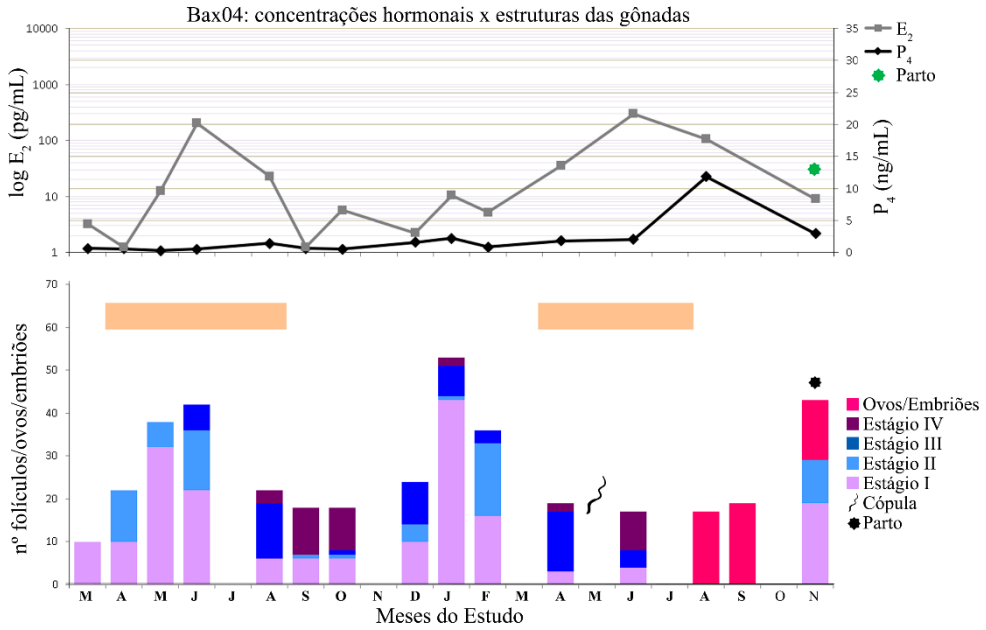
APÊNDICE H: Relação entre hormônios e folículos em Bax02 nos meses de estudo: Gráfico de oscilações hormonais (linhas - superior) alinhado ao gráfico de contabilidade de folículos, ovos/embriões (barras empilhadas), relacionando as concentrações de estradiol e progesterona com a contabilidade de folículos não-vitelogênicos (estágios I e II), vitelogênicos (estágios III e IV), ovos e embriões (gestação). As faixas ( ) indicam períodos de pareamento; (✸) indica parto; (▶) indica parto após conclusão do estudo; (ᔕ) indica cópula.



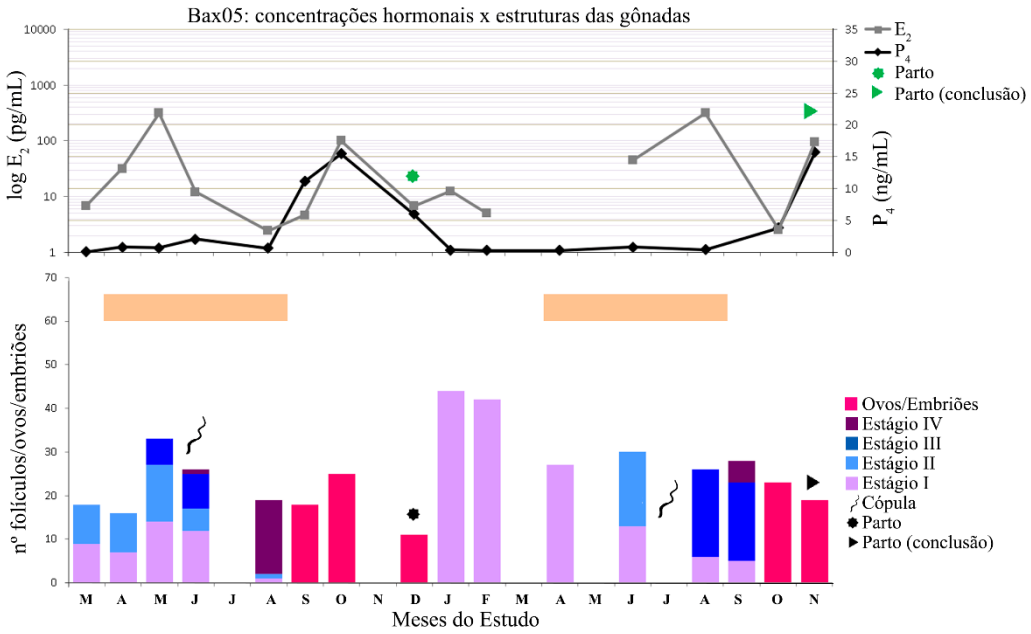
APÊNDICE I: Relação entre hormônios e folículos em Bax03 nos meses de estudo: Gráfico de oscilações hormonais (linhas - superior) alinhado ao gráfico de contabilidade de folículos, ovos/embriões (barras empilhadas), relacionando as concentrações de estradiol e progesterona com a contabilidade de folículos não-vitelogênicos (estágios I e II), vitelogênicos (estágios III e IV), ovos e embriões (gestação). As faixas ( ) indicam períodos de pareamento; (▶) indica parto após conclusão do estudo; (ʃ) indica cópula.



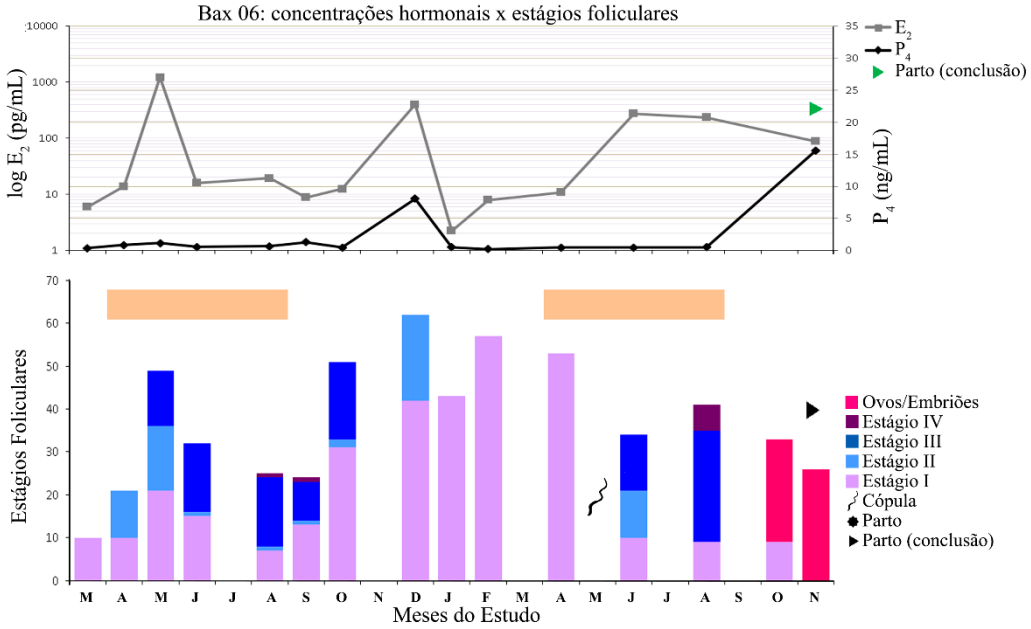
APÊNDICE J: Relação entre hormônios e folículos em Bax04 nos meses de estudo: Gráfico de oscilações hormonais (linhas - superior) alinhado ao gráfico de contabilidade de folículos, ovos e embriões (barras empilhadas), relacionando as concentrações de estradiol e progesterona com a contabilidade de folículos não-vitelogênicos (estágios I e II), vitelogênicos (estágios III e IV), ovos e embriões (gestação). As faixas ( ) indicam períodos de pareamento; (✸) indica parto; (ʃ) indica cópula.



APÊNDICE K: Relação entre hormônios e folículos em Bax05 nos meses de estudo: Gráfico de oscilações hormonais (linhas - superior) alinhado ao gráfico de contabilidade de folículos, ovos/embriões (barras empilhadas), relacionando as concentrações de estradiol e progesterona com a contabilidade de folículos não-vitelogênicos (estágios I e II), vitelogênicos (estágios III e IV), ovos e embriões (gestação). As faixas ( ) indicam períodos de pareamento; (✹) indica parto; (▶) indica parto após conclusão do estudo; (⌇) indica cópula.



APÊNDICE L: Relação entre hormônios e folículos em Bax06 nos meses de estudo: Gráfico de oscilações hormonais (linhas - superior) alinhado ao gráfico de contabilidade de folículos, ovos/embriões (barras empilhadas), relacionando as concentrações de estradiol e progesterona com a contabilidade de folículos não-vitelogênicos (estágios I e II), vitelogênicos (estágios III e IV), ovos e embriões (gestação). As faixas ( ) indicam períodos de pareamento; (▶) indica parto após conclusão do estudo; (⌇) indica cópula.



ANEXOS

ANEXO 1: Tabela com os parâmetros de qualidade dos ensaios hormonais, fornecidos pela Provet Veterinária Diagnóstica.

HORMÔNIO: ESTRADIOL (Immunotech)

Ensaio	CPM total	Cap Lig. B/B0	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose pg/mL)	CV Intra Baixo	CV Intra Alto
1	35796	47%	0,09%	95 (1,79)	0,83%	4,90%

HORMÔNIO:PROGESTERONA - (Immunotech)

Ensaio	CPM total	Cap Lig. B/B0	L.N.E (%)	Sensibilidade % (dose ng/mL)	CV Intra Baixo	CV Intra Alto
1	33454	52%	0,30%	92 (0,02)	3,14%	2,88%

Legenda:

CPM: contagens por minutos

Cap. Lig: capacidade de ligação

L.N.E.: Ligação não específica

CV Intra: coeficiente de variação intra-ensaio