

DIEGO ELIAS PIMENTA MOTA

**Avaliação seminal de *Bothrops jararaca* provenientes da natureza do
estado de São Paulo**

São Paulo

2020

DIEGO ELIAS PIMENTA MOTA

Avaliação seminal de *Bothrops jararaca* provenientes da natureza do estado de São Paulo

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Selma Maria Almeida-Santos

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3917
FMVZ

Mota, Diego Elias Pimenta
Avaliação seminal de *Bothrops jararaca* provenientes da natureza do estado de São Paulo / Diego Elias Pimenta Mota. – 2020.
51 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Maria Almeida-Santos.

1. Avaliação seminal. 2. Espermatozoide. 3. Morfologia. 4. *Bothrops jararaca*. I. Título.



Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Selma Maria De Almeida Santos
Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "Avaliação seminal de Bothrops jararaca provenientes da natureza do estado de São Paulo".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 005912)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 18/fevereiro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "A mudança do título é necessária para condizer com o que foi realmente realizado na dissertação".

Comentário da CEUA: "".

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-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MOTA, Diego Elias Pimenta.

Título: **Avaliação seminal de *Bothrops jararaca* provenientes da natureza do estado de São Paulo**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha família, Wilson, Liliana, David e Isabela que são meu porto seguro, sempre acreditando no meu potencial, e dedico principalmente à Maiara, minha companheira nessa jornada, nunca saiu do meu lado, tanto nos bons e maus momentos. Te amo demais! Obrigado pela confiança e amor incondicional a mim sempre dedicados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, cujos ensinamentos formaram a pessoa que sou hoje, sempre presaram pelo amor, educação e honestidade, sempre me apoiando em qualquer decisão de minha vida.

A Maiara pelo seu amor incondicional, que é recíproco, com ela ao meu lado essa jornada tornou-se mais fácil de seguir, com todo o carinho sempre encontrou as palavras certas para cada momento, sendo eles bons ou ruins.

A minha orientadora Dra. Selma Maria Almeida-Santos (Selmãe), uma pessoa e profissional espetacular, é um exemplo a ser seguido como ser humano, agradeço por todas as palavras de carinho, conhecimento, apoio, por sua preocupação, nunca desistir de mim e acreditar no meu potencial.

A Kalena, que me apresentou esse campo de conhecimento e foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto, por sua paciência e disposição de me ensinar, além da confiança que foi depositada em mim desde o começo do aprendizado. Muito obrigado pela disponibilidade, dedicação e sugestões!

Aos meus grandes amigos, Fabiano, Valquíria, Marlison, Bruno, Ligia, Andressa. Esses foram os braços que muitas vezes me faltavam durante as colheitas, além das conversas e reflexões que deixavam os experimentos mais tranquilos e divertidos.

A Karina Maria e a Rafaela Coeti que me ajudaram com os dados estatísticos, pois sempre se disponibilizaram a ajudar e, claro, com paciência e dedicação.

Aos meus companheiros do GERES, Eletra, Miguel, Erick, Serena, Rebeca, Poliana e Viviane, são pessoas extraordinárias, que sempre estão dispostas em ajudar um ao outros.

Ao Laboratório Especial de Ecologia e Evolução (LEEV), incluindo pesquisadores, funcionários e alunos que, juntos, proporcionam um suporte que colabora para que o laboratório funcione da melhor maneira possível, certamente contribuindo para o bom andamento deste experimento. Principalmente ao Adriano, que sempre teve disposição de

cuidar de todos os animais do Biotério do LEEV, incluindo os animais que utilizei para meu projeto de pesquisa.

Ao Programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ – USP por me dar a oportunidade de realizar um objetivo que tinha para minha vida. A todos os professores, funcionários e alunos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento pessoal, intelectual e profissional.

À CNPq pela bolsa a mim concedida — o presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) —, financiamento 168050/2018-8), e por tantas outras que foram disponibilizadas para outros estudantes, contribuindo para o desenvolvimento intelectual do país.

A todas as pessoas que torceram por mim, amigos e familiares da minha cidade natal, e que, embora não tenham sido citados, não foram de maneira alguma esquecidos! Muito obrigado!

*“A grandeza da vida não
consiste em não cair
nunca, mas em nos
levantarmos cada vez que
caímos”.*

Nelson Mandela

RESUMO

MOTA, D. E. P. **Avaliação seminal de *Bothrops jararaca* provenientes da natureza do estado de São Paulo**. 2020. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O sucesso reprodutivo em animais de cativeiro por meio da eficiência de biotecnologias aplicadas é essencial nos programas de conservação. Assim, a coleta e a avaliação do sêmen são os principais passos para qualquer programa de reprodução assistida, pois permite a seleção dos melhores machos reprodutores, bem como a preservação do material genético. A *Bothrops jararaca* é uma serpente peçonhenta e seu veneno é utilizado para a produção de soro e investigações farmacológicas no Instituto Butantan. Assim, estudos que visam ao conhecimento das etapas da reprodução em cativeiro são essenciais para sua manutenção *ex situ*. Dessa forma, foram avaliados os parâmetros seminais do ciclo espermático de *B. jararaca*. O procedimento foi realizado em trinta (n=30) machos de *Bothrops jararaca* pertencentes ao biotério do Laboratório Especial de Ecologia e Evolução, no Instituto Butantan. A avaliação do sêmen e a coleta de dados biométricos foram realizadas trimestralmente para estabelecer parâmetros sazonais. Os animais foram avaliados ao longo de todas as estações do ano, no período de 2017 a 2019. Os machos amostrados apresentaram a média no comprimento rostro-cloacal (CRC) $77,65 \pm 1,14$ (cm) e $123,09 \pm 20,04$ (g) de massa. O sêmen de *B. jararaca* apresenta coloração esbranquiçada, consistência espessa. O volume médio obtido foi de $3,08 \pm 1,12$ (μ L), com médias de 57% para motilidade, 3,34 para vigor espermático e $1,01 \times 10^9$ spz/mL para concentração. Morfologicamente, o espermatozoide segue o padrão filiforme descrito em outros répteis escamados, com cabeça alongada e levemente curvada, além de apresentar patologias descritas para outras espécies. Os resultados indicaram que não houve relação significativa entre o CRC e a massa e os parâmetros seminais. Quanto a avaliação sazonal dos parâmetros seminais, o vigor espermático ($p=0,03$) e a concentração ($p=0,01$) tiveram uma variação significativa entre as estações climáticas e esses resultados são relevantes para a aplicação de biotecnologias para a reprodução e inseminação artificial, que podem ser replicados em outras espécies de serpentes.

Palavras-chave: avaliação seminal, espermatozoide, morfologia, *Bothrops jararaca*.

ABSTRACT

MOTA, D. E. P. 2020. **Seminal evaluation of *Bothrops jararaca* from the state of São Paulo**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Reproductive success in captive animals through the efficiency of applied biotechnologies is essential in conservation programs. Thus, semen collection and evaluation are the main steps for any assisted reproduction program, as it allows the selection of the best breeding males, as well as the preservation of genetic material. *Bothrops jararaca* is a venomous snake and its venom is used for the production of serum and pharmacological investigations at the Butantan Institute. Thus, studies aimed at understanding the stages of reproduction in captivity are essential for their ex situ maintenance. Thus, the seminal parameters of the *B. jararaca* sperm cycle were evaluated. The procedure was performed on thirty ($n = 30$) males of *Bothrops jararaca* belonging to the vivarium of the Special Laboratory of Ecology and Evolution, at the Butantan Institute. Semen evaluation and biometric data collection were performed quarterly to establish seasonal parameters in the period from 2017 to 2019. The males sampled showed the mean cloacal rostrum length (CRC) 77.65 ± 1.14 (cm) and $123.09 \pm 20,04$ (g) of dough. The semen of *B. jararaca* has a whitish color, thick consistency. The average volume obtained was 3.08 ± 1.12 (μL), with averages of 57% for motility, 3.34 for sperm vigor and 1.01×10^9 spz / mL for concentration, respectively. Morphologically, the sperm follows the filiform pattern described in other scaled reptiles, with an elongated and slightly curved head, in addition to presenting some pathologies described for other species. The results indicated that there was no significant variation between the CRC and the mass in relation to the seminal parameters, vivarium, but in the analysis of variance, applied to correlate the seminal parameters of *Bothrops jararaca* with its seasonality, the sperm vigor ($p=0,01$) and the concentration ($p=0,03$) had a significant variation during the climatic seasons and these results are relevant for the application of biotechnologies for reproduction and insemination artificial, which can be replicated in other species of snakes.

Keywords: seminal evaluation, spermatozoa, morphology, *Bothrops jararaca*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Bothrops jararaca</i>	25
Figura 2 - Biotério do Laboratório Especial de Ecologia e Evolução.....	26
Figura 3 - Procedimento de colheita de sêmen de <i>B. jararaca</i>	27
Figura 4 - Espermatozoide em microscopia de contraste de fase e as três estruturas representadas a cabeça, peça intermediária e cauda	32
Figura 5 - Algumas patologias encontradas no espermatozoide de <i>B. jararaca</i>	34
Figura 6 - Relação entre os parâmetros seminais e o CRC das amostras válidas dos animais estudados	35
Figura 7 - Relação entre os parâmetros seminais e a massa das amostras válidas dos animais estudados.....	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão (Média±DP) e valores mínimos e máximos encontrados nos parâmetros estudados para machos de *Bothrops jararaca* 31
- Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão (Média+DP) das alterações da morfologia espermática encontradas no sêmen de machos adultos de *Bothrops jararaca* 33
- Tabela 3. Valores de P, na análise de regressão linear em relação do CRC e Massa com os parâmetros seminais, durante as estações 37
- Tabela 4. Valores médios e desvio padrão (Média+DP) dos parâmetros seminais estudados em machos adultos de *Bothrops jararaca* mantidos em cativeiro, de acordo com as estações climáticas.....37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Prevalência das alterações morfológicas encontradas nas amostras seminais de <i>Bothrops jararaca</i>	33
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 ANIMAIS.....	25
3.2 BIOMETRIA DOS ANIMAIS.....	26
3.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	28
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4. RESULTADOS	31
4.1 ASPECTOS GERAIS DO SÊMEN.....	31
4.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	31
4.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN EM RELAÇÃO À BIOMETRIA DOS ANIMAIS.....	35
4.4 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE DOS PARÂMETROS SEMINAIS.....	37
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O sucesso reprodutivo em animais de cativeiro por meio da eficiência de biotecnologias aplicadas é essencial nos programas de conservação. Assim, a coleta e a avaliação do sêmen são os principais passos para qualquer programa de reprodução assistida, pois permite a seleção dos melhores machos reprodutores, bem como a preservação do material genético.

Durante muito tempo a avaliação seminal de serpentes foi realizada através da remoção e compressão dos ductos deferentes após a eutanásia do animal, como descrito no trabalho de Langlada et al (1994) para *Crotalus durissus terrificus*. Mengden et al (1980) descreveram pela primeira vez uma metodologia que possibilitou este tipo de avaliação sem o sacrifício obrigatório do animal. A técnica consistia na contenção física do animal e na realização de delicadas massagens na região ventral do terço final do animal, exposição da papila genital e colheita do sêmen diretamente da cloaca com o auxílio de uma seringa. Quinn (1989) descreveu a colheita de sêmen através da eletroejaculação seguida de massagens na região ventral dos animais. No entanto, em ambas as metodologias a contaminação do sêmen por fezes e urato era recorrente.

Zacariotti et al (2007) realizaram a colheita de sêmen em *Crotalus durissus* modificando a técnica descrita por Mengden et al (1980), utilizando, além das massagens digitais ventrais, um anestésico local. Foi utilizada lidocaína 1%, na dose de 15mg/kg, aplicada em quatro diferentes pontos na região pericloacal, o que favoreceu o relaxamento da cloaca e exposição da papila urogenital, possibilitando assim um maior controle sobre o procedimento e reduzindo a chance de contaminação da amostra por fezes e urina.

Tourmente et al (2011) fizeram uma abordagem cirúrgica nos animais para realizar a colheita de sêmen em *Boa constrictor*, uma vez que, devido à sua forte musculatura, não era possível obter amostras de sêmen por massagem ventral. Desta forma, os animais receberam anestesia geral e em seguida foi feita uma incisão 10 cm acima da cloaca. O sêmen foi então extraído após uma secção caudal em um dos ductos deferentes.

No grupo *Bothrops*, Silva et al (2015) realizou a avaliação seminal em *Bothrops insularis* estabelecendo vários parâmetros de influência sazonal, no ciclo reprodutivo e

determinou a maturidade sexual desses animais. Um padrão de ciclo reprodutivo diferente foi observado em *B. insularis* (serpente insular, parente próximo de *B. jararaca*). Nessa espécie, a espermatogênese acontece no outono, tem uma diminuição da sua atividade no inverno e continua a produção na primavera. (Kasperoviczus, 2009). Dessa forma, é necessário o estudo do ciclo espermático de *Bothrops jararaca* para a compreensão do estado dos espermatozoides ao longo das estações. Essas importantes informações influenciam no sucesso das técnicas reprodutivas e no desenvolvimento de um banco genético.

Revisão da literatura – *Bothrops jararaca*.

O gênero *Bothrops* constitui um clado bastante diversificado, com origem e radiação recente na região Neotropical. Possui atualmente 46 espécies de serpentes desse gênero que são distribuídas principalmente na América do Sul (WUSTER et al., 2002; CAMPBELL & LAMAR, 2004, HAMDAN ET AL, 2019). Sendo um gênero que predomina espécies de serpentes peçonhentas, é um grupo que desperta o imaginário popular devido ao grande índice de acidentes ofídicos por serpentes, no Brasil o gênero *Bothrops* corresponde a uma parcela de 72,5% desses acontecimentos (BERNARDE, 2012). Além disso, o interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fármacos através das toxinas presentes no veneno desses animais, que podem abranger vários campos de pesquisas de desenvolvimento, como no combate de tumores, distúrbios cardiovasculares, entre outras (Pesquisa FAPESP, 2000).

Bothrops jararaca (Wied, 1824 Viperidae) é uma espécie delgada e de tamanho moderado, com uma média de 1200 mm de comprimento total (CAMPBELL & LAMAR 2004). Os indivíduos apresentam colorido variável e manchas escuras em forma triangular em ambos os lados e ao longo de todo corpo (GOMES & PUORTO, 1993), conferindo a esta a espécie um padrão críptico de coloração (SAZIMA, 1988; 1992). *B. jararaca* possui hábito noturno e atividade durante a maior parte do ano. Sua dieta é bastante diversificada, sendo que os adultos se alimentam principalmente de roedores, e os filhotes de anfíbios anuros (SAZIMA, 1992).

As fêmeas são maiores e mais robustas que os machos e possuem também maior tamanho relativo de cabeça (JANEIRO-CINQUINI et al., 1992, SAZIMA, 1992). Esta espécie está distribuída verticalmente desde o nível do mar até elevações próximas de 1.200 m, sendo encontrada em uma grande variedade de habitats (SAZIMA, 1992; CAMPBELL & LAMAR 2004), como florestados, Mata Atlântica, florestas tropicais decíduas, campos cultivados e até áreas abertas com elevada ação e presença antrópica (PUORTO et al., 1991). Essa plasticidade no uso de habitats aliada à sua coloração críptica faz com que a espécie esteja associada a 90% dos acidentes ofídicos registrados em todo país (CAMPBELL & LAMAR 2004).

O ciclo reprodutivo de serpentes, de maneira geral, pode ser caracterizado de acordo o crescimento folicular e atividade testicular. Segundo Almeida-Santos e Orsi (2002), a fêmea de *B. jararaca* tem um ciclo reprodutivo sazonal, apresentando uma fase ativa de crescimento folicular, acasalamento e gestação em um ano e uma fase de parturição seguida de quiescência folicular em outro, o que caracteriza seu ciclo como bienal. A vitelogênese ativa (com altos níveis de estradiol) se inicia em março, no final do verão, e finaliza-se em setembro, na primavera. As cópulas ocorrem entre o final do verão e começo do outono, coincidindo com fase vitelogênica das fêmeas (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Segundo Janeiro-Cinquini (1993b), a espermatogênese nos machos de *B. jararaca* tem início no verão, quando a massa e o comprimento testicular atingem seu valor máximo. Embora a presença de espermatozoides nos ductos deferentes durante todo o ano sugira uma maior flexibilidade quanto ao período de cópula, é no outono e inverno que a densidade espermática está mais elevada. O tamanho mínimo de maturidade sexual do macho de *B. jararaca* foi de aproximadamente 540 mm (JANEIRO-CINQUINI, 1993b).

O sistema reprodutor das fêmeas de serpentes é constituído por dois ovários e dois ovidutos, que se abrem na cloaca, unindo-se parcialmente nas adjacências da vagina bilobada. (GOMES & PUORTO, 1993). Os ovários dispõem-se de maneira assimétrica na cavidade celomática, estando o ovário direito localizado mais cranial que o ovário esquerdo. Estes órgãos estão fixos na parede dorsal do corpo pelo mesovário. Os ovidutos dividem-se em infundíbulo, útero (anterior e posterior) e vagina. (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Segundo Almeida-Santos (2005), os ovários de *B. jararaca* apresentam uma média de 21 folículos quiescentes, de coloração translúcida ou esbranquiçada e diâmetro inferior a 10 mm, durante a primavera e início do verão, quando estão em vitelogênese primária. E a partir do final do verão até o final do outono, os folículos apresentam crescimento rápido, tornando-se mais amarelados devido ao acréscimo de vitelo, com seu tamanho variando de 10 a 30 mm.

Os machos de *B. jararaca* apresentam dois testículos alongados que se comunicam com a cloaca através dos ductos deferentes, tubos enovelados que terminam em papilas genitais. Os testículos são revestidos por uma cápsula fina e translúcida chamada túnica albugínea. Os machos também apresentam uma assimetria em relação ao posicionamento do aparelho reprodutor, sendo o testículo direito mais cranial que o esquerdo (ALMEIDA-SANTOS, 2005).

Os órgãos copulatórios são dois hemipênis que, quando em repouso, encontram-se invaginados em sacos localizados na base da cauda. Quando em atividade, estes sacos abrem-se lateralmente na borda da abertura cloacal. Os hemipênis são estruturas tubulares e bifurcadas, apresentando sulco espermático também bifurcado, através do qual o sêmen é conduzido, após sua saída da papila genital, até o interior do trato reprodutivo da fêmea. As vias espermáticas da espécie são constituídas pelos ductos eferentes dos testículos, ductos do epidídimo e ductos deferentes. Estes últimos são opacos e convolutos em machos adultos e em seu interior encontram-se líquidos seminais e espermatozoides. (ALMEIDA-SANTOS, 2005)

Com o aprimoramento no estudo de avaliação seminal, abrimos um amplo campo de possibilidades para análises e técnicas para entender todo o ciclo reprodutivo do macho, envolvendo o espermatozoide. O estudo da morfologia estrutural do espermatozoide pode definir características e estratégias reprodutivas que permitem o sucesso reprodutivo. Estudos mostram que espécies as quais apresentam espermatozoides estocados no oviduto ou nos ductos deferentes podem apresentar um maior desenvolvimento das membranas multilaminares na peça intermediária destes (TOURMENT ET AL, 2006).

É notável e crescente o interesse mundial na criação de répteis em cativeiro, seja com fins conservacionistas ou para realização de pesquisas, o que tem possibilitado o

desenvolvimento de inúmeros estudos nas mais diversas áreas, como comportamento, fisiologia, ecologia e toxicologia. Portanto, faz-se necessário um amplo conhecimento acerca de diversos aspectos da biologia destes animais, principalmente quanto ao seu desempenho reprodutivo em cativeiro. A compreensão da morfologia e de cada fase do ciclo espermatogênico é profundamente importante para o desenvolvimento de biotecnologias que podem influenciar no sucesso reprodutivo, assim estabelecendo parâmetros que contribuirão para a preservação dessas espécies.

A realização de uma criteriosa avaliação reprodutiva é fundamental em um programa de reprodução natural ou assistida em cativeiro. A avaliação do espermograma permite determinar o potencial reprodutivo dos machos, fornecendo assim informações para uma adequada seleção de reprodutores, além de gerar informações sobre parâmetros seminais normais para a espécie e fornecer subsídios para futuros estudos e avanços na área de biotecnologias empregadas na reprodução de répteis em cativeiro.

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Descrever os parâmetros seminais (volume, motilidade, vigor e concentração) da serpente *Bothrops jararaca*.
- Verificar se os parâmetros seminais da *B. jararaca* variam de acordo com as estações climáticas ao longo do ano.
- Avaliar a morfologia e estabelecer patologias presentes no espermatozoide de *B. jararaca*;
- Verificar se existe relação entre comprimento e massa e a qualidade seminal dos animais;

Materiais e métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram avaliados 30 exemplares machos adultos (CRC > 540 mm, Janeiro-Cinquini, 1993b) de *Bothrops jararaca* (Figura1), pertencentes ao biotério do Laboratório Especial de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan (CEUA – FMVZ: 7349240118).

Os animais foram mantidos em cativeiro no biotério do LEEV, sendo individualizadas em caixas plásticas transparentes (56,4 x 38,5 x 37,1cm) com tampa e laterais perfuradas e forradas com papelão corrugado, em sala onde é possível a manutenção das condições naturais do fotoperíodo (latitude 23°S) e umidade. A temperatura é mantida em torno dos 25° utilizando-se aquecedor, quando necessário. A dieta dos animais é composta de camundongos (*Mus musculus*) provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan e são oferecidos em intervalos regulares de 30 dias, respeitando-se a proporção de 10 a 20% do peso do indivíduo. É fornecida água fresca *ad libitum* (Figura 2).

Figura.1. *Bothrops jararaca*



Fonte: Valquiria de Oliveira (2017)

Figura 2. Biotério do Laboratório Especial de Ecologia e Evolução.



Fonte: Fabiano Andrade (2018).

3.2 BIOMETRIA DOS ANIMAIS

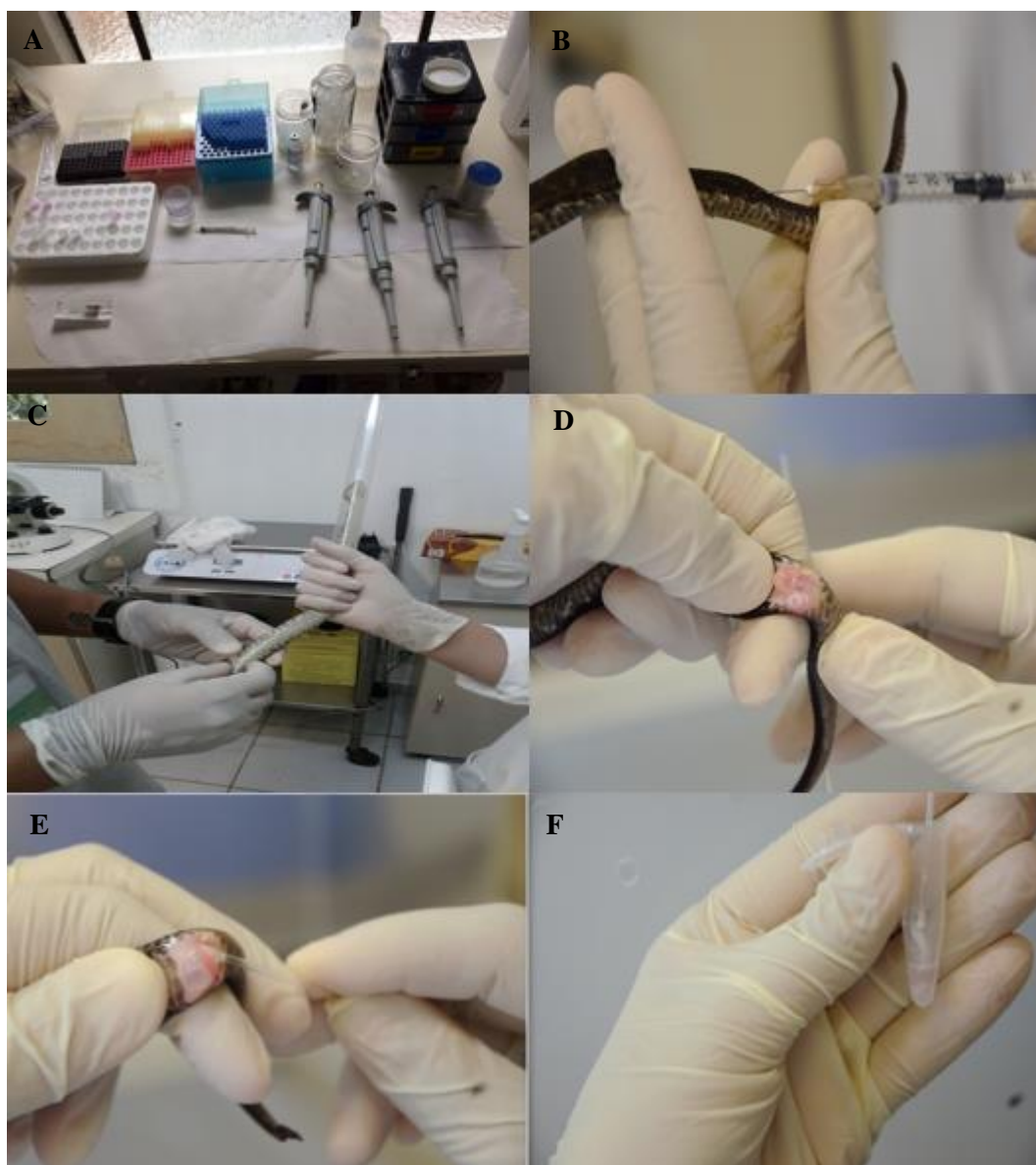
Antecedendo a colheita de sêmen, todos os animais têm os dados biométricos coletados trimestralmente, composta por biometria (especificamente a tomada do comprimento rostro-cloacal - CRC) e pesagem.

3.3 COLHEITA DE SÊMEN

A colheita de material foi realizada trimestralmente no biotério do LEEV (Instituto Butantan), as datas correspondem, aproximadamente, ao meio de cada estação climática. O período de coleta foi de 2017 a 2019. O sêmen foi colhido segundo a metodologia proposta por Silva et al (2015). Os animais foram contidos fisicamente em tubos plásticos específicos para serpentes e após a assepsia da região da cloaca com soro fisiológico, cada animal recebeu anestesia local pericloacal com Lidocaína 1%, 15 mg/kg via subcutânea em quatro pontos distintos, visando ao relaxamento e à exposição da papila urogenital.

Após esse procedimento e a espera de 10 minutos para o efeito da anestesia, foi realizada uma massagem na região ventral do terço final do animal para que o sêmen fosse expelido. O material foi coletado diretamente da papila urogenital com o uso de capilares micro hematócritos e posteriormente diluído em meio de cultura de células (HAM – F10, Nutricell) para as devidas análises.

Figura 3. Procedimento de colheita de sêmen de *B. jararaca*.



Fonte: Diego Mota (2020)

Legenda: A – Preparação da bancada, B – Anestesia do animal, C – Massagem ventral, D - Exposição da papila genital, E – Colheita do sêmen e F – Diluição no meio HAM F-10.

3.4 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi avaliado no Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan quanto às seguintes características:

- Volume: foi estimado através da medição do capilar microematócrito a altura em *mm* da amostra e aplicar na fórmula: $1\text{mm} = 1,05 \mu\text{L}$.

- Coloração: foi avaliada momento da colheita diretamente no capilar de vidro microematócrito.

- Motilidade e Vigor: devido à sua elevada concentração, o sêmen foi previamente diluído na proporção de 1:100 em meio de cultura de células (HAM – F10, Nutricell) e foi avaliado em microscópio de luz sob o aumento de 100x. A motilidade foi observada levando-se em consideração qualquer tipo de movimento, numa escala de 0 a 100% de espermatozoides móveis. O vigor foi classificado em uma escala de 0 a 5, em que:

- 0 – Ausência de motilidade;
- 1 – Movimentos laterais leves sem progressão;
- 2 – Movimentos laterais moderados com progressão eventual;
- 3 – Movimento progressivo frequente, porém lento;
- 4 – Movimento progressivo constante com velocidade moderada;
- 5 – Movimento progressivo rápido.

- Concentração espermática: o sêmen foi diluído na proporção de 1:150 em solução de formol salino para a determinação de sua concentração. A contagem foi realizada em câmara hemantimétrica de *Neubauer "improved"* com o uso de microscópio de luz, sob o aumento de 400x.

A avaliação da morfologia espermática foi realizada posteriormente nos laboratórios de Coleções Zoológicas (LECZ) e no Laboratório de Biologia Celular, ambos do Instituto Butantan. Foram preparadas lâminas com sêmen previamente diluído e depois observadas através da microscopia por contrastes de fase ou microscopia confocal com aumento de

1000x. Foi realizada a contagem de 200 células para estimativa de espermatozoides normais/ defeituosos. Nesse processo de análise, já foram verificadas as patologias presentes nas amostras seminais. Para a avaliação da morfometria dos espermatozoides foi utilizado o programa Image J (SCHNEIDER ET AL, 2012).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando-se o programa Statsoft Statistica (v7.0.61.0 EN) e InStat (Versão 3.01,32 bit for Win 95/NT).

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

Para testar a influência do comprimento ou da massa do animal sobre cada um dos parâmetros seminais avaliados foram realizadas análises de regressão linear. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% portanto para $p < 0,05$ considerou-se que havia diferenças estatísticas entre as variáveis.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 ASPECTOS GERAIS DO SÊMEN

O sêmen de *Bothrops jararaca* apresentou coloração variando de branca a levemente amarelada e consistência leitosa e espessa. Os animais foram avaliados durante o período de 2017 a 2019, totalizando 30 serpentes analisadas. O CRC e a massa média desses animais foi de $77,65 \pm 1,14$ cm e $123,09 \pm 20,04$ g, respectivamente. Apenas dois animais não apresentaram amostras válidas de sêmen ao longo do experimento. Na tabela a seguir (Tabela 1), estão apresentados os dados biométricos dos animais avaliados, bem como as médias gerais dos parâmetros seminais.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP) e valores mínimos e máximos encontrados nos parâmetros estudados para machos de *Bothrops jararaca*.

	Média\pmDP	Mínimo e máximo
CRC (cm)	$77,65 \pm 1,14$	57 - 92,5
Massa (g)	$123,09 \pm 20,04$	48 – 235
Volume (μL)	$3,08 \pm 1,12$	1,05 - 13,65
Motilidade (%)	$57,11 \pm 7,29$	10 – 90
Vigor	$3,34 \pm 0,49$	0 – 5
Concentração ($\times 10^9$sptz/mL)	$1,01 \pm 0,32$	0,44 – 2,29

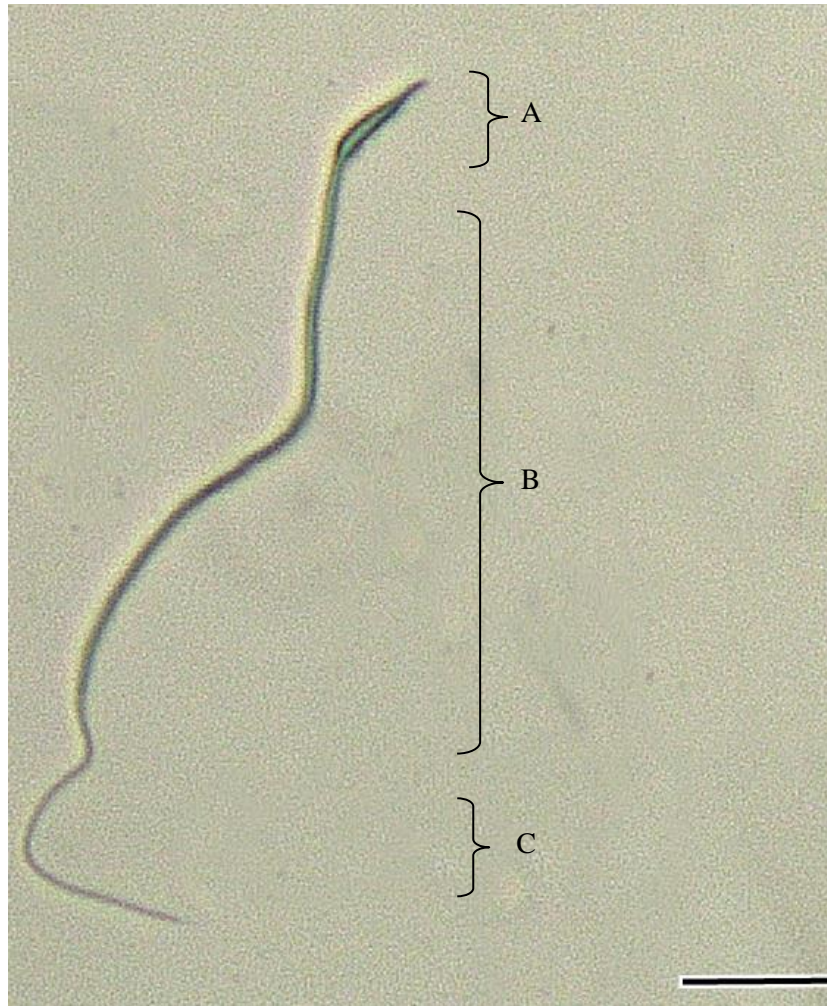
Fonte: Diego Mota (2020)

4.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

As análises morfológicas do sêmen foram realizadas com amostras viáveis dos 30 animais, coletadas entre 2018 e 2019 (Tabela 2). O espermatozoide dessa espécie tem o tamanho médio de $96,71 \pm 2,77$ μ m (Figura 4), é filiforme, sendo dividido em três estruturas: a cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça tem um tamanho médio de $13,93 \pm 0,96$ μ m de comprimento possui formato cabeça ser alongado e em formato de foice ena sua extremidade pontiaguda está localizado o acrossoma. A peça intermediária com $52,11 \pm$

1,91 μm é a região que possui o maior comprimento em comparação com a cabeça e com a cauda ($26,67 \pm 2,34 \mu\text{m}$), a região mais fina da célula.

Figura 4. Espermatozoide em microscopia de contraste de fase.



Fonte: Diego Mota (2020)

Legenda: As três estruturas representadas, a cabeça (A), peça intermediária (B) e cauda (C).
Barra = 10 μm .

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão (Média+DP) das alterações da morfologia espermática encontradas no sêmen de machos adultos(N=30) de *Bothrops jararaca*.

Animais	Defeitos Cabeça (%)	Defeitos Peça intermediária (%)	Defeitos Cauda (%)	Total de células defeituosas (%)	Total de células normais (%)
N=30	3,82 ±3,14	36,3±18,93	8,06 ±5,16	48,22 ±18,28	51,78± 18,28

Fonte: Diego Mota (2020)

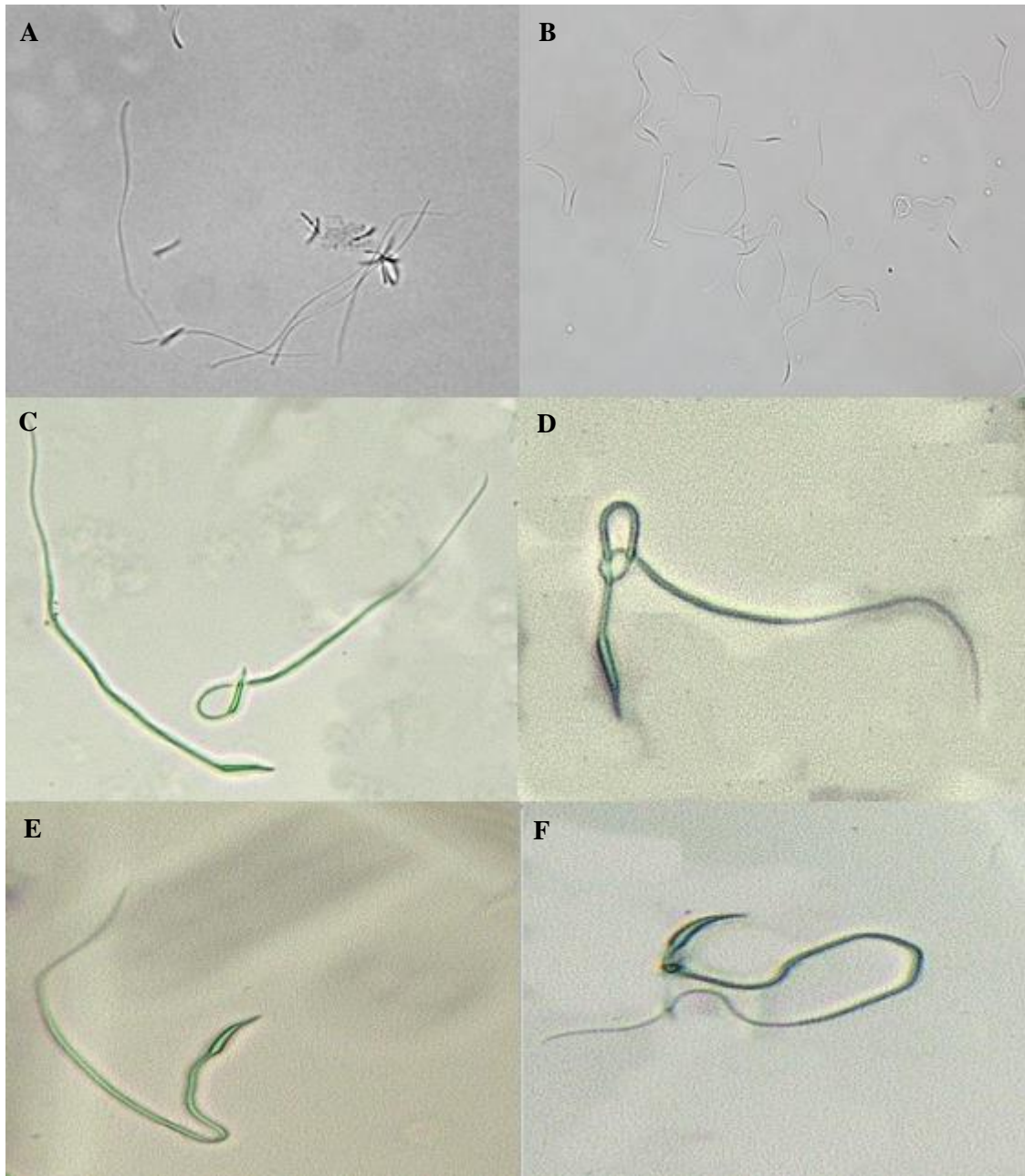
Em relação às patologias presentes nos espermatozoides, a região mais afetada é a peça intermediária, sendo a cauda e a cabeça com a menor porcentagem de alterações. Foram identificadas diversas modificações, mas as mais observadas nessa análise foram enrolamento da peça intermediária e cauda, essas alterações estavam presentes nas amostras viáveis dos 30 animais estudados (Quadro 1).

Quadro 1. Prevalência das alterações morfológicas encontradas em sêmen de *Bothrops jararaca*.

Alterações	Patologias	(%)
Cabeça		
	Macrocefalia	25,52
	Acrossoma dobrado	10,13
	Gota proximal	33,47
	Cabeça solta anormal	36,43
Peça Intermediária		
	Fortemente enrolada	98,06
	Fortemente dobrada	64,01
	Dobrada	17,04
	Enrolada	37,82
	Enrolada na cabeça	21,73
Cauda		
	Fortemente enrolada	97,33
	Enrolada	53,16
	Dobrada	31,23
	Fortemente dobrada	14,29

Fonte: Diego Mota (2020).

Figura 5. Algumas patologias encontradas no espermatozoide de *B. jararaca*.



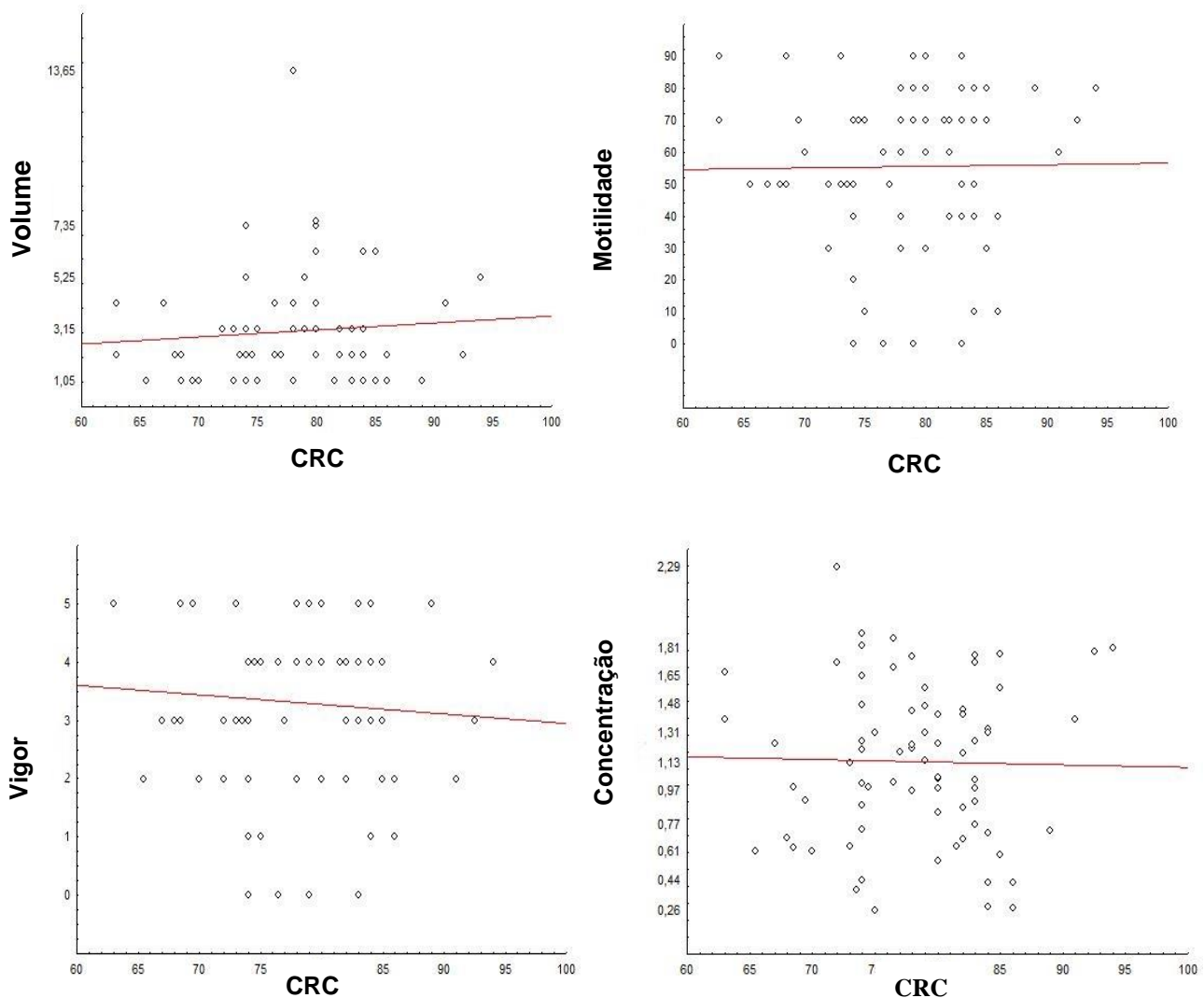
Fonte: Diego Mota (2020)

Legenda: A – Espermatozoides sem cabeça, B – Espermatozoides normais, C – Peça intermediária enrolada na cabeça, D - Peça intermediária fortemente enrolada, E – Fortemente dobrada, F – Pseudogota.

4.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN EM RELAÇÃO À BIOMETRIA DOS ANIMAIS

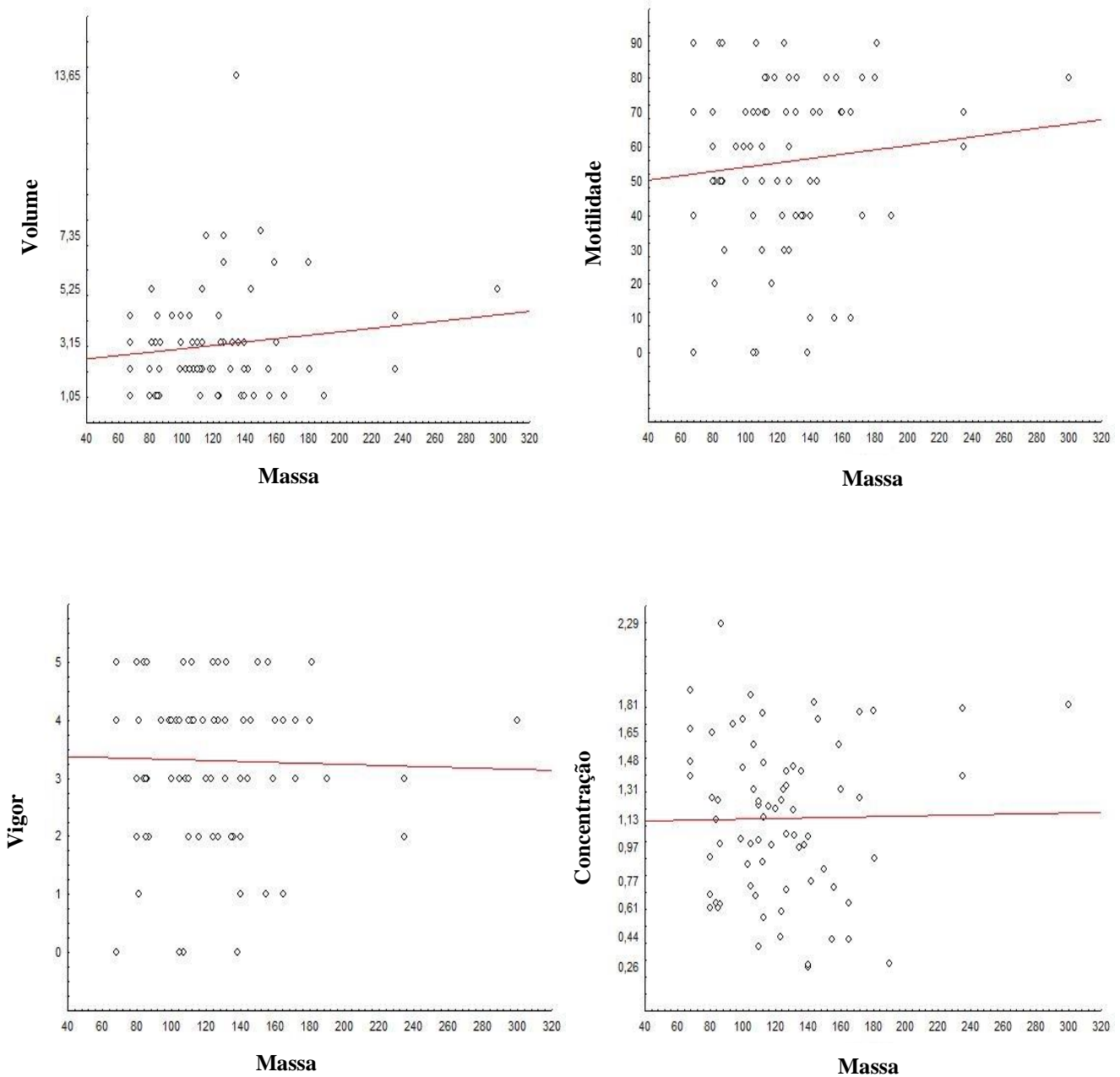
As avaliações realizadas de regressão linear agrupando todas as amostras de *B. jararacas* coletas ao longo do experimento expuseram que não há relação entre o comprimento rostro-cloacal (CRC) (Figura 5). Em relação à massa dos animais e os parâmetros seminais, também não houve correlação significativa entre os ensaios estatísticos (Figura 6).

Figura 6. - Relação entre os parâmetros seminais e o CRC de todas amostras válidas dos animais estudados.



Fonte: Diego Mota (2020)

Figura 7 - Relação entre os parâmetros seminais e a massa de todas as amostras válidas dos animais estudados.



Fonte: Diego Mota (2020)

Posteriormente, foram analisados a regressão linear de CRC e a massa em relação aos parâmetros seminais, durante cada estação do ano. De acordo com a análise aplicada houve correlação na estação climática do verão com o parâmetro seminal de concentração (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de P, na análise de regressão linear em relação do CRC e Massa com os parâmetros seminais. Correlação ocorre quando $p < 0,05^*$.

	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Volume	0,45 - 0,43	0,76 - 0,90	0,23 - 0,54	0,36 - 0,50
Motilidade	0,43 - 0,28	0,74 - 0,39	0,70 - 0,60	0,43 - 0,58
Vigor	0,93 - 0,76	0,95 - 0,52	0,28 - 0,21	0,92 - 0,46
Concentração	0,08 - 0,05*	0,34 - 0,78	0,33 - 0,54	0,64 - 0,64

Fonte: Diego Mota (2020)

4.4 AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE DOS PARÂMETROS SEMINAIS

Durante as estações climáticas as características físicas dos animais tiveram pouca variação, provavelmente devido ao plantel ser de cativeiro, à biometria e alimentação deles ser regulares, quanto aos parâmetros seminais, houve uma variação considerável entre a sazonalidade dessa espécie (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão (Média+DP) dos parâmetros seminais estudados em machos adultos de *Bothrops jararaca* mantidos em cativeiro, de acordo com as estações climáticas.

	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Volume	2,97 ± 2,95	3,63 ± 1,78	2,72 ± 1,79	3,09 ± 1,54
Motilidade	50 ± 22,03	63,63 ± 24,19	63,18 ± 19,39	51,66 ± 24,31
Vigor*	2,77 ± 1,26	3,45 ± 1,21	3,95 ± 0,89	3,22 ± 1,39
Concentração*	0,86 ± 0,49	1,35 ± 0,45	1,21 ± 0,41	0,65 ± 0,40

Fonte: Diego Mota (2020)

Legenda: Asteriscos (*), representa os parâmetros que houve correlação na sazonalidade dos animais.

Na análise de variância, aplicada para correlacionar os parâmetros seminais de *Bothrops jararaca* com sua sazonalidade, o vigor espermático ($p=0,03$) e a concentração ($p=0,01$) tiveram uma variação significativa durante as estações climáticas. Os outros

parâmetros seminais, volume e motilidade, não obtiveram o valor que é considerável para a correlação.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A serpente *Bothrops jararaca* proporciona uma grande oportunidade de se investigar as estratégias reprodutivas por causa da sua ampla distribuição no Brasil, que vai desde o sul da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul, incluindo diversas ilhas continentais (HOGE & ROMANO-HOGE, 1981; CAMPBELL & LAMAR, 2004).

Os machos de *B. jararaca* apresentam ciclos reprodutivos sazonais. O ciclo espermatogênico tem início na primavera e a fase ativa de produção de espermatozoides acontece no verão. No outono e inverno, os testículos estão inativos sem produção de espermatozoides. O segmento sexual renal (SSR) tem a sua fase de hipertrofia acompanhando o ciclo espermatogênico, ou seja, o rim encontra-se hipertrofiado na primavera e no verão, época de produção de espermatozoides nos testículos (Kasperoviczus, 2013). Os espermatozoides nos ductos deferentes foram observados durante todas as estações do ano, no entanto, percebe-se uma maior concentração de espermatozoides no verão e outono, estação onde ocorrem as cópulas, e uma menor concentração de espermatozoides no inverno e primavera (Almeida Santos e Orsi, 2002; Kasperoviczus, 2013). Dessa forma, o conhecimento dos principais aspectos do ciclo reprodutivo de *B. jararaca* pode ajudar a entender como se processa a produção dos espermatozoides, e a sua sazonalidade, além de contribuir como um modelo biológico, para diversos tipos de pesquisas.

A importância dos modelos animais para pesquisa científica é significativo e primordial, e acompanham os experimentos científicos ao longo da história. A utilização de um modelo animal se torna aplicável no intuito de estudar princípios fisiológicos, desenvolver e aperfeiçoar tratamentos e métodos de diagnósticos (MIZIARA ET AL, 2012). Os animais mais utilizados nessa metodologia são os roedores, logo após vem os cães, suínos e os primatas não humanos (FAGUNDES & TAHA, 2004, MENDES & SOUZA, 2017).

Os modelos animais são aplicados em pesquisas que em sua maioria são para o desenvolvimento de fármacos ou produtos que tem como consumidor e beneficiário o ser humano. Esse método, foi desenvolvido através dos tempos para tergiversar obstáculos de

ordem ética e de operacionalização na pesquisa que afeta os seres humanos, dessa forma a padronização dos procedimentos e a organização dos conhecimentos pode proporcionar um avanço nos experimentos (FAGUNDES & TAHA, 2004, MENDES & SOUZA, 2017).

Na reprodução de serpentes, esses modelos animais para fins experimentais não estão bem estabelecidos, mas o uso de uma espécie mais comum como *Bothrops jararaca* como modelo poderia elucidar etapas fisiológicas do ciclo reprodutivo de outras serpentes, como *Bothrops insularis*, uma vez que provavelmente *B. jararaca* é um ancestral comum dessas serpentes ilhoas que estão criticamente ameaçadas de extinção (IUCN - International Union for Conservation of Nature, 2019)

O trabalho realizado com *B. insularis* por Silva et al (2015) e esse projeto desenvolvido com *B. jararaca* demonstrou uma semelhança nos resultados dos parâmetros seminais dessas duas espécies. Além de serem animais análogos morfológica e geneticamente (GRAZZIOTTIN et al., 2006, KASPEROVICZUS, 2009).

A avaliação seminal realizada nesse estudo evidenciou o quanto essa metodologia é eficiente no processo para se estabelecer um espermograma. Sendo este procedimento vital para o sucesso reprodutivo de um programa de conservação. Os dados obtidos através dos experimentos realizados elucidam detalhes sobre a sazonalidade do ciclo reprodutivo dos machos, principalmente na questão da qualidade do esperma ao longo das estações e como isso pode ser efetivo no período de cópulas (Silva, 2015).

O sêmen de *Bothrops jararaca* segue as características do gênero que pertence, apresentou coloração diversificando de branca à levemente amarelada, além de consistência leitosa e espessa, como visto em outras *Bothrops* (SILVA, 2015, TOURMENTE et al 2008). O volume médio de sêmen obtido para *B. jararaca* foi de 3,08µl, entretanto esse dado pode variar em relação a espécie e ao tipo de metodologia aplicada para a colheita do sêmen, também o propósito da análise do sêmen influencia a quantidade necessária do volume (ZACARIOTTI & GUIMARÃES, 2010). Segundo Silva et al. (2015) o volume obtido foi de 3,05 µl para *B. insularis*, seguindo a mesma metodologia nesse estudo ocorreu essa semelhança entre elas.

A motilidade é analisada levando-se em consideração qualquer tipo de movimento no sêmen, a média geral desse trabalho foram de 57%, esse resultado é próximo aos

encontrados por Zacariotti (2004) e Silva et al. (2015) para outras serpentes peçonhentas pertencentes a família Viperidea. Para *Boa constrictor occidentalis*, uma espécie não peçonhenta da família Boidae (família conhecida pelas jiboias), Tourmente et al. (2007) encontrou 63% de motilidade na amostra, já Fahrig et al. (2007) descreve 92,5% de motilidade para o sêmen de corn snake, resultado que demonstra o sucesso reprodutivo dessa espécie. O vigor espermático de *B. jararaca* foi de 3,34, acompanhando a média amostrada para motilidade, resultado que se assemelha novamente com a *B. insularis* (SILVA et al, 2015).

A concentração média encontrada nesse estudo ($1,01 \times 10^9$ spz/mL) também é semelhante a encontrada nos estudos realizados por Zacariotti (2007) para a cascavel *Crotalus durissus terrificus* ($1,39 \times 10^9$ spz/mL) e Silva et al (2015) para *B. insularis* ($1,36 \times 10^9$ spz/mL). Esses resultados são próximos provavelmente por influência da metodologia utilizada na colheita do sêmen que é a mesma seguida por Zacariotti (2004), entretanto se compararmos a técnica de eletro ejaculação utilizada por Tourmente et al. (2007) em *Boa constrictor occidentalis* (1×10^6 spz/mL) e Langlada, Laporta-Ferrera e Santos (1991) que utilizaram o método de remoção e compressão dos ductos deferentes *post mortem*, em cascavel ($0,004 \times 10^9$ spz/mL) há uma diferença significativa, não se descartando outros fatores que podem induzir essa diferença, como o meio diluído, a contaminação das amostra e até mesmo o erro técnico ao aplicar os métodos de colheita.

A morfologia do espermatozoide de serpente é basicamente composta de forma filiforme e é dividida em três estruturas, a primeira é a cabeça alongada (em forma de foice) e com o acrossoma em forma de cone, a segunda estrutura é a peça intermediária, sendo extremamente longa e, em conjunto com a cauda (terceira estrutura), são responsáveis pela locomoção do espermatozoide (ZACARIOTTI, 2008, TOURMENTE ET AL, 2007, TOURMENTE, GIOJALAS E CHIARAVIGLIO, 2008). Os espermatozoides de *Bothrops jararaca* seguem essa morfologia estrutural das serpentes.

Os estudos relacionados a morfologia espermática são importantes para mostrar as patologias encontradas nas amostras seminais, mas essas análises são mais desenvolvidas em animais domésticos, animais de grande porte e seres humanos (MASCARENHA, 2012, FRENEAU, 2011, CORRÊA, 2001). Em serpentes os estudos estão sendo desenvolvidos, mas ainda não é um número significativo, por isso a relevância de

aplicar essas análises em serpentes. Em *B. jararaca* a avaliação da morfologia espermática apresentou uma média de 51,78% de células normais e 48,22% de células defeituosas, sendo que a peça intermediária é a estrutura com a maior taxa de patologias encontradas com 36,61%. Esse resultado é semelhante com a morfologia espermática apresentada por Silva et al. (2015), para *B. insularis*, que obteve 54,23% de células normais e 45,76% de células defeituosas e com a peça intermediária também com a maior concentração de patologias.

Essa alta taxa de patologias pode ser relacionada a vários fatores que podem modificar as estruturas dos espermatozoides como as preparações seminais rotineiras ou nos momentos de preparo das amostras laboratoriais, o efeito brusco do frio, , degeneração do acrossoma, distúrbios na formação no período da espermiogênese pela passagem do sêmen pelo epidídimo ou ainda pela exposição a secreções epidimais anormais, entre outros fatores (SWANSON; BOYD, 1962, MIES FILHO, 1987, BARTH; OKO, 1989). No entanto, com a quantidade baixa de trabalhos que investiga essas patologias nos espermatozoides em serpentes, não se pode afirmar que a fertilidade do sêmen é prejudicada.

As análises de regressão linear podem corroborar um padrão no comportamento reprodutivo de algumas espécies, dependendo das variáveis analisadas. Essa demonstração é evidente em *Bothrops insularis* (SILVA, 2015) e *Crotalus ruber ruber* (ZACARIOTTI, 2008).

As análises estatísticas de regressão linear deste trabalho demonstraram que o comprimento rostro-cloacal (CRC) não tem influência nas amostras seminais em relação aos parâmetros seminais, ressaltando que essas avaliações foram feitas em animais adultos. A aplicação desse teste comparando a relação da massa com os parâmetros seminais avaliados, também não apresentou correlação, isso pode ser justificado pelo fato de os animais do plantel de cativeiro terem uma alimentação regular e com a temperatura controlada através de aquecedores, caracterizando um ambiente de bem-estar para o animal *ex situ*, que provavelmente influencia o ciclo espermático e a qualidade do sêmen (ALMEIDA-SANTOS, 2005, KASPEROVICZUS, 2013).

Em uma análise pontual, a concentração apresentou correlação significativa com a massa do animal no período do verão, essa relação pode ser associada ao período de espermatogênese de *B. jararaca* (ALMEIDA-SANTOS, 2005). Esse fato pode contribuir para a utilização de biotecnologias voltadas para a inseminação artificial nesse período.

A avaliação seminal de *B. jararaca* indicou que embora o volume e a motilidade não variaram significativamente durante o período dos experimentos, o vigor espermático e a concentração tiveram uma variação significativa durante as estações climáticas, o que significa que o investimento do animal ao longo das estações esteja mais relacionado em aumentar a produção de espermatozoides e seu vigor em época reprodutiva.

Segundo Almeida-Santos, (2005), a espermatogênese ocorre durante todo verão e chegando ao final dessa estação começa o período de cópula que segue pelo outono, nesse momento as variações das médias apresentaram uma diferença significativa. No volume, a melhor média foi no outono com $3,63 \pm 1,78$, isso ocorre devido ao ciclo reprodutivo desse animal, essa relação é aplicada nos outros parâmetros também, sendo que essa estação obteve as melhores médias.

A concentração espermática variou significativamente entre as estações tendo a primavera a menor média ($0,65 \times 10^9$ spz/mL). Esse dado está relacionado com o período de quiescência testicular do processo de espermatogênese, que afeta desfavoravelmente na quantidade de espermatozoides de *B. jararaca* (ALMEIDA-SANTOS, 2005, KASPEROVICZUS, 2013). Nesse parâmetro, a correlação mais expressiva foi no período do verão e outono, essa correlação pode estar relacionada com o momento de cópula, sendo relevante para a quantidade de espermatozoides para na execução da cópula.

A semelhança dos resultados entre as avaliações dos parâmetros seminais e de morfologia espermática entre *B. jararaca* e *B. insularis* pode contribuir para o desenvolvimento de um protocolo que estabeleça *B. jararaca* como espécie modelo animal, para experimentos que envolvam a *B. insularis*, dessa forma contribuindo para conservação dessa espécie que é criticamente ameaçada de extinção, além de elucidar singularidades encontradas na morfofisiologia reprodutiva de ambas as espécies, essa comparação fortalece a compreensão do ciclo espermático desses animais.

Conclusão

6.CONCLUSÃO

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

- Não há relação entre o CRC, massa e cada um dos parâmetros seminais avaliados (volume, motilidade, vigor e concentração). Este resultado indica que animais mantidos em um plantel de um biotério não afeta essa relação.
- O volume e o motilidade do sêmen de *B. jararaca* não variam ao longo das estações;
- A vigor e a concentração do sêmen da *B jararaca* variam sazonalmente entre as estações;
- A morfologia espermática de *B. jararaca* é semelhante a *B. insularis*;
- De maneira geral, foi no outono em que o sêmen de *B. jaracaca* apresentou a melhor qualidade nos parâmetros avaliados (volume, motilidade, concentração e vigor), coincidindo com a estação de cópula da espécie.

Referências

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-SANTOS, S. M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae)**. 2005. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ALMEIDA-SANTOS, S.M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v. 26, p. 109-112, 2002.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ed Ames, Iowa State University, press, 1989. 285 pv.

BERNARDES, P. S. **Anfíbios e répteis: introdução ao estudo de herpetofauna brasileira**. 1ª edição. Curitiba: Anolisbooks, 2012. 320p, 12 cap.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Cornell University Press, 2004. 728p.

CORRÊA, M.V. **Novas tecnologias reprodutivas - limites da biologia ou biologia sem limites?** Rio de Janeiro: Editora UERJ; 2001.

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

FAGUNDES, D.J.; TAHA M.O. Modelo animal de doença: Critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 1(19), 59-65, 2004.

Fármacos a partir do veneno de serpentes. **Pesquisa FAPESP**. 2000. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2000/09/01/farmacos-a-partir-do-veneno-de-serpentes/> . Acesso em: 13 de janeiro de 2020.

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

FRENEAU, G. E. 2011. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 35: 160-170, 2011.

GOMES, N.; PUORTO, G. Atlas Anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v.55 n. 1, p. 69-100, 1993.

GRAZZIOTIN, F. G.; MONZEL, M.; ECHEVERRIGARAY, S.; BONATTO, S. L. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past

fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 396982, 2006.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. Ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.

HAMDAN, B., GUEDES, T. B., CARRASCO, P. A., MELVILLE, J. A complex biogeographic history of diversification in Neotropical lancehead pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**.00:1–14. 2019.

IUCN. **2019 IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/>> Acesso em: 09 dez. 2019.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F., FARIAS, E.C.; FIGUEREDO, V. C. F. Sexual dimorphism in adult *Bothrops jararaca*. **Bulletin of the Chicago Herpetological Society**, v. 27, p. 94-95, 1992.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F., LEINZ, F. F.; FARIAS, E.C. Ovarian cycle of the snake *Bothrops jararaca*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, p. 33-36, 1993a.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F., LEINZ, F. F.; FARIAS, E.C. Seasonal variation in weight and length of the testicles and the quantity of abdominal fat of the snake *Bothrops jararaca*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, p. 15-19, 1993b.

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

KASPEROVICZUS, K. N. **Evolução das estratégias reprodutivas de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 134 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

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

MASCARENHA, R. M. **Renovação do diluidor na qualidade do sêmen canino resfriado**. 54p. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2012.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais**. 6. ed. Porto Alegre: Sulina, 1987.

MIZIARA, I. D, MAGALHÃES, A. T. M., D'APAR, M. Research ethics in animal models. **Braz J Otorhinolaryngol**. 2012;78(2):128-31. 2012.

MENGDEN, A. G.; PLATZ, G.C.; HUBBARD, R; QUINN, H. Semen collection, freezing and artificial insemination in snakes. In: MURPHY, J. B. **Reproductive Biology and diseases**

of captive reptiles. Kansas, The society for the study of Amphibians and Reptiles. P. 71-78. 1980.

PUORTO, G.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAZIMA, I. Serpentes na selva de pedra. **Ciência Hoje.** v. 13(76). p. 66-67, 1991.

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

SAZIMA, I. Estudo da biologia comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com o uso de marcas naturais. **Memórias do Instituto Butantan**, v 50, p. 83-89, 1988

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper *Bothrops jararaca* in southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, JR. (Eds.) **Biology of the pitvipers.** Texas: Selva, 1992. P. 199-216.

SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S., ELICEIRI, K.W. **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.** Nat. Methods 9 (7), 671 – 675. 2012.

SILVA, K. B., et al. Annual changes in seminal variables of Golden lancehead pitvipers (*Bothrops insularis*) maintained in captivity. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p.144–150, 2015.

SWANSON, E.W.; BOYD, L. J. Factors affecting coiled-tail spermatozoa in the bull. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23, p. 300-309, 1962.

TOURMENTE, M.; CARDOZO, G.; BERTONA, M.; GUIDOBALDI, A.; GIOLAS, L.; CHIARAVIGLIO, M. The ultrastructure of the spermatozoa of *Boa constrictor occidentalis*, with considerations on this mating system and sperm competition theories. **Acta Zoologica**, v. 87, n. 1, p. 25-32, 2006.

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

TOURMENTE, M.; GIOJALAS, L.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm ultrastructure of *Bothrops alternatus* and *Bothrops diporus* (Viperidae, Serpentes), and its possible relation to the reproductive features of the species. **Journal of Zoomorphology**, v. 127, n. 4, p. 241-248, 2008

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

WUSTER, W; SALOMÃO, M.G.; QUIJADA-MASCARENAS, A.J.; THORPE, R. S. Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence form mitochondrial DNA

sequence analysis. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, m.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. (Eds). **Biology of the vipers**, Carmel Indiana: Eagle Mountain, p. 111-126, 2002.

ZACARIOTTI, R. L. **Estudo Longitudinal de espermograma e níveis de testosterona de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes da natureza do Estado de São Paulo**. 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.

ZACARIOTTI, R. L.; GRECO, K. F.; FERNANDES, W.; SANT'ANNA, S. S.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Zoo Biology**. V. 26, n.3, p. 155-60. 2007.

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

ZACARIOTTI, R. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Aplicações da biotecnologia na reprodução de serpentes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** (Impresso), v. 34, p. 98-104, 2010.