

TATIANE CAROLINE DE LIMA

**Biotécnicas na reprodução de *Erythrolamprus miliaris orinus*
(Serpentes: Dipsadidae): avaliação seminal e testicular**

São Paulo

2022

TATIANE CAROLINE DE LIMA

**Biotécnicas na reprodução de *Erythrolamprus miliaris orinus*
(Serpentes: Dipsadidae): avaliação seminal e testicular**

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

Orientador:

Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

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. 4187
FMVZ

Lima, Tatiane Caroline de
Biotécnicas na reprodução de *Erythrolamprus miliaris orinus* (Serpentes: Dipsadidae):
avaliação seminal e testicular / Tatiane Caroline de Lima. – 2022.
69 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

1. Serpente. 2. Dipsadidae. 3. Biotécnicas. 4. Reprodução. 5. Espermatozoide.
I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 11 de abril de 2022
CEUAx N 6779080921

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Selma Maria De Almeida Santos
Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres
Equipe envolvida: Tatiane Caroline De Lima - (executante);

Título do projeto: "Biotécnicas na reprodução de Erythrolamprus miliaris orinus (Serpentes: Dipsadidae): avaliação seminal e testicular."

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 14/10/2021, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LIMA, Tatiane Caroline

Título: **Biotécnicas na reprodução de *Erythrolamprus miliaris orinus***
(Serpentes: Dipsadidae): avaliação seminal e testicular

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os seres com escamas, penas, pelos, carapaças e pele nua que me completam e fazem a minha consciência despertar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Durvanei Augusto Maria, por ter aceitado me orientar e pela confiança, mesmo ciente de que nada seria fácil e tranquilo, e por ter me proporcionado desafios enriquecedores durante a realização deste trabalho. Obrigada pelo incentivo e acolhimento, Professor.

À Prof^a Dra. Selma Maria Almeida-Santos, por ter aberto as portas do laboratório e por ter depositado sua confiança em meu trabalho, mesmo sabendo das inúmeras pedras no caminho. Obrigada por todas as conversas e pelo carinho.

Aos curadores das coleções herpetológicas, Dr. Felipe Grazziotin, Dr. Renato Feito, Dr. Henrique Caldeira Costa, Dra. Sonia Cechin, Dra. Noeli Zanella, Dr. Roberto Baptista de Oliveira e Dr. Francisco de Paula Severo da Costa Neto. Aos técnicos e colaboradores Valdir Germano, Daphne, Leandro Avelar, Clodoaldo de Assis, Ursula Arend e Liliana Piatti. A todos vocês, muito obrigada pelo empréstimo dos exemplares utilizados nesta pesquisa em meio ao cenário pandêmico.

Ao Dr. Raúl Segundo Sánchez Gutiérrez por aceitar o convite de participar da minha banca de defesa e pela avaliação criteriosa da dissertação. À Dra. Leticia Ruiz Sueiro e à Dra. Verônica Alberto Barros por aceitarem o convite de suplentes.

À Dra. Kalena Barros da Silva por ter confiado e compartilhado seu extenso e rico conhecimento sobre biotécnicas reprodutivas. Ka, obrigada pelas conversas profissionais e pessoais, sem você nenhuma dessas oportunidades malucas, enriquecedoras e perfeitas teriam acontecido. Obrigada por tudo, tudinho! Gratidão.

À Dra. Irina do Laboratório de Genética do Instituto Butantan e aos técnicos Adriana, Dener e Eduardo, pela prontidão em orientar e ajudar com o que fosse preciso nos cortes histológicos e com as fotomicrografias.

Agradeço ao Alexsander Souza, técnico de microscopia e confocal do laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, pela leitura e ensinamentos sobre a técnica do confocal.

Ao Dr. Luiz Roberto Sardinha do parque de Equipamentos Multiusuários do Instituto Butantan, por gentilmente, processar as amostras deste trabalho no citometro de fluxo.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan. Sou especialmente grata ao Laerty, por toda a ajuda, apoio emocional e paciência durante esses dois anos e meio. Obrigada por ter me apresentado o universo da citometria e do confocal, amigo. Você é demais!

Aos técnicos do laboratório, Cristiene, Bruno, Cinthia, Kelly e Poli, pela disposição e ajuda. Meu eterno agradecimento ao Adriano, pelo auxílio, cuidado e manutenção das

“*miliaris*”, protagonistas deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Estudos de Reprodução de Squamata (GERES) Rafael, Gabrieli, Renan, Karina Silva, Serena e João Miguel, por toda ajuda. Aos meus pilares: Fabiano Andrade, Rafaela Coeti e Erick Bassi, por toda ajuda, conselhos, palavras sábias de conforto e paciência, além dos cafézinhos, conversas e risadas. Vocês foram essenciais e incríveis nesta estrada!

Ao Giuseppe Puerto, diretor do Museu Biológico do Instituto Butantan, por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte da sua equipe veterinária e por me permitir dar continuidade as atividades e disciplinas cursadas durante o mestrado. Obrigada pela compreensão e pelo incentivo científico. Gratidão!

Aos colegas do Museu Biológico, pelo apoio e vibração positiva. Em especial, a Pam, Isa e Beto, pelas boas energias emanadas e pela frase certeira “Já deu certo”!

À Cirece, sou eternamente grata. Obrigada por formatar esta dissertação, por corrigir todas as minhas escritas desde 2018 e mesmo ranzinza, compartilhar seu conhecimento sobre os squamatas sempre com senso crítico.

Agradeço às minhas amigas amadas, Lisóca, Bia, Rafa, Yaya, Thata, Gi, Lele, Carol, Bruna e Tatinha. Em especial agradeço a Sté, por todas as trocas de conhecimento, orientações e confiança nesta trajetória. Amigas de milhão! Ao meu “rimão” Carlito por todas as conversas de luz nesta etapa final e pelo seu trabalho lindo com as fotografias e com os cookies/ brownies. Amo, amo e amo!

À Emili Lima, amiga e artística plástica maravilhosa que me proporcionou os desenhos lindos e “fofinhos” das *miliaris*. Muito obrigada Emili, você arrasou demais! Viva a arte <3

Aos meus meninos André, Chicó e Zérreis. Meu trio favorito que renova minha energia diariamente, me aquece o coração sem eu precisar dizer nada e me acalanta como quem não quer nada. Meus amores multiespécies!

Por último, mas não menos importante, minha família. Minha mãe Dora Xavier, meu pai João Lima e meu pa(i)drasto Beto, por todo amor e por me ensinarem que o conhecimento é a nossa maior riqueza. Aos meus irmãos e amigos, Alessandra Lima, Márcia Lima, João Paulo Lima, por simplesmente serem a minha melhor parte. Amo vocês incondicionalmente.

RESUMO

LIMA, T. C. **Biotécnicas na reprodução de *Erythrolamprus miliaris orinus* (Serpente: Dipsadidae)**: avaliação seminal e testicular. 2022. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o sêmen da serpente *Erythrolamprus miliaris orinus*, quanto ao volume, motilidade, motilidade progressiva, concentração e as alterações morfológicas da célula espermática, além de verificar se esses parâmetros estão relacionados com o ciclo espermatogênico ao longo das estações. Para tanto, foram avaliadas amostras de sêmen de cinco exemplares machos, pertencentes ao plantel do Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan e coletado tecidos do testículo de 41 exemplares de coleções e instituição herpetológicas do sul e do sudeste do Brasil. O potencial elétrico mitocondrial das células espermáticas foi analisado quantitativamente por citometria de fluxo e qualitativamente por microscopia confocal à laser. O sêmen de *Erythrolamprus miliaris orinus* apresentou maior volume e concentração espermática no verão, corroborando com o maior potencial elétrico mitocondrial analisado na citometria de fluxo. O ciclo espermatogênico para *E. m. orinus* é assazonal, com pico espermiogênico no verão. No período de cópula houve menor taxa de alterações morfológicas (outono) e o verão foi a melhor estação para realizar colheita de sêmen.

Palavras-chave: Serpente. Dipsadidae. Biotécnicas. Reprodução. Espermatozoide.

ABSTRACT

LIMA, T. C. **Biotechnics in the reproduction of *Erythrolamprus miliaris orinus* (Serpentes: Dipsadidae)**: seminal and testicular evaluation. 2022. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

This Project aimed to evaluate *Erythrolamprus miliaris orinus* semen due to volume, motility, progressive motility, concentration and morphologic differences of sperm cells, and also evaluates these parameters and its correlation to spermatogenic cycle throughout the seasons. Semen samples obtained from five males, which belonged to Butantan Institute's Laboratório de Ecologia e Evolução collection, were evaluated, so as testicle tissue from 41 individuals of zoological collections of Universities across South and Southeast Brazil. Sperm cells mitochondrial electrical potential quantitative evaluation was made using flow cytometry, while its qualitative evaluation's technique was confocal laser scanning microscopy. *Erythrolamprus miliaris orinus* semen's presented greater volume and sperm concentration during Summer, corroborating with mitochondrial electrical potential seen in flow cytometry. *E. m. orinus* sperm cycle is not seasonal, and its spermatogenic activity peak is during Summer. In copulation period, there was less morphological changes rates (during Fall) and Summer was the best season to collect semen.

Keywords: Snake. Dipsadidae. Biotechnics. Reproduction. Sperm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Erythrolamprus miliaris orinus</i>	27
Figura 2 -	Mapa do estado de São Paulo com distribuição geográfica dos exemplares de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> analisados neste estudo.....	28
Figura 3 -	Colheita de material seminal de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i>	29
Figura 4 -	Distribuição geográfica dos exemplares analisados de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i>	32
Figura 5 -	Espermatozoides de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> sob microscopia de contraste de fase.....	38
Figura 6 -	Alterações morfológicas nos espermatozoides de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i>	39
Figura 7 -	Análise do potencial elétrico mitocondrial nas células espermáticas de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> entre os indivíduos (n = 5) na estação do verão por citometria de fluxo.....	41
Figura 8 -	Análise do potencial elétrico mitocondrial nas células espermáticas de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> entre os indivíduos (n = 5) na estação do outono por citometria de fluxo.....	41
Figura 9 -	Análise do potencial elétrico mitocondrial nas células espermáticas de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> entre os indivíduos (n = 5) na estação do inverno por citometria de fluxo.....	42
Figura 10 -	Análise do potencial elétrico mitocondrial nas células espermáticas de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> entre os indivíduos (n = 5) na estação da primavera por citometria de fluxo.....	42
Figura 11	Fotomicrografias representativas das células espermáticas da serpente <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> no verão com A) mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRed) e núcleos marcados em azul (DAPI), analisadas por microscopia confocal a laser.....	44
Figura 12	Fotomicrografias das células espermáticas da serpente <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> no outono com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRed) e núcleos marcados em azul (DAPI), analisadas por microscopia confocal a laser.....	45
Figura 13	Fotomicrografias das células espermáticas da serpente <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> no inverno com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRed) e núcleos marcados em azul (DAPI), analisadas por microscopia confocal a laser.....	46
Figura 14 -	Fotomicrografias das células espermáticas da serpente <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> na primavera com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRed) e núcleos marcados em azul (DAPI), analisadas por microscopia confocal a laser.....	47

Figura 15 - Sistema urogenital masculino de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i>	48
Figura 16 - Distribuição do volume testicular direito de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> em relação às estações do ano.....	49
Figura 17 - Variação do volume testicular total de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> em relação às estações do ano.....	50
Figura 18 - Distribuição do volume testicular direito de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> em relação ao comprimento-rostro-cloacal (CRC).....	50
Figura 19 - Cortes histológicos transversais e longitudinais de testículos de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> em diferentes estações.....	52
Figura 20 - Cortes histológicos transversais e longitudinais de testículos de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> em diferentes estações.....	53

LISTA DE TABELAS

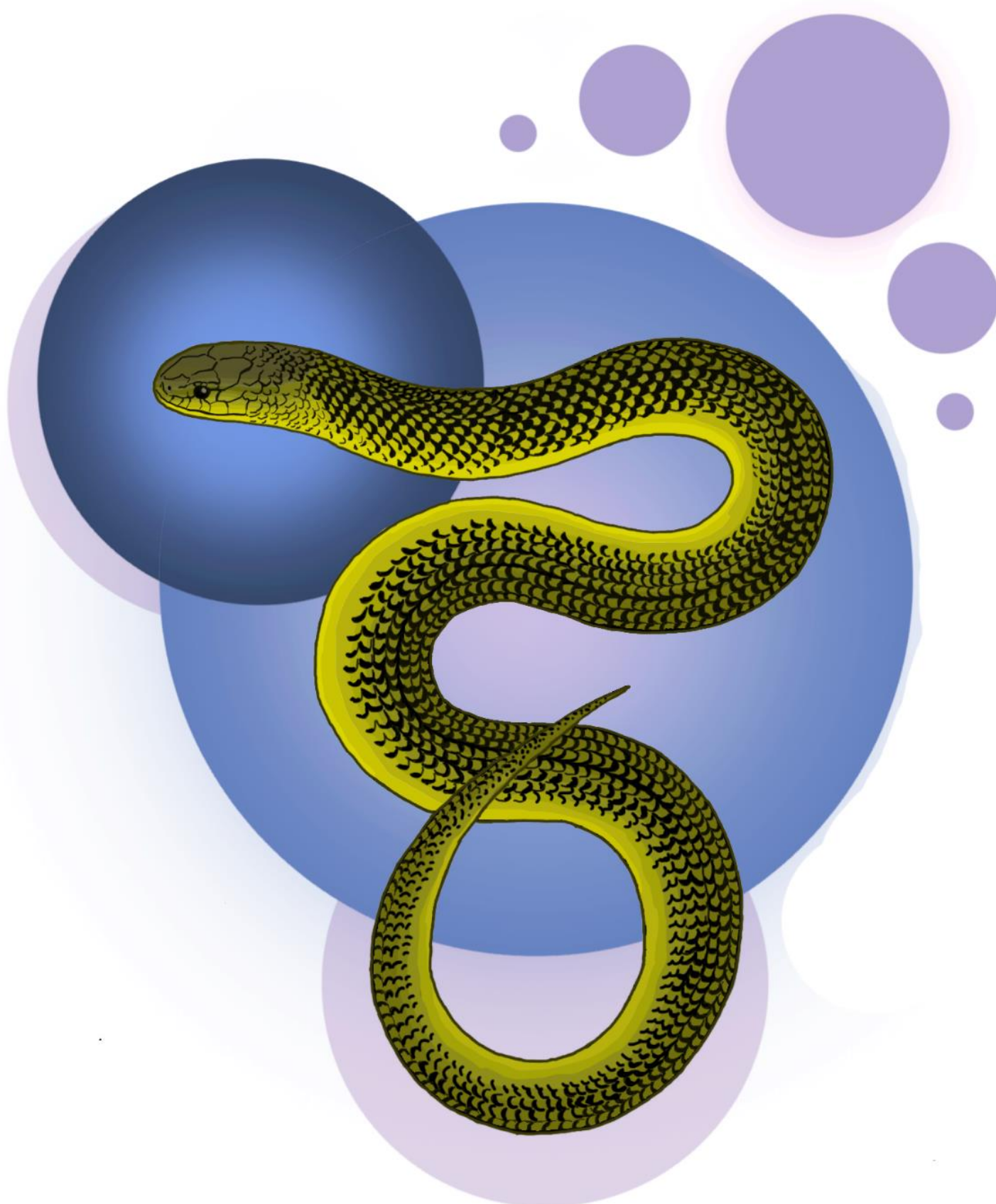
Tabela 1 -	Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP), valores mínimos e máximos referentes aos parâmetros seminais de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> (n = 5).....	36
Tabela 2 -	Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP) dos parâmetros seminais avaliados em machos adultos de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> mantidos <i>ex situ</i> de acordo com as estações climáticas.....	37
Tabela 3 -	Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP) das alterações da morfologia das células espermáticas encontradas no sêmen de machos adultos (n = 5) de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> mantidos <i>ex situ</i> nas quatro estações climáticas.....	38
Tabela 4 -	Alterações morfológicas encontradas no material seminal de <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> (n = 2.000 células espermáticas).....	39
Tabela 5 -	Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP) da análise do potencial elétrico da membrana plasmática nos espermatozoides de <i>E. m. orinus</i> , durante as estações climáticas.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos estágios do ciclo espermatogênico.....	33
Quadro 2 - Estágios do ciclo espermatogênico em <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i> no Sul e Sudeste do Brasil.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	A SERPENTE <i>Erythrolamprus miliaris orinus</i>	20
2.2	COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	21
2.3	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS.....	23
2.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS.....	23
2.5	CICLO ESPERMATOGÊNICO.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	AVALIAÇÃO SEMINAL.....	27
3.1.1	Colheita e avaliação do sêmen	28
3.1.2	Avaliação dos parâmetros seminais	29
3.1.3	Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo	30
3.1.4	Avaliação morfológica por microscopia confocal à laser	31
3.2	AVALIAÇÃO DO CICLO ESPERMATOGÊNICO.....	31
3.2.1	Coleta de dados	32
4	RESULTADOS	36
4.1	ASPECTOS GERAIS DO SÊMEN.....	36
4.1.1	Avaliação da sazonalidade dos parâmetros seminais	36
4.1.2	Morfologia espermática	37
4.1.3	Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo	40
4.1.4	Avaliação morfológica das células espermáticas por microscopia confocal à laser	43
4.2	CICLO ESPERMATOGÊNICO.....	48
4.2.1	Análise macroscópica dos testículos	49
4.2.2	Análise microscópica dos testículos	51
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	62



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro país com maior riqueza de espécies de répteis do mundo, ficando atrás da Austrália com 1.121 e do México com 995 espécies (JETZ *et al.*, 2021). Possui 804 espécies de Squamata (serpentes, lagartos e anfisbenas), das quais 430 são serpentes (COSTA; GUEDES; BÉRNILS, 2021). Apesar da abundância de serpentes existentes no Brasil, a sobrevivência de muitas espécies está ameaçada (IUCN, 2021) por diversos fatores, entre eles, a destruição dos habitats naturais através do desmatamento progressivo provocado pela ação humana, comprometendo o equilíbrio dos ecossistemas (PEREIRA *et al.*, 2013; (SILVA JUNIOR *et al.*, 2021). Segundo o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBIO, 2018), a maioria das serpentes ameaçadas pertence à família Dipsadidae, representada por mais de 235 espécies.

Na conservação das espécies silvestres, é essencial o emprego de programas de reprodução *ex situ* utilizando biotécnicas de reprodução animal, que são ferramentas fundamentais para o sucesso na eficiência reprodutiva (DOMINGUES *et al.*, 2011; ANDRABI; MAXWELL, 2007). Essas biotécnicas consistem na colheita e avaliação seminal, inseminação artificial (IA), criopreservação, fertilização *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE) (ZÚCCARI; SERENO, 2006; SILVA, 2014; MOREIRA, 2017) e podem ser aplicadas tanto nos animais domésticos, quanto nos animais silvestres (SILVA, 2014).

Concomitante às biotécnicas da reprodução é possível utilizar técnicas de biologia molecular que são capazes de avaliar, entre outros parâmetros, a viabilidade das células espermáticas (ANGRIMANI *et al.*, 2015), analisando o potencial elétrico mitocondrial, que está diretamente associado à qualidade do sêmen, pois permite que o espermatozoide seja apto para a chegada ao oócito (AGNIHOTRI *et al.*, 2016).

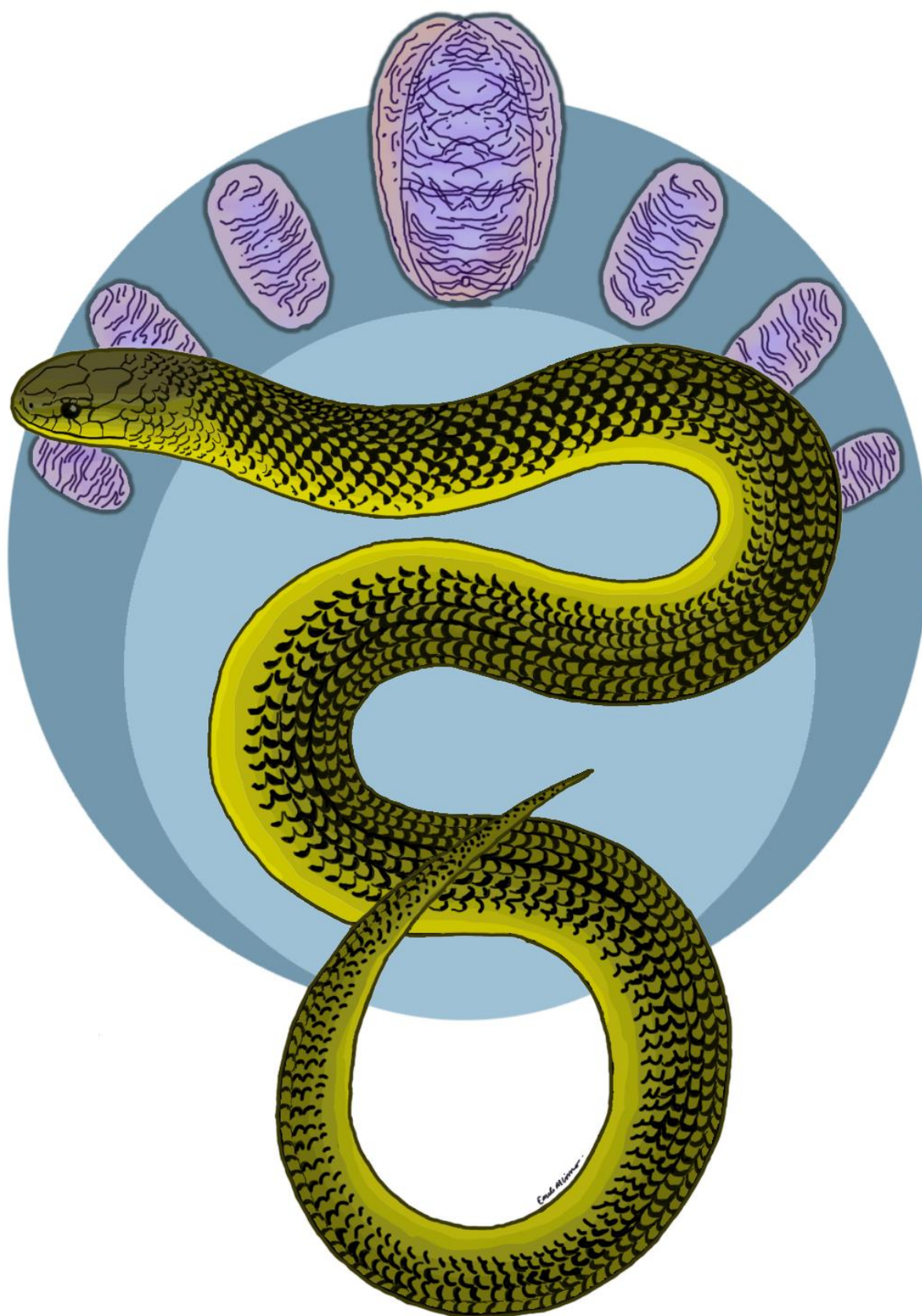
A citometria de fluxo é uma técnica que pode ser utilizada para avaliar a viabilidade e a integridade espermática, utilizando um sistema automatizado capaz de mensurar o potencial mitocondrial das células espermáticas através de sondas fluorescentes que quantificam as células viáveis (ARRUDA, 2000). A microscopia confocal é outra ferramenta empregada na avaliação qualitativa do potencial mitocondrial das células espermáticas, permitindo imagens de diferentes planos focais e reconstruções tridimensionais (3D). Utilizam-se marcadores fluorescentes que marcam estruturas específicas desejadas (MORTARA *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*,

2017).

Entretanto, para melhor eficiência e aplicabilidade das biotécnicas reprodutivas, é necessário o entendimento da biologia reprodutiva básica das espécies de interesse (SWANSON, 2006), que se baseia em estudos das células espermatogênicas da espécie.

Em serpentes, o ciclo espermatogênico é analisado de acordo com o volume, comprimento testicular e caracterização dos estágios das células espermáticas (GRIBBINS; GIST, 2003; MATHIES, 2011; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2013), além das mudanças estruturais do epitélio dos túbulos seminíferos, como diâmetro e altura (ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2013).

Até o presente momento, nenhum estudo utilizou-se de biotécnicas de reprodução e análise histológica para descrever o ciclo espermatogênico da serpente *Erythrolamprus miliaris orinus*. Neste trabalho são apresentadas a avaliação do material seminal e a descrição das análises histológicas do testículo, utilizando como modelo a subespécie *Erythrolamprus miliaris orinus* para elucidar um protocolo que poderá ser utilizado em espécies de serpentes ameaçadas pertencentes à família Dipsadidae.



REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A SERPENTE *Erythrolamprus miliaris orinus*

A serpente *Erythrolamprus miliaris* (Linnaeus, 1758), popularmente conhecida como “cobra d’água” (ERAS *et al.*, 2004), compõe a família Dipsadidae e possui ampla distribuição geográfica na América do Sul, incluindo Bolívia, Brasil (Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Pernambuco, Paraná, Piauí, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo), Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela, ocorrendo em habitats como a Mata Atlântica, com registro em todas as ecorregiões, exceto Pampas (PIZZATTO; MARQUES, 2006; CITELI; HAMDAN; GUEDES, 2016; ICMBIO, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Segundo a lista de répteis da Sociedade Brasileira de Herpetologia (COSTA; GUEDES; BÉRNILS, 2021), atualmente existem cinco subespécies de *Erythrolamprus miliaris*: *E. m. amazonicus*, *E. m. chrysostomus*, *E. m. merremii*, *E. m. miliaris* e *E. m. orinus*, sendo esta última o modelo de estudo desta dissertação, com exemplares oriundos do Sudeste e Sul do Brasil (Figura 1).

A serpente *Erythrolamprus miliaris orinus* (Cope, 1868) possui hábito semi-aquático e geralmente é encontrada nas proximidades de águas correntes, lagoas e já foi observada em ambientes marinhos (HARTMANN, 2005; CITELI; HAMDAN; GUEDES, 2016). Apresenta tanto atividade diurna quanto noturna (MARQUES, 1998) e possui uma dieta generalista (DIXON, 1983), podendo predar diferentes tipos de presas como anfisbenídeos, lagartos, roedores e, preferencialmente, peixes e anfíbios anuros (MARQUES, 1998; CHICARINO *et al.*, 1998; LIMA; COLOMBO, 2008; DUARTE *et al.*, 2014; BATISTA; FACURE; MARQUES, 2019).

Ovíparas, o ciclo reprodutivo das fêmeas é considerado sazonal, com cópulas observadas de março a junho (PRADO, 2003) e a vitelogênese e ovulação entre setembro e fevereiro (PIZZATTO; MARQUES, 2006; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2017). Devido a ovulação ocorrer em um período consideravelmente posterior à época da cópula, é sugestivo que as fêmeas possuam um ciclo pós-nupcial (PRADO, 2003), estocando os espermatozoides na região do infundíbulo posterior até o momento da ovulação (ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2017). O tamanho da ninhada varia entre quatro e trinta ovos, que eclodem entre fevereiro

e abril (PRADO, 2003). Quanto ao dimorfismo sexual, as fêmeas são maiores, apresentando um comprimento rostro-cloacal (CRC) médio de 686,8 mm, e os machos com CRC médio de 550,6 mm (PRADO, 2003). Os machos atingem a maturidade sexual com menor tamanho corporal (CRC médio de 417 mm) em relação às fêmeas (CRC médio de 505 mm) (PIZZATTO; MARQUES, 2006).

2.2 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN

As análises das características do sêmen são de grande importância para o desenvolvimento e aplicação de biotécnicas reprodutivas, pois são capazes de avaliar o potencial reprodutivo dos machos que serão utilizados em programas de reprodução *in situ* e *ex situ*, auxiliando na conservação de espécies ameaçadas (HOWARD, 1993).

Para avaliar o potencial reprodutivo dos machos de serpentes, a técnica de colheita de sêmen vem sendo testada há décadas.

Fitch (1960) foi um dos pioneiros a exercer a técnica de colheita de sêmen em serpentes, por meio da compressão do terço final do corpo do animal, porém, a maioria das amostras de sêmen obtidas eram contaminadas por fezes e urato.

Mengden *et al.* (1980) colheram sêmen de oito espécies de serpentes das famílias Colubridae, Boidae, Viperidae e Elapidae, através de massagem digital na região ventral do terço final do animal, e com auxílio de uma seringa, colheram o sêmen diretamente da cloaca, diminuindo a contaminação das amostras.

Quinn, Blasedel e Platz (1989) colheram sêmen da serpente *Thamnophis marcianus*, utilizando um eletroejaculador e em seguida realizando massagem ventro-lateral no sentido crânio-caudal, com o intuito de expelir o sêmen pela cloaca. No entanto, o material seminal era contaminado por urato.

Posteriormente, Tourmente *et al.* (2007) utilizaram a técnica do eletroejaculador em uma jiboia (*Boa constrictor occidentalis*) e obtiveram ótimo resultado, já que o uso desta técnica é sugerido em animais que possuem a musculatura bem desenvolvida, como no caso dos boídeos (TOURMENTE *et al.*, 2007; TOURMENTE, GIOJALAS; CHIARAVIGLIO, 2011).

Zacariotti *et al.* (2007) associaram massagens digitais ventrais no terço final do animal com o uso de anestesia local em cascavel (*Crotalus durissus*), com o

intuito de promover um maior relaxamento da região cloacal, assim, facilitando o procedimento de colheita. O sêmen foi colhido diretamente da papila urogenital com o auxílio de uma seringa, minimizando consideravelmente a contaminação do material seminal por fezes e urato.

Outro método descrito para serpentes é a remoção dos ductos deferentes em sua totalidade, ou de um pequeno fragmento, principalmente em casos onde é necessária a colheita de uma amostra pura. Porém, essa remoção dos ductos deferentes ocorre post-mortem (LANGLADA *et al.*, 1991; ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2004; TOURMENTE; GIOJALAS; CHIARAVIGLIO, 2011; MOZAFARI, 2012), ou

através da cirurgia laparotomia, que envolve uma incisão ventral entre o terço médio e final do animal com a finalidade de acessar os ductos deferentes (LANGLADA *et al.*, 1991; MARINHO *et al.*, 2009).

Após a colheita do sêmen, são realizados exames andrológicos que consistem na avaliação do material seminal quanto a coloração, volume, motilidade, motilidade progressiva, concentração e morfologia.

A coloração do sêmen pode variar de branco a ligeiramente amarelado (SILVA, 2014) e o volume de sêmen que se obtém, vai depender de fatores como o método de colheita realizada e a espécie da serpente (COETI *et al.*, 2020).

A motilidade espermática representa o número de espermatozoides, móveis expresso em porcentagem. É estimada de forma subjetiva, analisada sob microscopia óptica com objetiva de 40X, utilizando uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula (ARRUDA *et al.*, 2011; CBRA, 2013). Nas espécies em que a concentração espermática é elevada, é necessário diluir a amostra seminal para visualização das células ao microscópio (CBRA, 2013). A motilidade progressiva se refere à porcentagem de células espermáticas que se movimentam progressivamente (ARRUDA, 2000). As avaliações de motilidade e motilidade progressiva de forma subjetiva são as técnicas mais utilizadas na rotina laboratorial, sendo de grande importância para identificar o material seminal de baixa e alta qualidade (ARRUDA *et al.*, 2011).

A concentração espermática representa o número de espermatozoides por mililitro (mL) e é obtida utilizando-se uma câmara hematimétrica de Neubauer para a contagem das células espermáticas com o auxílio de um microscópio óptico (CBRA, 2013; SILVA; NOGUEIRA; SILVA, 2017).

2.3 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS

A morfologia dos espermáticas das serpentes segue os padrões descritos para Squamata (JAMIESON *et al.*, 1996), com células filiformes e compostas por três regiões: cabeça, peça intermediária e cauda, sendo a cabeça alongada, ligeiramente curva e dividida em acrossoma, região nuclear e pescoço; a peça intermediária é a maior estrutura da célula espermática, possuindo aproximadamente o mesmo diâmetro em todo o seu comprimento (OLIVER *et al.*, 1996; TOURMENTE *et al.*, 2006; COETI *et al.*, 2021).

2.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ELÉTRICO MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS

Na peça intermediária da célula espermática é encontrada a mitocôndria, uma organela que exerce a função de produzir e fornecer energia adequada para os espermatozoides através do metabolismo aeróbico na forma de adenosina trifosfato (ATP), durante o processo de fosforilação oxidativa. Este processo faz com que o espermatozoide adquira motilidade e esteja apto para chegar ao oócito (JANUSKAUSKAS; ZILINSKAS, 2002; MIKI *et al.*, 2004; AGNIHOTRI *et al.*, 2016).

A atividade mitocondrial pode ser avaliada por microscopia confocal a laser ou por citometria de fluxo por meio de sondas específicas, como o MitoRed e a Rodamina 123, respectivamente, ambas utilizadas para corar as mitocôndrias funcionais (ARRUDA *et al.*, 2005).

Na microscopia confocal a laser, a sonda fluoresce em vermelho quando o gradiente de prótons da membrana mitocondrial está ativo. Este gradiente de prótons é decorrente de uma cadeia de carreadores de elétrons ativos que se ligam à fosforilação oxidativa. Quando as mitocôndrias espermáticas coram discretamente em vermelho ou não são coradas, significa que o gradiente de prótons está diminuído e as células espermáticas possuem poucas ou nenhuma mitocôndria ativa (GARNER *et al.*, 1997).

Na citometria de fluxo, as células ficam em uma solução aquosa direcionada a um fluxo de laser linear, onde as células passam individualmente através de um feixe que excita as sondas fluorescentes. O equipamento converte a frequência das sondas em sinais elétricos, que são quantificados por softwares específicos,

resultando na porcentagem de células que apresentaram alguma atividade mitocondrial (CORDELLI *et al.*, 2005).

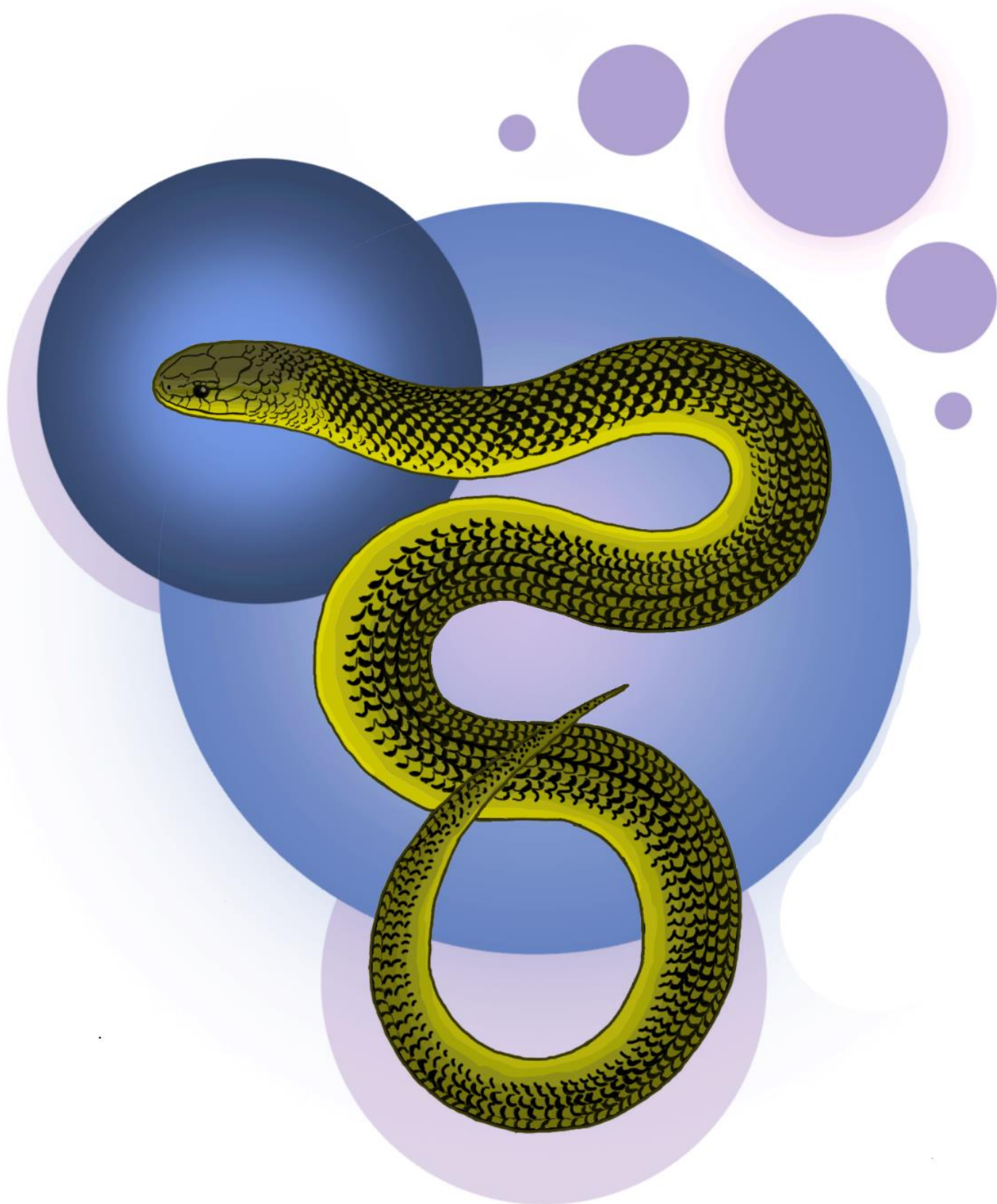
2.5 CICLO ESPERMATOGÊNICO

Nas serpentes, os ciclos reprodutivos são analisados a partir de dados macroscópicos e microscópicos (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2014). Na avaliação macroscópica as variações do volume e comprimento testicular, estão relacionados com o período da espermatogênese (SHINE, 1977; PLEGUEZUELOS; FERICH, 1999; PRADO, 2003). Porém, para certificar e caracterizar a fase do ciclo espermatogênico, o ideal é que haja uma avaliação histológica dos túbulos seminíferos para a caracterização dos estágios celulares, como espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides (GRIBBINS; GIST, 2003; MATHIES, 2011; ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2013), além de avaliar as mudanças estruturais de seu epitélio dos túbulos seminíferos, como diâmetro e altura (ROJAS; BARROS; ALMEIDA-SANTOS, 2013; ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2014).

O ciclo reprodutivo dos machos de Squamata apresenta múltiplas classificações, das quais a gametogênese é a principal ferramenta utilizada para caracterizá-lo. Quanto à sazonalidade na produção de espermatozoides, Schuett (1992) classificou os seguintes tipos de ciclos: **I - Pós-nupcial ou Dissociado:** quando a produção de gametas ocorre após o período de cópula e exige estocagem dos espermatozoides no ducto deferente; **II - Misto:** quando a produção de gametas é iniciada no final da primavera com interrupção no inverno e finalização apenas na primavera seguinte; **III - Pré-nupcial ou Associado:** quando a produção de gametas coincide ou precede a época de acasalamento e; **IV - Atividade Reprodutiva Contínua:** onde a espermatogênese ocorre durante todo o ano.

Mathies (2011) propôs uma nova classificação dos ciclos, onde são avaliados em níveis individual e populacional. O ciclo individual pode ser classificado em: **I - Cíclico Descontínuo:** quando as gônadas ou os órgãos acessórios apresentam quiescência reprodutiva durante um período do ano; **II - Cíclico Contínuo:** quando as gônadas ou os órgãos acessórios não ficam em quiescência reprodutiva, mas há uma redução na produção de gametas por algum período do ano, ou; **III - Acíclico:** quando há atividade reprodutiva contínua de gametas ao longo do ano. O ciclo populacional pode ser classificado em: **sazonal**, quando a gametogênese dos

indivíduos de uma população apresenta sincronia, no qual todos os indivíduos produzem gametas durante o mesmo período do ano, ou; **assazonal**, quando não há sincronia na produção de gametas entre os indivíduos, ou seja, cada indivíduo realiza a gametogênese em um período do ano.



MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AVALIAÇÃO SEMINAL

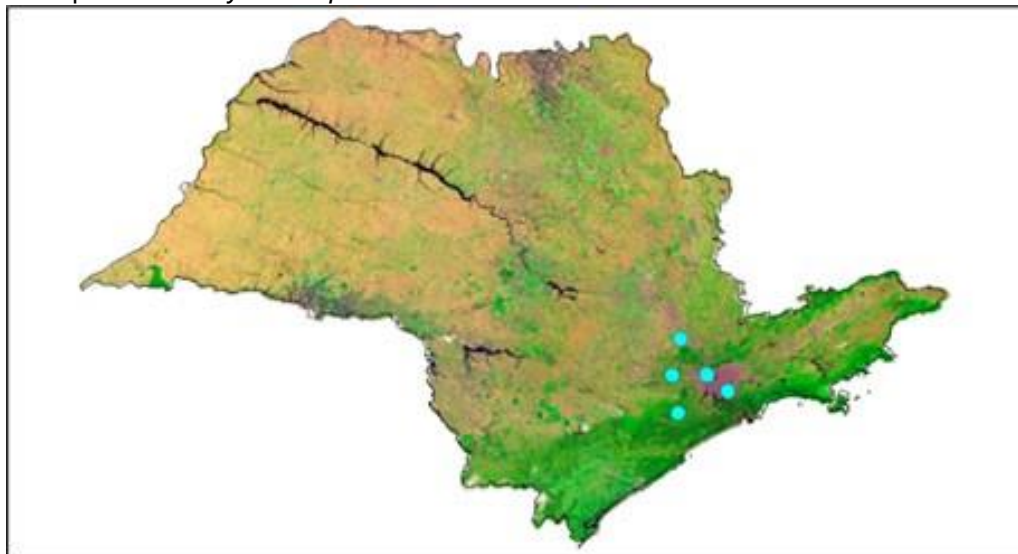
Foram utilizados cinco espécimes machos (CRC > 417 mm) (PRADO, 2003) de *E. m. orinus* (Figura 1) oriundos do estado de São Paulo (Figura 2) e mantidos no biotério do Laboratório de Ecologia e Evolução (LEEV) do Instituto Butantan, sob condições controladas de fotoperíodo (12 horas claro e 12 horas escuro), umidade e temperatura, que se mantém próxima de 25 °C. Os animais foram mantidos em cativeiro desde outubro de 2015 (CEUAIB 7317040915), acomodados individualmente em caixas plásticas transparentes (560 x 380 x 370 mm) com as laterais e a tampa perfuradas, a forração composta por papelão ondulado e um abrigo artificial em cada recinto foi disponibilizado. A dieta dos animais, constituída por anuros (*Lithobates catesbeianus*) oferecidos quinzenalmente, obedeceu à proporção de 10 a 20% da massa do indivíduo e foi disponibilizada água fresca *ad libitum*.

Figura 1 - *Erythrolamprus miliaris orinus*



Fonte: Cristiene Rodrigues Martins (2022).

Figura 2 - Mapa do estado de São Paulo com distribuição geográfica dos exemplares de *Erythrolamprus miliaris orinus* analisados neste estudo



Fonte: Circe Cavalcanti de Albuquerque (2022).

Legenda: Animais oriundos das regiões de A – Juquitiba/ SP; B - São Roque/ SP; C) Itupeva/ SP; D) Osasco/ SP; E) São Bernardo do Campo/ SP.

3.1.1 Colheita e avaliação do sêmen

O sêmen foi colhido trimestralmente, seguindo a metodologia proposta por Mengden *et al.* (1980). As colheitas foram realizadas em dias que corresponderam aproximadamente ao meio de cada estação climática, nos meses de fevereiro (verão), maio (outono), agosto (inverno) e novembro (primavera), referentes ao ano de 2021. Foi realizada apenas uma colheita de sêmen em cada animal por estação e, previamente a cada colheita, foram coletados os dados biométricos (CRC e massa corpórea) de todos os animais.

Para a colheita do sêmen, os animais foram fisicamente contidos para a realização de massagem digital na região ventral do terço caudal do animal, com o intuito de eliminar o conteúdo intestinal e, em seguida, foi realizada a limpeza da região cloacal com solução fisiológica (NaCl 0,9%) para a remoção de possíveis sujidades. Em seguida, o sêmen foi colhido com a execução de massagem digital, delicadamente na região ventro-lateral no terço caudal de ambos os lados do corpo do animal, durante dois a três minutos, a fim de comprimir os ductos deferentes para que o sêmen fosse expelido. O mesmo foi colhido diretamente da papila urogenital com o uso de tubo capilar de vidro micro-hematócrito (linha de vidro Precision®, Shandong Harmowell Trade Corporation, Shandong, China) (Figura 3).

Figura 3 - Colheita de material seminal de *Erythrolamprus miliaris orinus*



Fonte: Cristiene Rodrigues Martins (2022).

3.1.2 Avaliação dos parâmetros seminais

Imediatamente após a colheita de sêmen dos cinco exemplares de *E. m. orinus*, o material seminal foi avaliado quanto aos seguintes parâmetros seminais:

Volume e coloração: foram estimados no momento da colheita, diretamente nos tubos capilares de vidro micro-hematócrito (linha de vidro Precision®, Shandong Harmowell Trade Corporation, Shandong, China). No volume, a amostra seminal foi medida em milímetros (mm), na qual cada 1 mm equivale 1,05 μL . Em seguida, devido à sua elevada concentração, o volume da amostra seminal foi previamente diluído na proporção de 1:100 μL em meio de cultura de células (HAM-F10, Nutricell) para avaliação da motilidade e motilidade progressiva;

Motilidade e motilidade progressiva: foi colocada uma gota do sêmen diluído entre lâmina de vidro e lamínula e feita a avaliação subjetiva em um microscópio óptico Eclipse E100 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão) sob aumento de 100X. A motilidade foi estimada levando-se em consideração qualquer tipo de movimento que os espermatozoides apresentaram em cinco diferentes campos microscópicos (FAHRIG *et al.*, 2007), em uma escala de 0 a 100% de espermatozoides móveis. A motilidade progressiva foi observada no sentido direcional (deslocamento em uma direção) em que os espermatozoides se moviam,

em uma escala de 0 a 5 de espermatozoides móveis, onde 0 - sem movimentos; 1 - movimentos levemente progressivos e lateralizados; 2 - movimentos moderadamente lateralizados com progressão para frente em jatos; 3 - movimentos progressivos para frente, porém lentos; 4 - movimentos progressivos para frente com velocidade moderada; e 5 - movimentos progressivos para frente rápidos (MATTSON *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2015; COETI *et al.*, 2020);

Concentração espermática: o sêmen foi diluído na proporção de 1:150 μL em solução de formol salino (10%) para a determinação de sua concentração. Foi colocada uma gota do sêmen já diluído em ambas as câmaras de um hemocítmetro de Neubauer e os espermatozoides foram contados com o uso de um microscópio óptico Eclipse E100 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão), sob o aumento de 40X. Após a contagem das células nos cinco quadrantes na diagonal de cada câmara, foi calculada a média entre os dois lados da câmara e esse valor foi usado na seguinte fórmula: $\mathbf{N \times 5 \times 10 \times 150 \times 1000 = \text{sptz/ mL}}$, onde: **N** = médias de espermatozoides contados nos dois lados da câmara; **5** = número de quadrados contados em 1 mm^2 ; **10** = fator de profundidade da câmara; **150** = fator de diluição; **1000** = para a transformação em mL; **sptz/ mL** = espermatozoides por mL;

Morfologia espermática: foi retirada uma alíquota do material seminal já diluído em meio HAM-F10 (*Nutricell*) e acrescentada a solução de formol salina (10%). Nos cinco exemplares de *E. m. orinus*, foram fotografadas e avaliadas 100 células espermáticas de cada amostra nas quatro estações do ano, sob microscopia de contraste de fase com aumento de 1000X para estimativa de espermatozoides normais e defeituosos. As alterações morfológicas encontradas nas células espermáticas foram classificadas em defeitos: da cabeça, da peça intermediária e/ou da cauda. As medidas do comprimento da cabeça, peça intermediária e da cauda foram aferidas com o software *ImageJ*, versão 1.52 (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

3.1.3 Análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo

Após a avaliação andrológica dos cinco exemplares de *E. m. orinus*, as amostras foram alíquotadas, identificadas e centrifugadas a 800 rpm por cinco minutos para concentrar os espermatozoides. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em 200 μL de solução tampão FACS Flow (solução salina) e adicionado 5 μL de corante Rodamina-123 (5 mg/mL diluído em etanol). Em

seguida, as amostras foram mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37 °C por 30 minutos. Após este período, os tubos com as amostras foram centrifugados a 800 rpm novamente por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em 200 µL de tampão FACS Flow. A leitura e análise da marcação da Rodamina-123 na célula foi realizada em citômetro de fluxo BD FACS Canto™ em intensidade de fluorescência FLH-1 e os histogramas adquiridos foram analisados através do programa *Cell-Quest* – BD.

3.1.4 Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser

Para a realização da avaliação das mitocôndrias das células espermáticas, as amostras de espermatozoides foram alíquotadas e coradas com 200 nM de MitoRed (Sigma-Aldrich, USA), durante uma hora no escuro, para evitar quaisquer alterações induzidas pela luz, a 37 °C para marcação das mitocôndrias. Após a incubação, o excesso de MitoRed foi removido e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após a incubação com o MitoRed para fixação, foi adicionado 100 µL de paraformaldeído a 4% por 30 minutos e em seguida, foram lavadas com PBS. Após essa etapa, 10 µL da solução marcada e fixada foi colocada na lâmina para secar à temperatura ambiente. Em seguida, 15 µL do meio de preservação da fluorescência (VECTASHIELD® Antifade com DAPI) foram colocados em lamínulas para observação no microscópio de fluorescência Confocal a Laser (Fluoview™ 300) e as imagens foram fotodocumentadas e analisadas.

3.2 AVALIAÇÃO DO CICLO ESPERMATOGÊNICO

Para a obtenção de amostras histológicas, foram dissecados 41 exemplares machos de *E. m. orinus*, provenientes das regiões sudeste e sul do país (Figura 4), fixados e preservados entre os anos de 1973 a 2020 nas coleções herpetológicas e museus zoológicos das seguintes instituições: Laboratório Especial de Coleções Zoológicas (LECZ), Instituto Butantan, São Paulo; Coleção Zoológica de Referência Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (ZUFMS); Museu de Zoologia João Moojen, Universidade Federal de Viçosa (MZUFV), Minas Gerais; Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica (MCN), Rio Grande do Sul; Museu

Zoobotânico Augusto Ruschi, Universidade de Passo Fundo (Muzar), Rio Grande do Sul; Coleção Herpetológica de Répteis, Universidade Federal de Juiz de Fora (CHUFJF), Minas Gerais e; Coleção de Herpetologia do Museu de Ciências Naturais da Universidade do Vale do Taquari, (ZHUMCN-UNIVATES), Rio Grandedo Sul.

Figura 4 - Distribuição geográfica dos exemplares analisados de *Erythrolamprus miliaris orinus*



Fonte: Circe Cavalcante de Albuquerque (2022).

Foram registrados os dados de procedência e data do tombo de todos os exemplares e posteriormente, aferidos dados do comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento caudal (CC), utilizando uma fita métrica milimetrada (mm) e massa corpórea (g).

3.2.1 Coleta de dados

Após as mensurações dos exemplares, foi realizada uma incisão contínua no plano mediano da região ventral com uma tesoura cirúrgica entre a quarta e a quinta escama ventral a partir da escama cloacal, seguindo cranialmente até a região das gônadas, onde foram aferidos comprimento, largura e espessura dos testículos (esquerdo e direito) através do paquímetro digital com precisão de 0,01mm, para

determinar o volume testicular (VT) para analisar se havia hipertrofia sazonal da gônada.

O volume testicular foi determinado através da fórmula do elipsóide (SHINE, 1980; PLEGUEZUELOS; FERICHE, 1999): $VT = 4/3 \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c$, onde a = metade do comprimento do testículo, b = metade da largura do testículo e c = metade da espessura do testículo.

Foram coletadas amostras teciduais de aproximadamente 40 mm do testículo direito, na qual foram devidamente identificadas em cassetes e conservados em etanol 70% para a realização do estudo histológico. As amostras passaram pelo processo de desidratação em série crescente de etanol (80%, 90%, 95%, 100% e 100%) e ficaram submersas em cada uma das concentrações por uma hora. Em seguida foram diafanizadas em xilol I puro por uma hora e xilol II puro por mais uma hora cada. Após a diafanização, as amostras passaram pelo processo de infiltração em parafina I e parafina II, ambas por uma hora. Posteriormente, os tecidos foram emblocados em parafina e os blocos foram cortados em fatias de 5 μ m de espessura com o auxílio de um micrótomo (Leica) e estendidas em lâminas de vidro com a identificação do cassete.

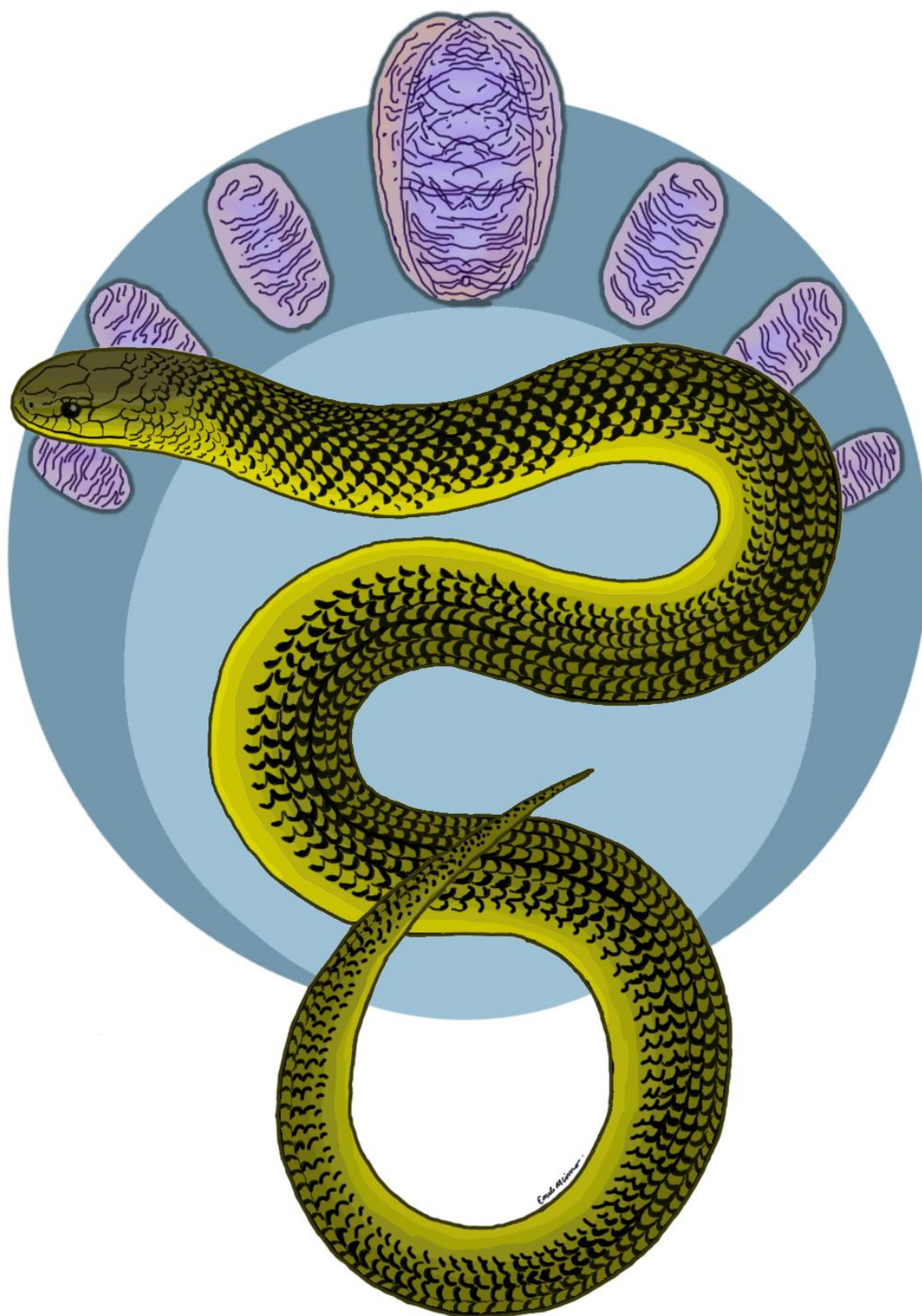
As lâminas passaram pelo processo de coloração por Hematoxilina/ Eosina (H/E) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) e fotomicrografadas em fotomicroscópio Olympus BX61VS. As imagens foram utilizadas para caracterizar e classificar os estágios celulares (espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides) de acordo com GOLDBERG e PARKER (1975) (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação dos estágios do ciclo espermatogênico

Estágios	Descrição dos túbulos seminíferos
I	Regressão completa: túbulos seminíferos revestidos por espermatogônias ecélulas de Sertoli.
II	Início da recrudescência: divisão das espermatogônias; espermatócitos primários.
III	Recrudescência: espermatídes primárias e espermatócitos.
IV	Espermiogênese inicial: espermatídes em metamorfose.
V	Espermatogênese: espermatozoides maduros no lúmen.
VI	Regressão inicial: epitélio germinativo reduzido.

Fonte: GOLDBERG; PARKER (1975).

As análises estatísticas foram feitas através do software IBM SPSS Statistic e os dados que apresentaram distribuição não paramétrica passaram pela transformação logarítmica obtendo distribuição normal.



RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ASPECTOS GERAIS DO SÊMEN

O sêmen de *E. m. orinus* apresentou coloração variando de branco a amarelo claro e consistência espessa. Foram obtidas amostras viáveis de sêmen dos cinco indivíduos avaliados. A biometria e as médias gerais de todos os parâmetros seminais para a espécie estão expressas na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP), valores mínimos e máximos referentes aos parâmetros seminais de *Erythrolamprus miliaris orinus* (n = 5).

	Média \pm DP	Mínimo e Máximo
CRC (mm)	611,25 \pm 55,71	480 e 730
Massa (g)	157,10 \pm 19,59	71 e 276
Volume (μ L)	3,68 \pm 1,51	1,05 e 12,60
Motilidade (%)	50 \pm 7,48	20 e 70
Motilidade Progressiva (escala de 0 - 5)	2,95 \pm 0,66	1 e 4
Concentração ($\times 10^9$ espermatozoides/ mL)	0,45 \pm 0,18	0,24 e 0,62

Fonte: Tatiane Caroline de Lima (2022).

4.1.1 Avaliação da sazonalidade dos parâmetros seminais

Durante as estações climáticas os parâmetros seminais foram avaliados de forma subjetiva sempre pelo mesmo avaliador. Na tabela a seguir (Tabela 2), estão expressos os valores médios e desvio padrão obtidos dos parâmetros seminais de acordo com as estações do ano.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP) dos parâmetros seminais avaliados em machos adultos de *Erythrolamprus miliaris orinus* mantidos *ex situ* de acordo com as estações climáticas.

	Verão (n= 5) Média \pm DP	Outono (n= 5) Média \pm DP	Inverno (n= 5) Média \pm DP	Primavera (n= 5) Média \pm DP
Volume (μ L)	5,88 \pm 4,04 ^a	3,36 \pm 1,88 ^a	2,94 \pm 2,61 ^a	2,52 \pm 1,20 ^a
Motilidade (%)	40,00 \pm 22,36 ^a	52,00 \pm 17,89 ^a	58,00 \pm 13,04 ^a	50,00 \pm 23,45 ^a
Motilidade Progressiva (escala de 0-5)	2,00 \pm 1,00*	3,40 \pm 0,55*	3,40 \pm 0,89*	3,00 \pm 1,00*
Concentração (X 10 ⁹ ptz/mL)	0,58 \pm 0,13 ^a	0,62 \pm 0,22 ^a	0,24 \pm 0,16 ^b	0,36 \pm 0,19 ^{a,b}

Fonte: Tatiane Caroline de Lima (2022).

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

(*) Dados que apresentaram distribuição não paramétrica.

Na análise dos parâmetros seminais, foi observado diferença significativa na concentração (ANOVA, $F = 4,962$; $p = 0,013$) entre a estação do inverno com o verão (post-hoc Turkey, $p = 0,041$), e do inverno com outono (post-hoc Turkey, $p = 0,020$). Os parâmetros seminais referentes ao volume (ANOVA, $F = 1,621$; $p = 0,224$) e motilidade (dados transformados por Log – ANOVA, $F = 1,016$; $p = 0,411$) não obtiveram diferenças significativas. Motilidade progressiva não obteve distribuição paramétrica.

4.1.2 Morfologia espermática

A avaliação da morfologia espermática foi realizada em cinco indivíduos de *E. m. orinus* durante as quatro estações do ano de 2021.

O espermatozoide de *E. m. orinus* é filiforme com comprimento total médio de 175,07 μ m \pm 6,63 (desvio padrão) e divide-se em três regiões: cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 5). A cabeça é a menor estrutura da célula espermática com comprimento médio de 15,75 μ m \pm 2,10, a peça intermediária é a estrutura mais longa com comprimento médio de 116,27 μ m \pm 5,47 e a cauda obteve comprimento médio de 43,23 μ m \pm 0,45.

Figura 5 – Espermatozoides de *Erythrolamprus miliaris orinus* sob microscopia de contraste de fase.

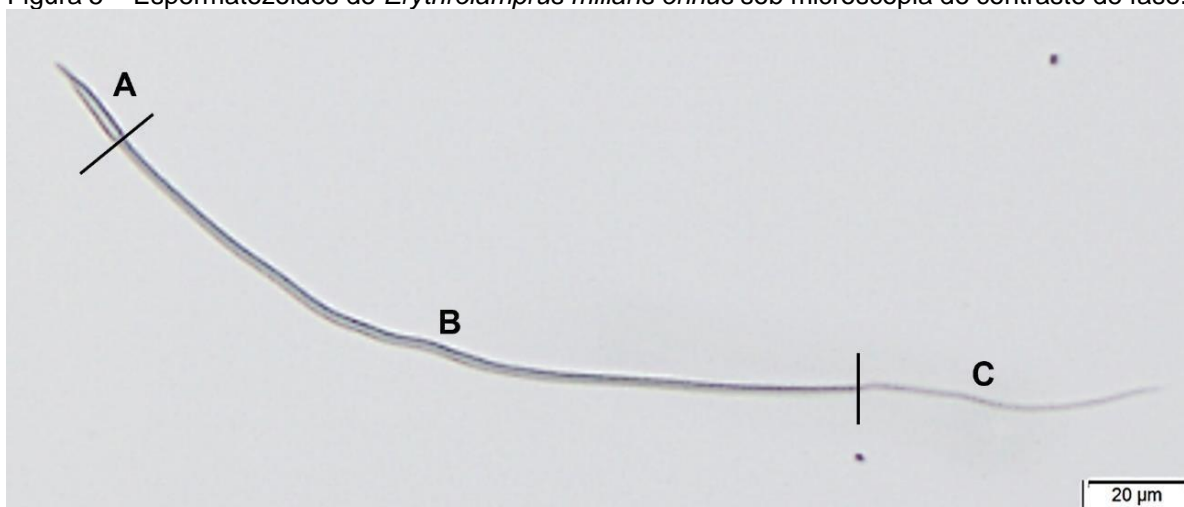


Foto: Tatiane Caroline de Lima (2021).

Legenda: A) cabeça, B) peça intermediária e C) cauda.

Em relação à presença de alterações morfológicas nos espermatozoides avaliados, foram encontradas alterações durante as quatro estações do ano com maior média na primavera. Dentre os defeitos encontrados, a peça intermediária foi a região mais acometida, seguida das alterações na cauda (Tabela3).

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP) das alterações da morfologia das células espermáticas encontradas no sêmen de machos adultos (n = 5) de *Erythrolamprus miliaris orinus* mantidos *ex situ* nas quatro estações climáticas.

	Defeitos de cabeça (%)	Defeitos de peça intermediária (%)	Defeitos de cauda (%)	Total de células defeituosas (%)	Total de células normais (%)
Verão	2 \pm 1,41	27,20 \pm 3,11	16,20 \pm 4,55	44,20 \pm 5,67	55,80 \pm 5,67
Outono	0 \pm 0	24,00 \pm 4,00	15,00 \pm 3,39	39,00 \pm 6,28	61,00 \pm 6,28
Inverno	2,5 \pm 2,12	27,60 \pm 2,19	18,60 \pm 2,70	47,20 \pm 5,07	52,80 \pm 5,07
Primavera	0 \pm 0	25,00 \pm 4,06	23,00 \pm 5,83	48,00 \pm 8,75	52,00 \pm 8,75

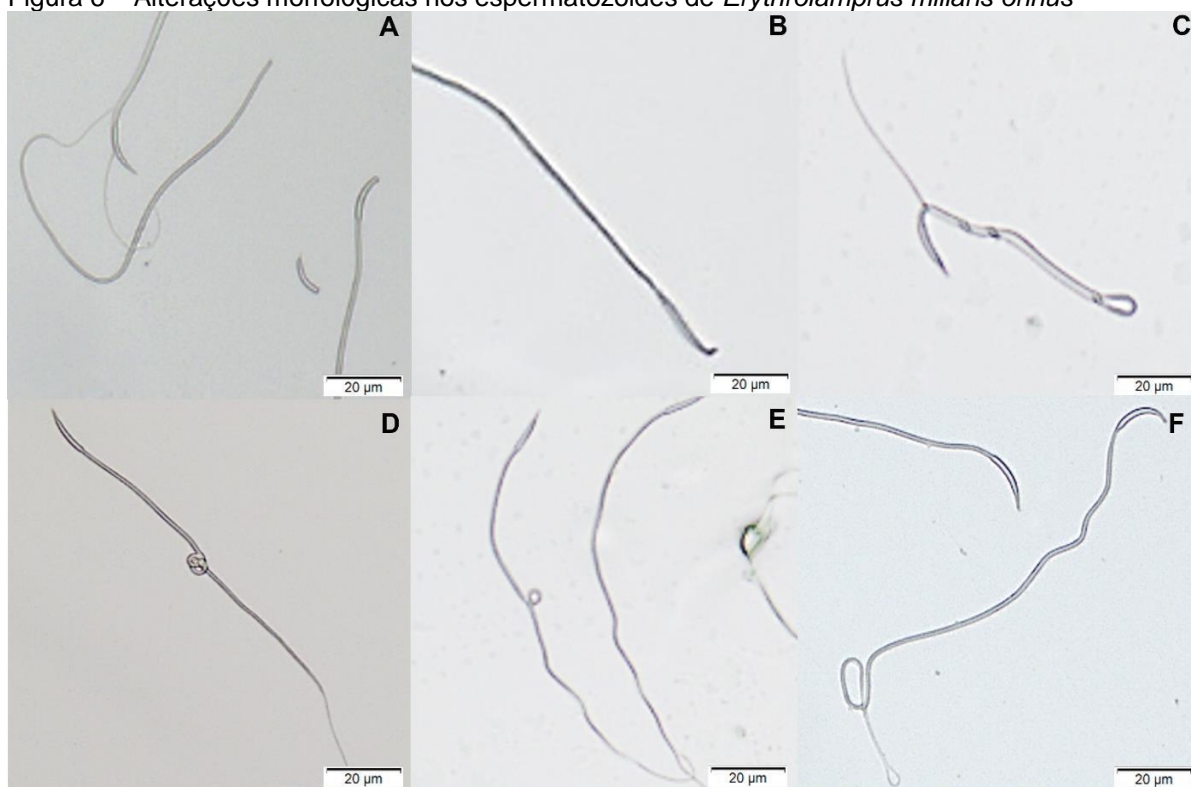
Fonte: Tatiane Caroline de Lima (2022).

As alterações mais comuns encontradas em todas as amostras colhidas ao longo das quatro estações do ano (n = 2.000 células espermáticas) foram: enrolamento da peça intermediária e cauda enrolada (Tabela 4 e Figura 6).

Tabela 4 – Alterações morfológicas encontradas no material seminal de *Erythrolamprus miliaris orinus* (n = 2.000 células espermáticas).

	Alterações	(%)
Cabeça	Acrossoma dobrado	0,05
	Decapitada	0,40
Peça intermediária	Dobrada	6,80
	Enrolada	19,15
Cauda	Dobrada	6,40
	Enrolada	11,00
	Enrolada na porção terminal	0,07
	Fortemente enrolada	0,10

Figura 6 – Alterações morfológicas nos espermatozoides de *Erythrolamprus miliaris orinus*



Fonte: Tatiane Caroline de Lima (2022).

Legenda: A) Espermatozoide com cabeça decapitada; B) Acrossoma dobrado; C, D e E) Peça intermediária enrolada; F) Cauda enrolada.

4.1.3 Análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo

Na avaliação quantitativa, as células espermáticas receberam a sonda fluorescente Rodamina-123, e somente as células que apresentaram algum grau de viabilidade foram marcadas e contabilizadas pelo citômetro de fluxo. Foi possível realizar a análise por citometria de fluxo nas estações de verão, outono e primavera nos cinco indivíduos, e no inverno foi possível processar amostra somente de três indivíduos (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão (Média \pm DP) da análise do potencial elétrico da membrana plasmática nos espermatozoides de *E. m. orinus*, durante as estações climáticas.

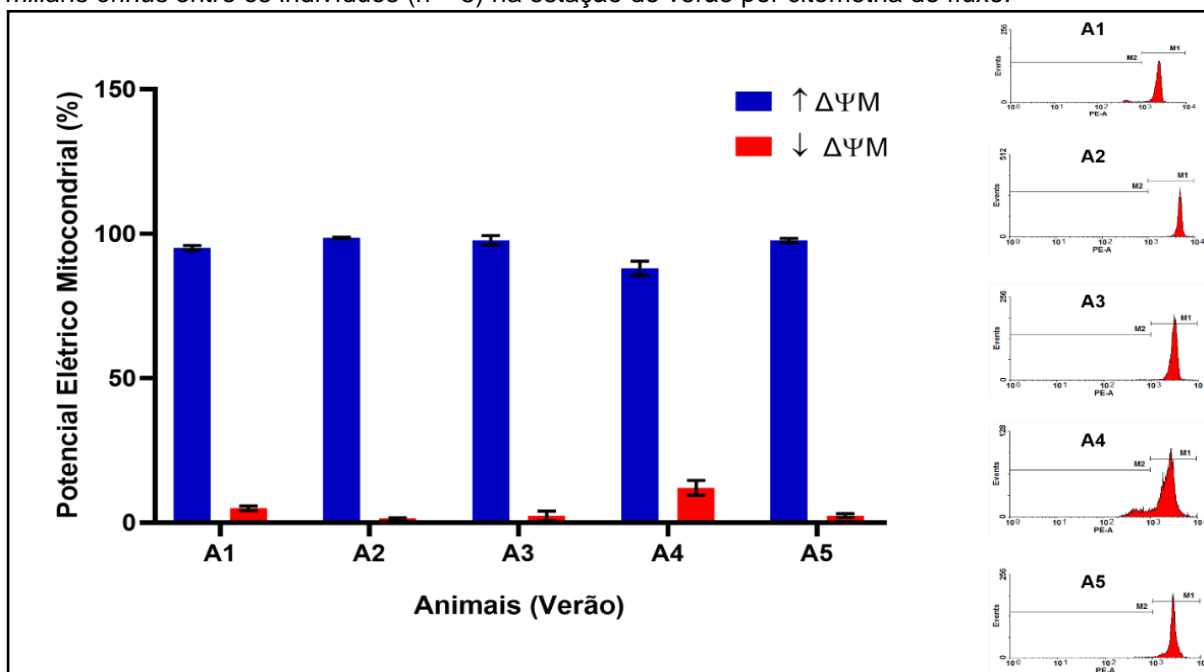
Estação	Espermatozoides totais	Espermatozoides viáveis Média \pm DP	Espermatozoides viáveis (%)
Verão (n= 5)	6.315 \pm 792,67	6.019 \pm 711,15	95,52 \pm 5,54
Outono (n= 5)	6.356 \pm 3723,52	6.193 \pm 3.625, 97	97,90 \pm 1,22
Inverno (n= 3)	2.990 \pm 3062,10	2.373 \pm 2.864,13	62,12 \pm 34,41
Primavera (n= 5)	4.593 \pm 3779,05	4.435 \pm 3.705,62	97,40 \pm 3,55

Fonte: Tatiane Caroline de Lima (2022).

A menor média de potencial elétrico mitocondrial das células espermáticas foi obtido na estação do inverno com percentual médio de 62,12%, representado por total de 2.373 células viáveis. A estação que as amostras obtiveram maior média de potencial elétrico mitocondrial nas células espermática foi na estação do outono com 97,90%, representado por total médio de 6.193 células espermáticas viáveis encontradas.

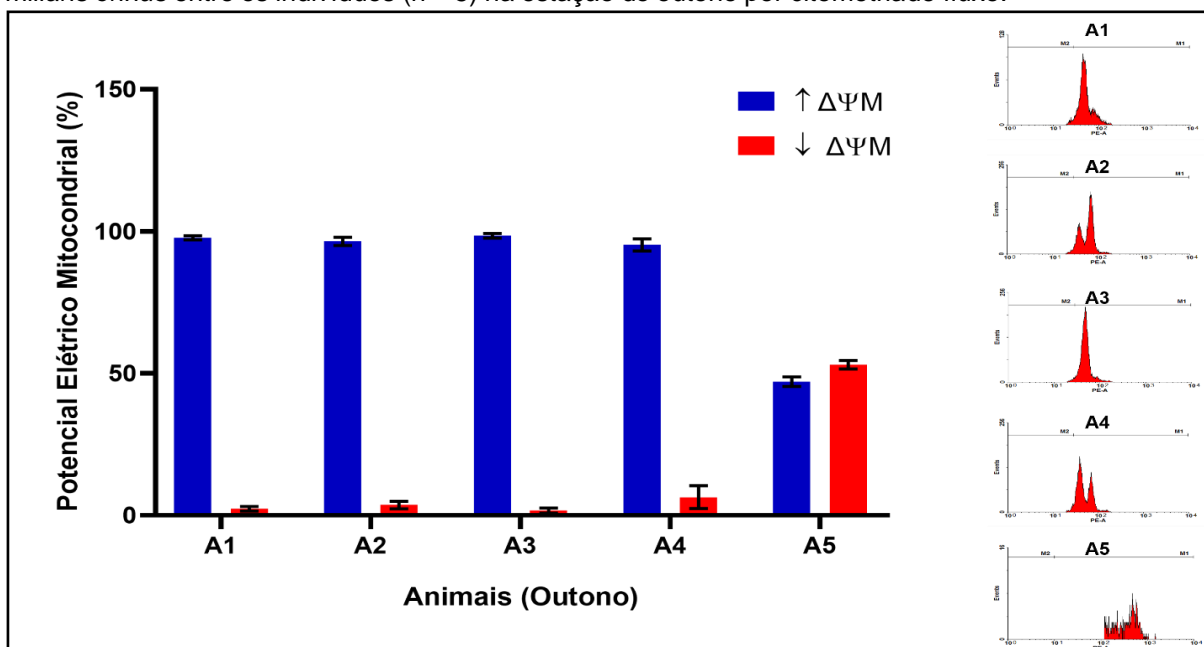
As figuras a seguir (Figura 7, 8, 9 e 10), demonstram as porcentagens do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células espermáticas da *E. m. orinus* durante cada estação.

Figura 7 - Análise do potencial elétrico mitocondrial nas células espermáticas de *Erythrolamprus miliaris orinus* entre os indivíduos (n = 5) na estação do verão por citometria de fluxo.



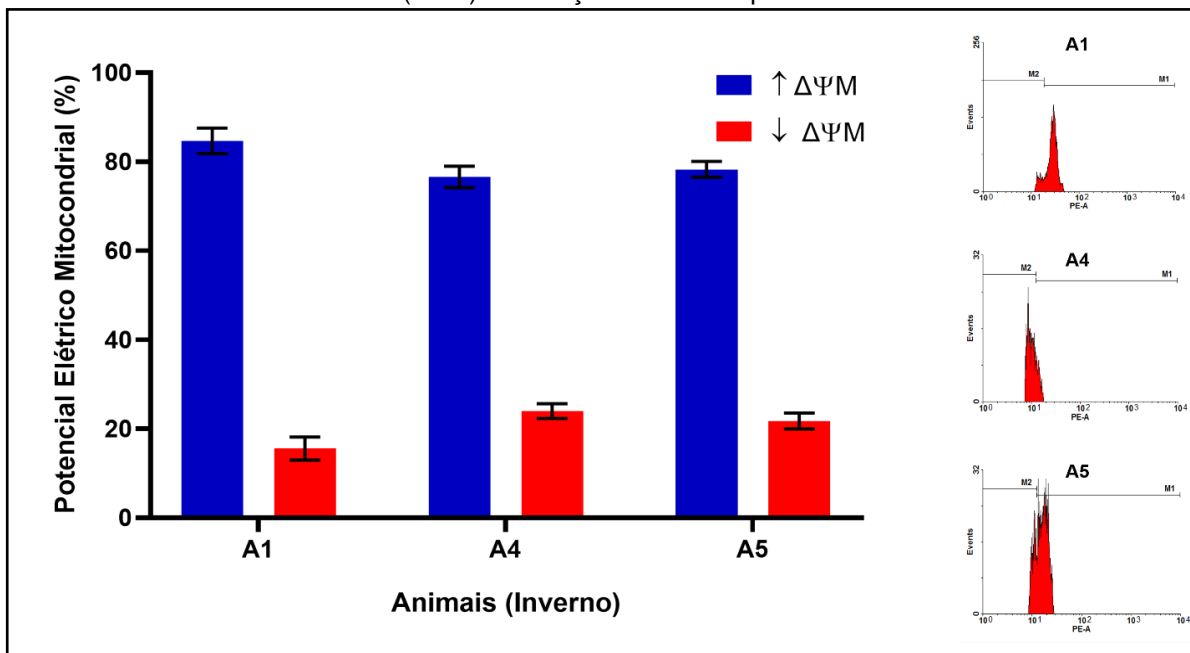
Legenda: gráficos de barras e linha mostrando $\Delta\Psi_m$ dos espermatozoides de cinco indivíduos. Barra azul representa mitocôndrias com alto potencial elétrico mitocondrial e a barra vermelha, indica os espermatozoides que foram detectados com baixo potencial elétrico mitocondrial. Histogramas representam a distribuição das células quanto a quantidade de células espermáticas e $\Delta\Psi_m$ no verão.

Figura 8 - Análise do potencial elétrico mitocondrial nas células espermáticas de *Erythrolamprus miliaris orinus* entre os indivíduos (n = 5) na estação do outono por citometria de fluxo.



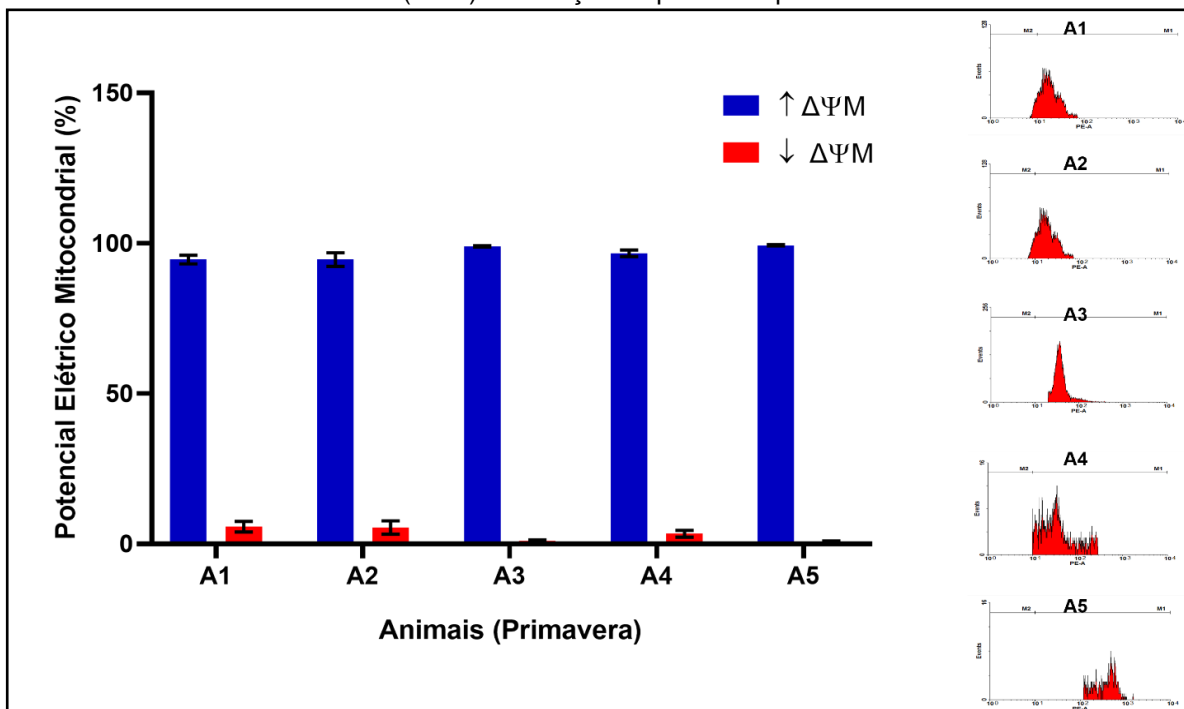
Legenda: gráficos de barras e linha mostrando $\Delta\Psi_m$ dos espermatozoides de cinco indivíduos. Barra azul representa mitocôndrias com alto potencial elétrico mitocondrial e a barra vermelha, indica os espermatozoides que foram detectados com baixo potencial elétrico mitocondrial. Histogramas representam a distribuição das células quanto a quantidade de células espermáticas e $\Delta\Psi_m$ no outono.

Figura 9 - Análise do potencial elétrico mitocondrial nas células espermáticas de *Erythrolamprus miliaris orinus* entre os indivíduos (n = 5) na estação do inverno por citometria de fluxo.



Legenda: gráficos de barras e linha mostrando $\Delta\Psi_m$ dos espermatozoides de três indivíduos. Barra azul representa mitocôndrias com alto potencial elétrico mitocondrial e a barra vermelha, indica os espermatozoides que foram detectados com baixo potencial elétrico mitocondrial. Histogramas representam a distribuição das células quanto a quantidade de células espermáticas e $\Delta\Psi_m$ no inverno.

Figura 10 - Análise do potencial elétrico mitocondrial nas células espermáticas de *Erythrolamprus miliaris orinus* entre os indivíduos (n = 5) na estação da primavera por citometria de fluxo.



Legenda: gráficos de barras e linha mostrando $\Delta\Psi_m$ dos espermatozoides de cinco indivíduos. Barra azul representa mitocôndrias com alto potencial elétrico mitocondrial e a barra vermelha, indica os espermatozoides que foram detectados com baixo potencial elétrico mitocondrial. Histogramas representam a distribuição das células quanto a quantidade de células espermáticas e $\Delta\Psi_m$ na primavera.

4.1.4 Avaliação morfológica por microscopia confocal a laser

Na microscopia confocal a laser foi realizada a avaliação qualitativa, através de fotomicrografias dos espermatozoides com suas estruturas marcadas com fluorocromos específicos nos cinco exemplares de *Erythrolamprus miliaris orinus*, durante as quatro estações do ano: verão (Figura 11), outono (Figura 12), inverno (Figura 13) e primavera (Figura 14).

A estrutura em vermelho representa as mitocôndrias ativas marcadas com MitoRed na peça intermediária e na cauda, mostrando que há maior intensidade de fluorescência emitida pela célula, indicando grande quantidade de mitocôndrias ativas e íntegras presentes na célula espermática.

A estrutura em azul representa os ácidos nucleicos na cabeça da célula espermática marcados com DAPI (4'.6-Diamidino-2-fenilindoldicloridrato), indicando que esse fluorocromo se ligou nas regiões com fitas de DNA íntegras ou fragmentadas, deixando o núcleo da célula fluorescente em azul.

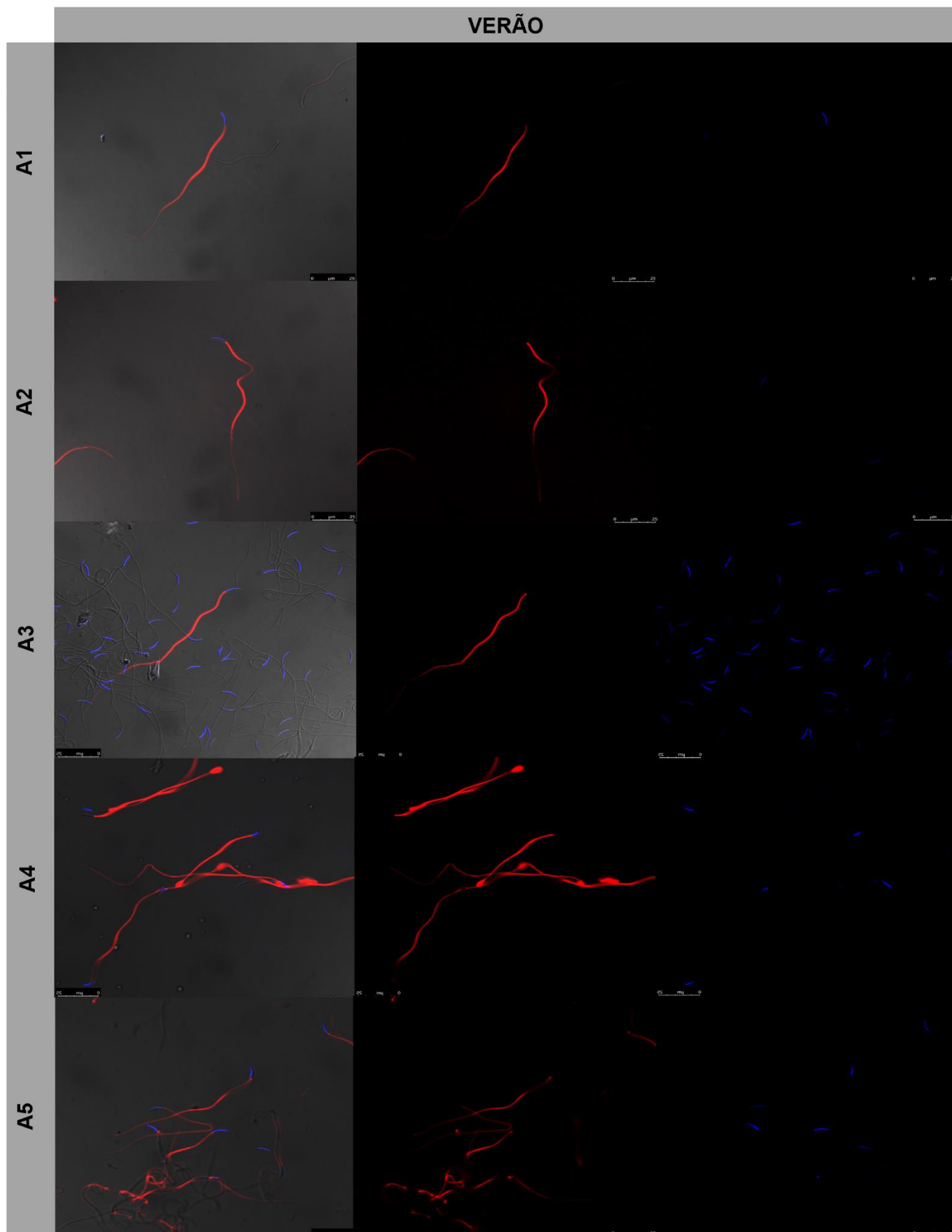


Figura 11 – Fotomicrografias representativas das células espermáticas da serpente *Erythrolamprus miliaris orinus* no verão com A) mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRed) e núcleos marcados em azul (DAPI), analisadas por microscopia confocal a laser.

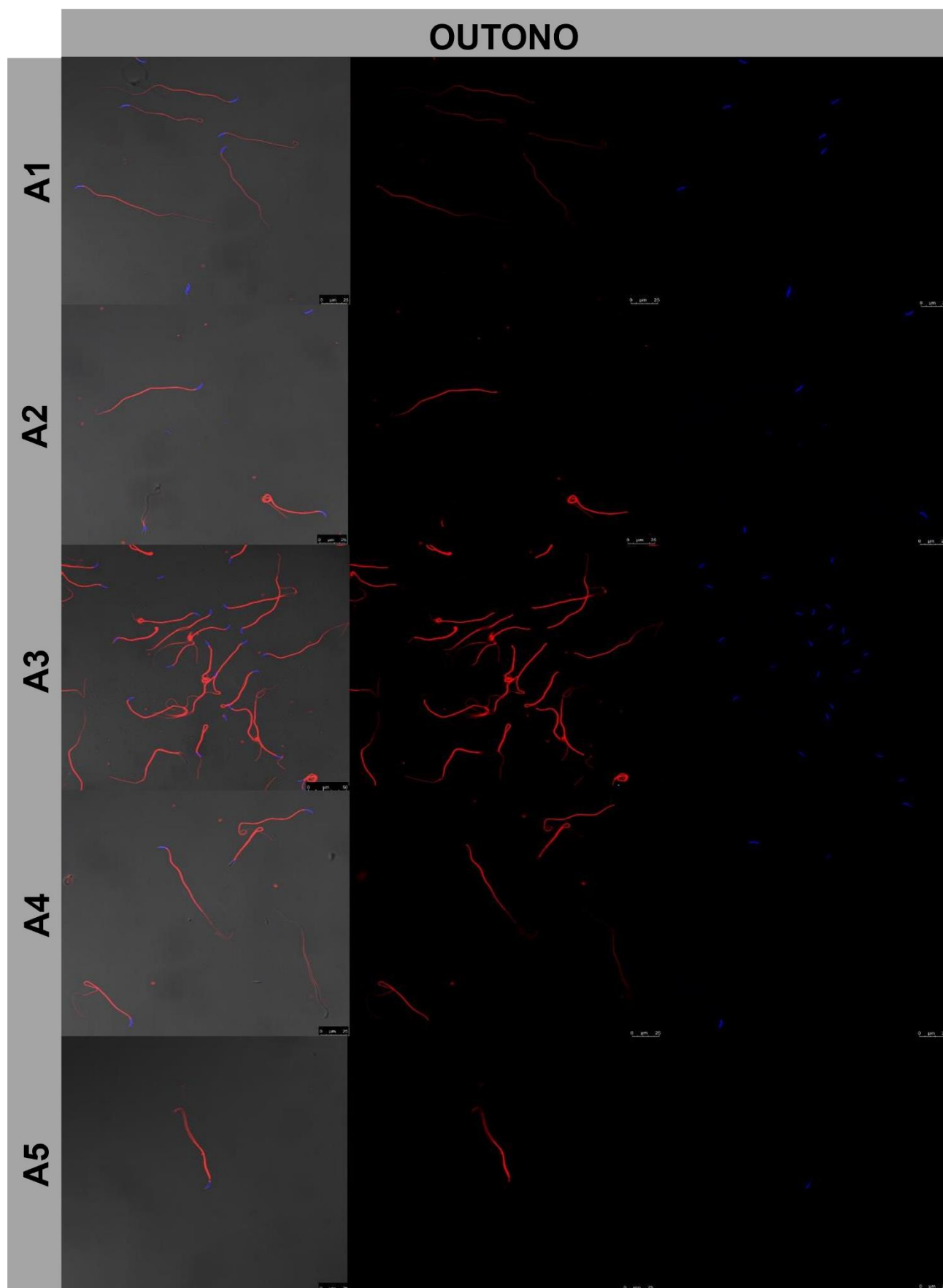


Figura 12 – Fotomicrografias das células espermáticas da serpente *Erythrolamprus miliaris orinus* no outono com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRed) e núcleos marcados em azul (DAPI), analisadas por microscopia onfocal a laser.

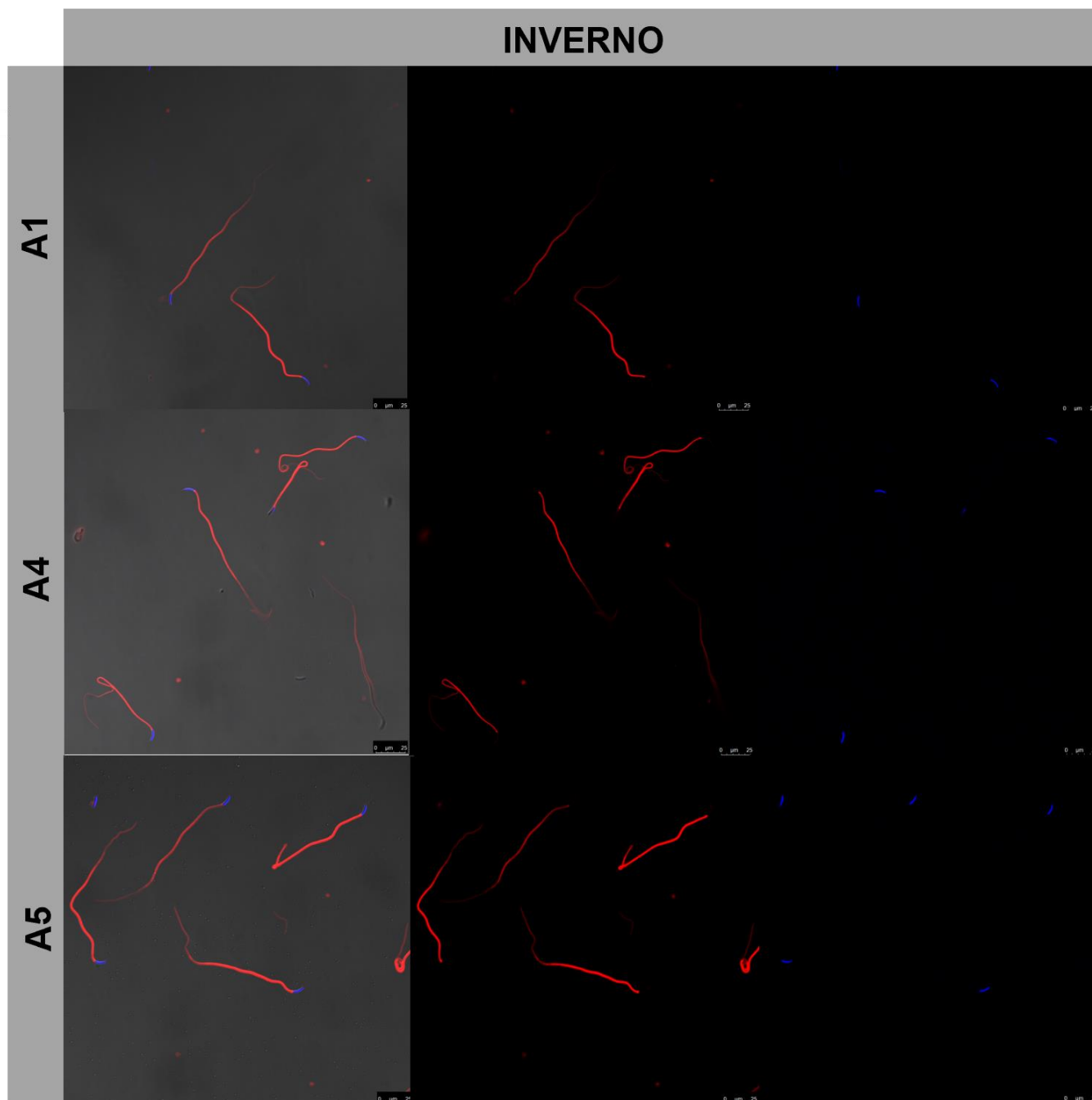


Figura 13 – Fotomicrografias das células espermáticas da serpente *Erythrolamprus miliaris orinus* no inverno com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRed) e núcleos marcados em azul (DAPI), analisadas por microscopia confocal a laser.

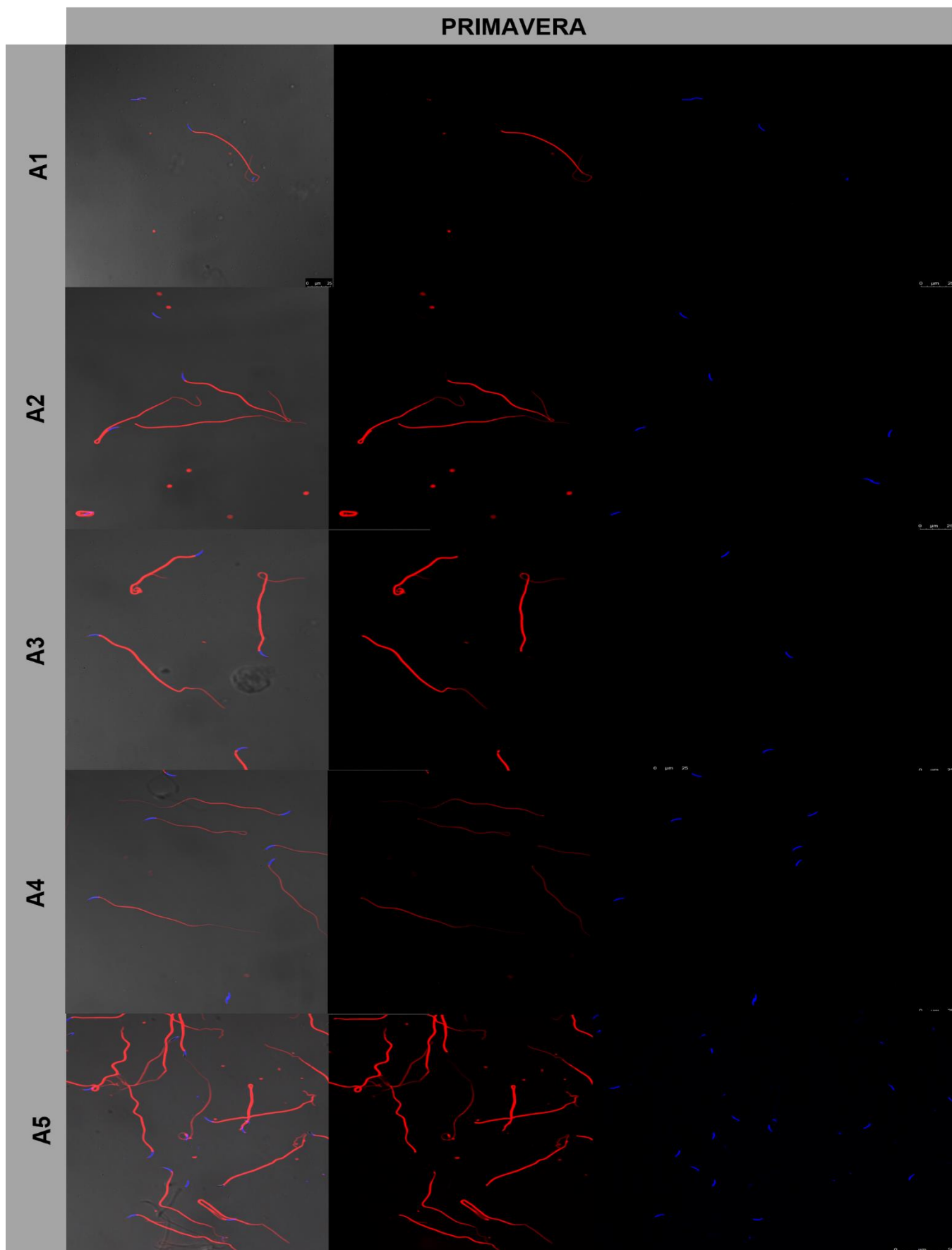
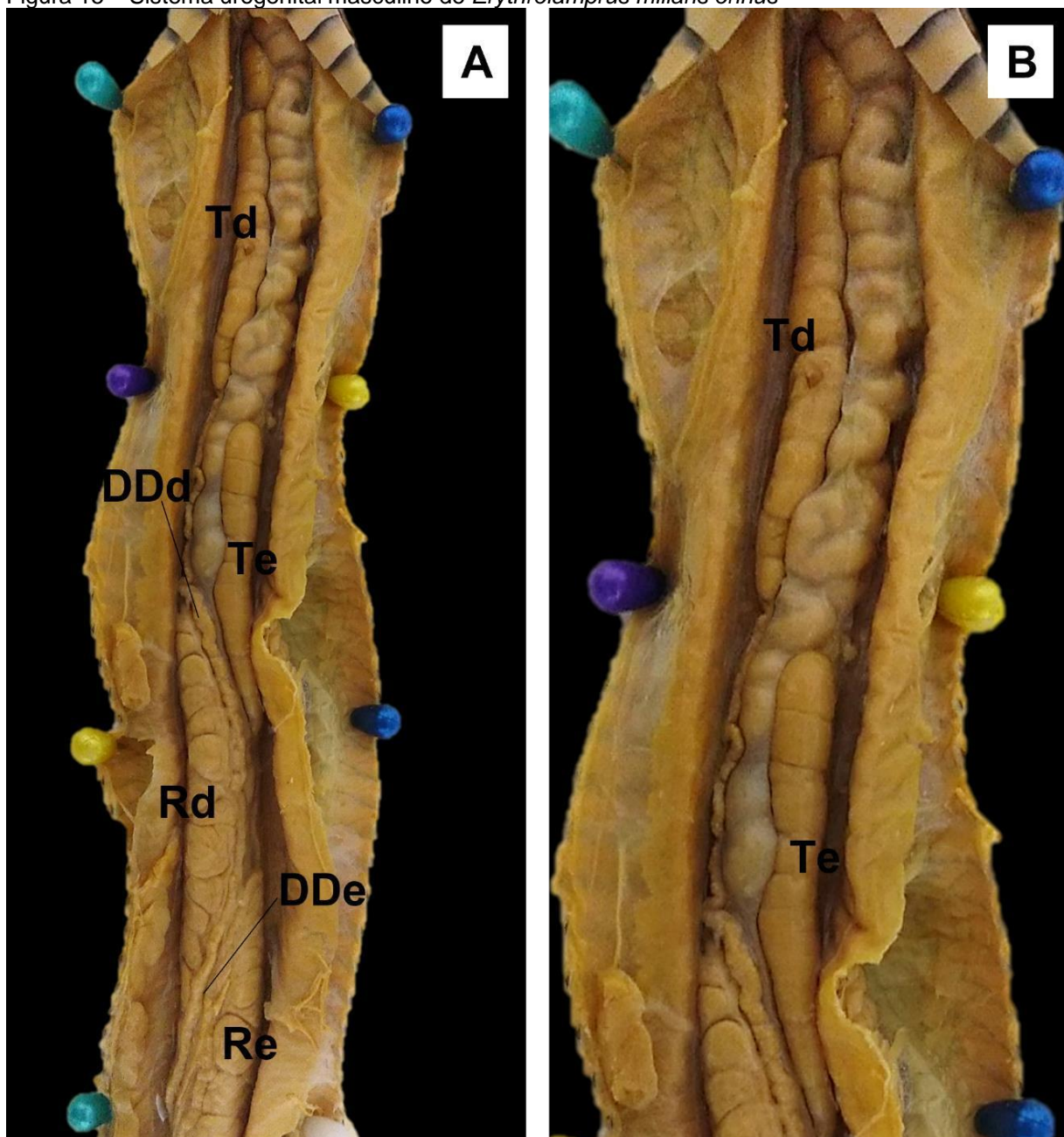


Figura 14 – Fotomicrografias das células espermáticas da serpente *Erythrolamprus miliaris orinusna* primavera com mitocôndrias marcadas em vermelho (MitoRed) e núcleos marcados em azul (DAPI), analisadas por microscopia confocal a laser.

4.2 CICLO ESPERMATOGÊNICO

Os testículos de *E. m. orinus* apresentam formato alongado e cilíndrico, sendo o testículo direito mais cranial em relação ao esquerdo e estão localizados no terço caudal da cavidade celomática, como descrito para as serpentes (Figura 15).

Figura 15 – Sistema urogenital masculino de *Erythrolamprus miliaris orinus*



Fonte: Tatiane Caroline de Lima (2022).

Legenda: A e B) Td = testículo direito; Te = testículo esquerdo; DDd = ducto deferente direito; De = ducto deferente esquerdo; Rd = rim direito, Re = rim esquerdo.

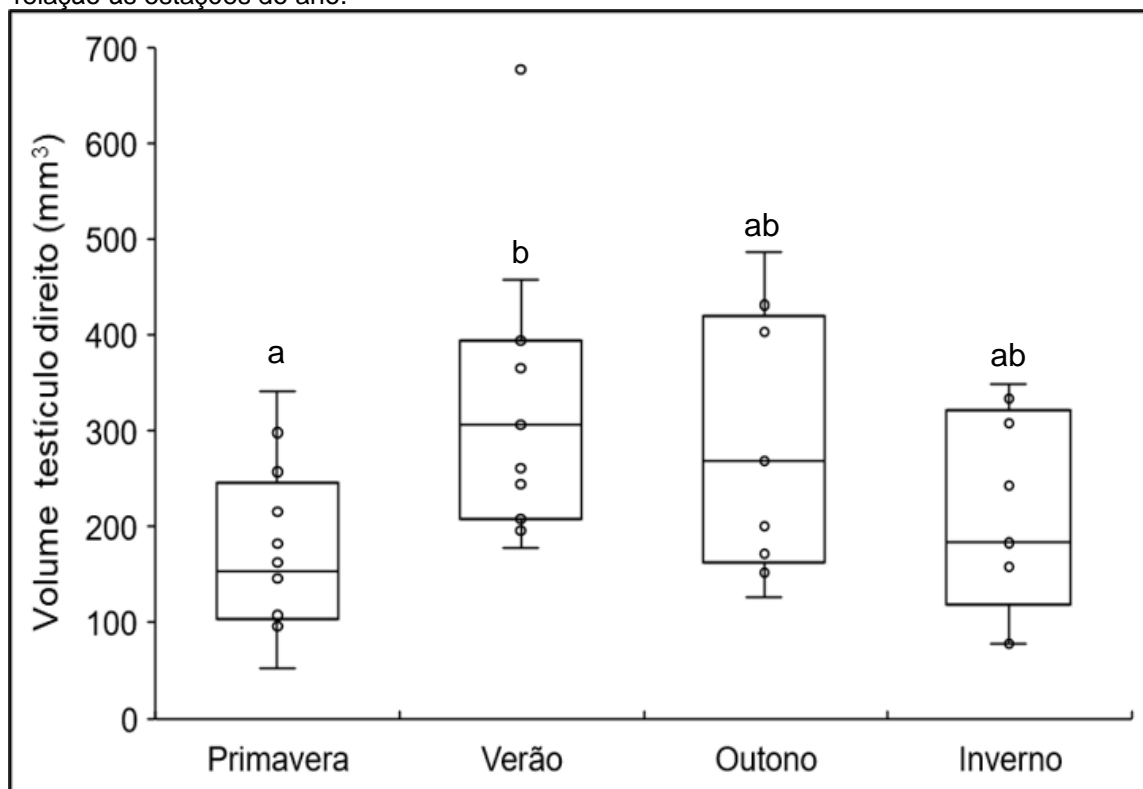
4.2.1 Análise macroscópica dos testículos

O testículo de *E. m. orinus* apresenta variação significativa entre as médias do volume direito (ANCOVA, $F = 3,265$; $p = 0,032$) entre as estações primavera e verão (*post-hoc Sidak*, $p = 0,026$) (Figura 16). Para o volume total, foi obtida diferença significativa (ANCOVA, $F = 3,265$; $p = 0,032$) entre as estações de primavera e verão (*post-hoc Sidak*, $p = 0,045$) (Figura 17).

Para o volume testicular e o CRC, foi obtido uma correlação moderada [$F(1,39) = 11,505$; $p = 0,002$; $R^2 = 0,228$] (Figura 18).

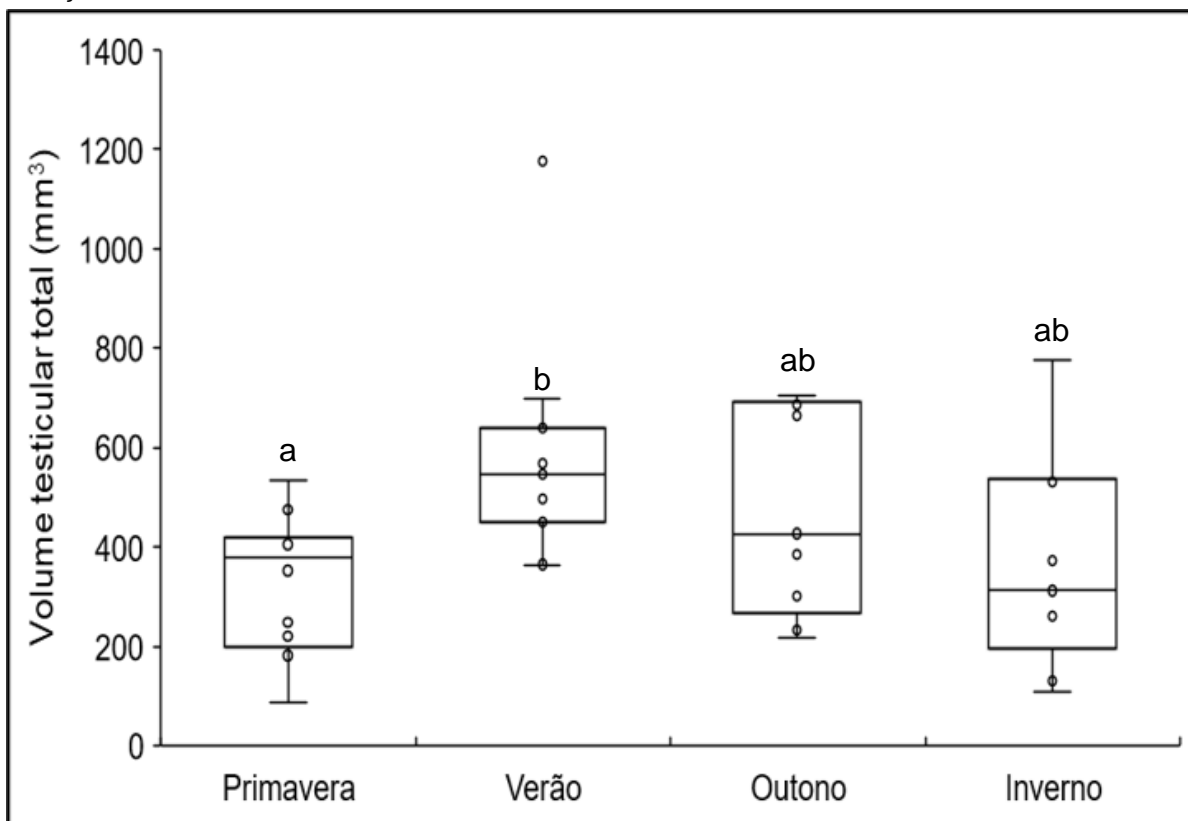
No índice gonadossomático não houve variação significativa entre as estações (ANOVA, $F = 1,194$; $p = 0,326$).

Figura 16 – Distribuição do volume testicular direito de *Erythrolamprus miliaris orinus* em relação às estações do ano.



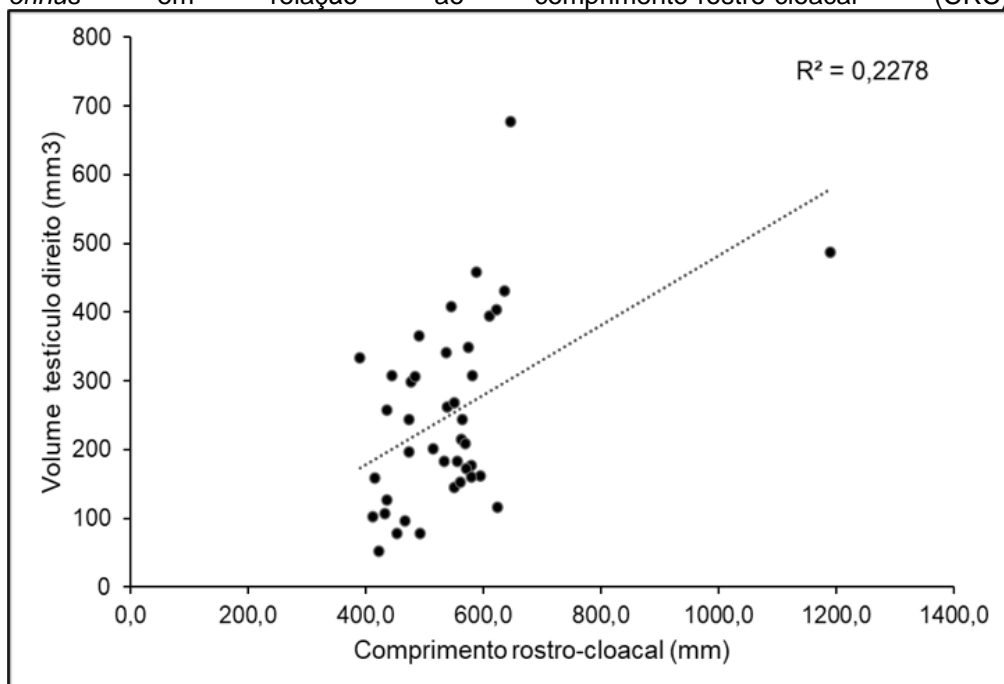
Legenda: gráfico box-plot com a distribuição dos dados de volume do testículo direito, referente aos espécimes de *Erythrolamprus miliaris orinus*. As letras indicam as diferenças estatísticas pelo teste de ANCOVA, sendo considerado $p < 0,05$.

Figura17 – Variação do volume testicular total de *Erythrolamprus miliaris orinus* em relação às estações do ano.



Legenda: gráfico box-plox com a distribuição dos dados de volume testicular total, referente aos espécimes de *Erythrolamprus miliaris orinus*. As letras indicam as diferenças estatísticas pelo teste de ANCOVA, sendo considerado $p < 0,05$.

Figura 18 – Distribuição do volume testicular direito de *Erythrolamprus miliaris orinus* em relação ao comprimento-rostro-cloacal (CRC)



4.2.2 Análise microscópica dos testículos

Na análise qualitativa dos túbulos seminíferos foram avaliados os estágios do ciclo espermatogênico da espécie (Quadro 2). O estágio I (Figura 19A), referente à regressão completa do epitélio germinativo, foi observado nos meses de julho a setembro (inverno). Nesse estágio, os indivíduos exibiam de uma a três camadas de células (espermatogônias e espermatócitos) e o espaço luminal apresentava-se vazio ou com alguns espermatozoides residuais. O início da recrudescência (estágio II) (Figura 19C) foi identificado em outubro (primavera). Os indivíduos exibiam o epitélio germinativo com aproximadamente oito camadas de células, entre espermatogônias, espermatócitos e espermátides indiferenciadas. Não foi encontrado nenhum exemplar exibindo o estágio III de recrudescência.

O início da espermiogênese (IV) (Figura 20A) foi observado em alguns túbulos seminíferos de exemplares coletados em fevereiro (verão), em que foi possível identificar a presença de espermátides primárias e secundárias, e o início da diferenciação da cabeça do espermatozoide. Na análise de diferentes campos da lâmina histológica, foi possível identificar a transição do estágio IV para V, no qual observa-se formação da cauda do espermatozoide.

O estágio V (Figura 20B), referente a espermiogênese, foi observado entre os meses de outubro a abril (primavera e verão) (Figura 20D), e em um único indivíduo, foi possível observar no mês de junho (final do outono).

O início da regressão (estágio VI) foi identificado de fevereiro a junho, no qual os exemplares apresentaram alguns feixes de espermiogênese e o epitélio germinativo exaurido com três camadas de células (Figura 20C).

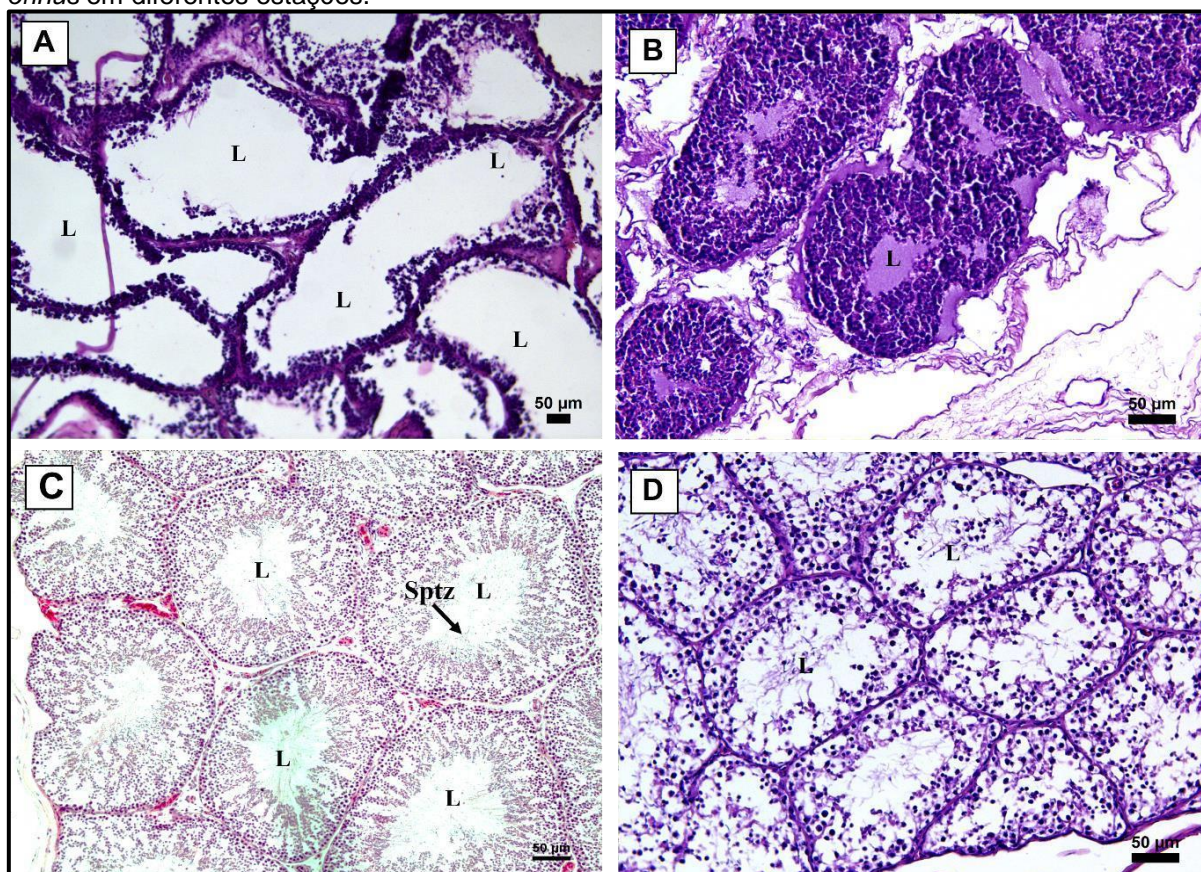
Quadro 2 – Estágios do ciclo espermatogênico em *Erythrolamprus miliaris orinus* no Sul e Sudeste do Brasil.

Estágios	Meses de ocorrência
I - Regressão completa: túbulos revestidos por espermatogônias e células de Sertoli.	julho a setembro (inverno)
II - Início da recrudescência: divisão das espermatogônias e espermatócitos primários.	outubro (primavera)
III - Recrudescência tardia: espermatídes primárias e espermatócitos.	outubro a novembro* (primavera)
IV - Espermiogênese inicial: espermatídes em metamorfose.	Fevereiro (verão)
V - Espermiogênese: espermatozoides maduros no lúmen.	Outubro a abril (primavera e verão)
VI - Regressão inicial: epitélio germinativo reduzido.	Fevereiro a junho (verão e outono)

Fonte: Adaptado de GOLDBERG; PARKER (1975).

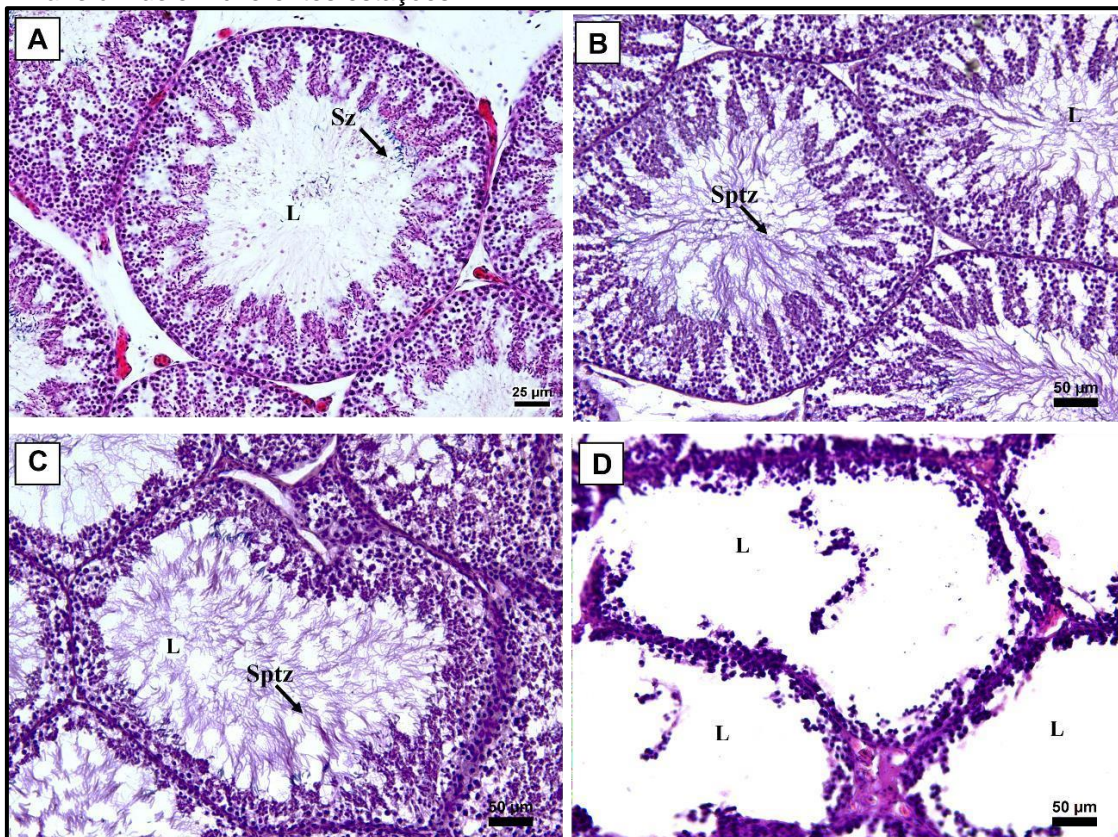
Legenda: (*) = provável período de ocorrência.

Figura 19 – Cortes histológicas transversais e longitudinais de testículos de *Erythrolamprus miliaris orinus* em diferentes estações.

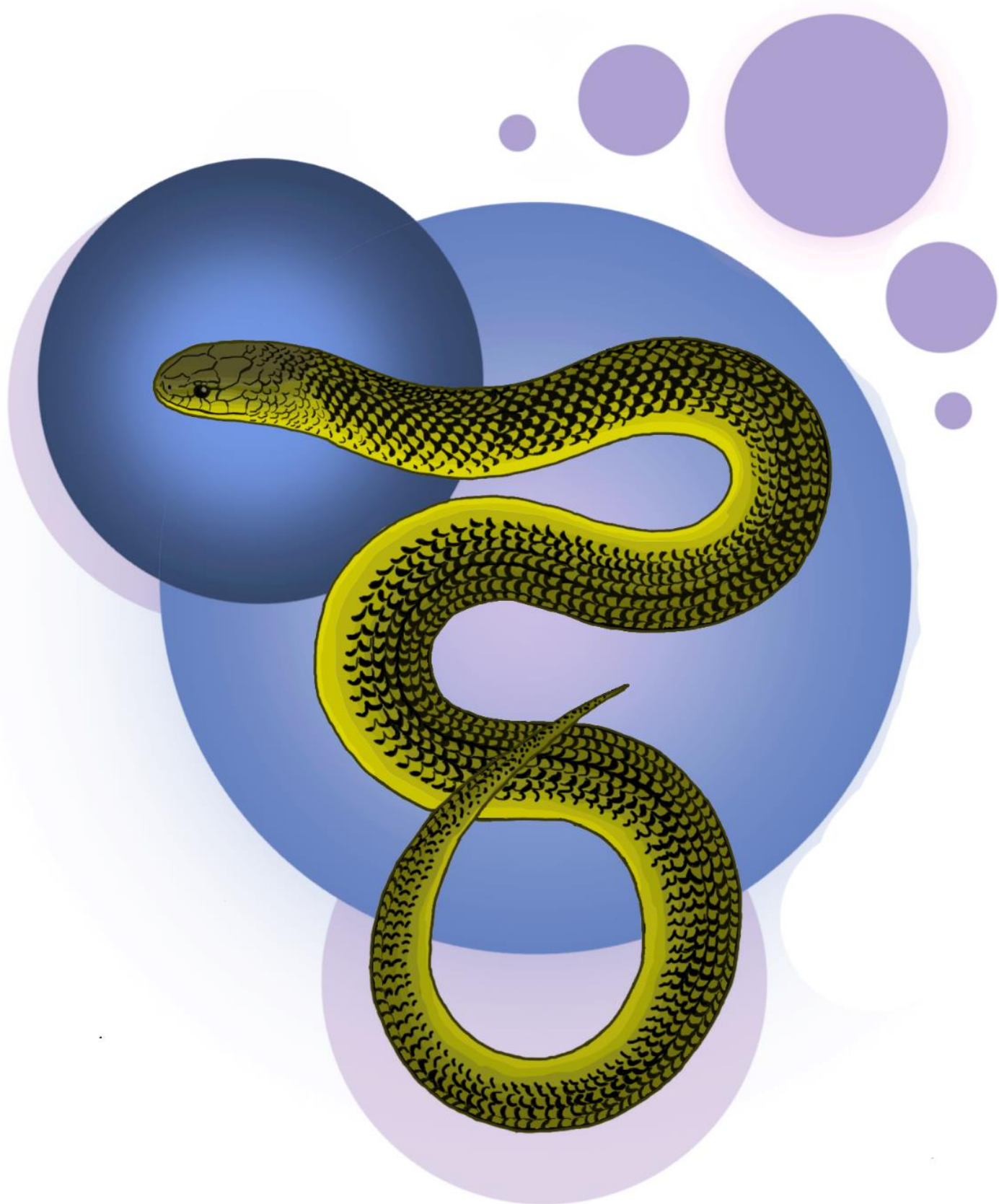


Legenda: Fotomicrografia do túbulo seminífero em *Erythrolamprus miliaris orinus*. A) Outono - espécime em transição do estágio VI para I, de regressão completa (inverno); B) Inverno - estágio I, espécime apresentando quiescência do epitélio germinativo; C) Primavera - recrudescência do epitélio germinativo, exemplar apresentando aumento do epitélio, porém sem diferenciação das espermatídes primária e secundária; D) Verão - estágio V espermiogênese. (L) lúmen. (Sptz) espermatozoide.

Figura 20 – Cortes histológicos transversais e longitudinais de testículos de *Erythrolamprus miliaris orinus* em diferentes estações.



Legenda: Fotomicrografia do túbulo seminífero em *Erythrolamprus miliaris orinus*. **A)** Verão - Espécime em espermiogênese (transição estágio IV para V); **B)** Verão - estágio V, exemplar apresentando maior quantidade de espermatozoides no espaço luminal **C)** Outono - início de regressão (estágio VI) epitélio germinativo com 3-4 camadas de células; **D)** Inverno - regressão total do epitélio germinativo, ausência de espermatozoides no lúmen (l). **(L)** lúmen. **(Sptz)** espermatozoide.



DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A análise das características do sêmen é uma ferramenta inicial, simples e essencial para avaliar o potencial reprodutivo dos machos dentro de um programa de reprodução (MENGDEN *et al.*, 1980, LANGLADA *et al.*, 1994; TOURMENTE *et al.*, 2007; ZACARIOTTI *et al.*, 2007). Para aprimorar as técnicas de reprodução assistida, é importante estabelecer valores de parâmetros seminais das espécies de interesse.

A técnica de colheita de sêmen realizada neste estudo nos cinco exemplares de *E. m. orinus* foi minimamente invasiva, preconizada por Mengden *et al.* (1980), através de massagens digitais ventrais, e foi possível obter volume médio nas quatro estações de 3,68 μL e no outono (cópula) obteve-se 5,88 μL , sendo estes valores inferiores ao obtido por Lima (2020), que relatou a mesma técnica para a mesma subespécie nas quatro estações do ano o volume médio de 8,28 μL e no outono 20,75 μL .

Esta técnica de massagem digital ventral também foi utilizada na colheita de sêmen da serpente *Bothrops insularis* (Viperidae) (SILVA *et al.*, 2015) com associação do uso de anestesia local na região da cloaca, promovendo relaxamento e facilidade de colheita direto da papila urogenital, e obtiveram volume de 3,6 μL no outono (cópula), valor inferior ao obtido neste trabalho no período de cópula da espécie, porém, a metodologia de coleta deste trabalho, utilizou-se apenas a massagem digital ventral, visto que a cloaca da serpente *E. m. orinus* possui a cloaca relaxada naturalmente, diferente das serpentes da família Viperidae que apresentam a cloaca contraída, impossibilitando a coleta de sêmen sem o anestésico local.

Almeida-Santos *et al.* (2004) relataram para *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae) o volume seminal médio em todas as estações entre 800 μL e 1000 μL e no outono 41,73 μL (cópula), porém, a técnica empregada foi a remoção dos ductos deferentes, sendo possível coletar um volume de sêmen maior, quando comparado com a compressão dos ductos deferentes durante a massagem digital ventral. Essas diferenças de valores obtidas no volume para as diferentes espécies durante a época de cópula, podem estar relacionadas com a técnica de colheita utilizada, mesmo sendo a mesma técnica, os indivíduos que colheram o material seminal são

diferentes.

O valor médio da motilidade progressiva espermática do sêmen de *E. m. orinus* neste estudo referente as estações do ano foi de 2,95 (escala de 0-5) e motilidade 50%, valores próximos das médias obtidos por Lima (2020) para a mesma espécie, motilidade progressiva média (2,80), motilidade média (57,64%). Já na estação de cópula (outono) a motilidade progressiva neste estudo foi de 3,40 e motilidade 52% e Lima (2020) obteve 80% de motilidade espermática e 4 de motilidade progressiva. Esta diferença nas motilidades pode estar relacionada com o manejo da dieta ofertada, no qual Lima (2022) alimentava as serpentes semanalmente e neste presente estudo, os animais foram alimentados a cada quinze dias. Logo a frequência alimentar é um fator primordial para a qualidade dos parâmetros seminais. Na mesma estação de cópula (outono) para *E. m. orinus*, a motilidade progressiva coincidiu com o pico do potencial elétrico mitocondrial (97,90%) e com a melhor qualidade morfológica dos espermatozoides (61% células normais), representando a alta viabilidade das células espermáticas. Para *Erythrolamprus poecilogyrus sublineatus* (Dipsadidae), foi obtido 80% de motilidade espermática na primavera (cópula) (SILVA *et al.*, 2017) e 92% de presença de células espermáticas viáveis, valor superior ao encontrado neste trabalho no outono para motilidade (52%) e morfologia espermática. Esta diferença de porcentagem na motilidade pode estar relacionado com o fato da avaliação ser subjetiva e os avaliadores serem os mesmo e/ ou relacionado com a frequência alimentar das espécies.

Os espermatozoides de *E. m. orinus* apresentam formato anatômico filiforme e possuem três regiões: cabeça, peça intermediária e cauda, seguindo o padrão geral descrito para Squamata (OLIVER *et al.*, 1996).

Na avaliação da morfologia espermática da espécie estudada neste trabalho, a estação que obteve menor porcentagem de células normais e defeituosas encontradas, foi no outono (61%) e primavera (39%), respectivamente. Dos 39% de células defeituosas, as regiões mais acometidas por defeitos são peça intermediária (24%), cauda (15%). Os defeitos da peça intermediária são peça dobrada (6,80%) e peça enrolada (19,15%) e os defeitos da cauda são cauda dobrada (6,40%), enrolada (11%), enrolada na porção terminal (0,07%) e fortemente enrolada (0,10%). Fahrig *et al.* (2007) obtiveram na avaliação morfológica da *Pantherophis guttatus* (Colubridae) no outono porcentagem de

75,7% de células normais e 24,3% de células defeituosas, sendo defeito de cauda dobrada (18,5%) e cabeça destacada (1%), já Silva(2014) para *Bothrops insularis* apresentou morfologia espermática de 54,23% de células saudáveis e 45,76% de células defeituosas na estação de inverno, das quais peça intermediária (36,61%) foi a região mais acometida, seguida dos defeitos de cauda (5,61%).

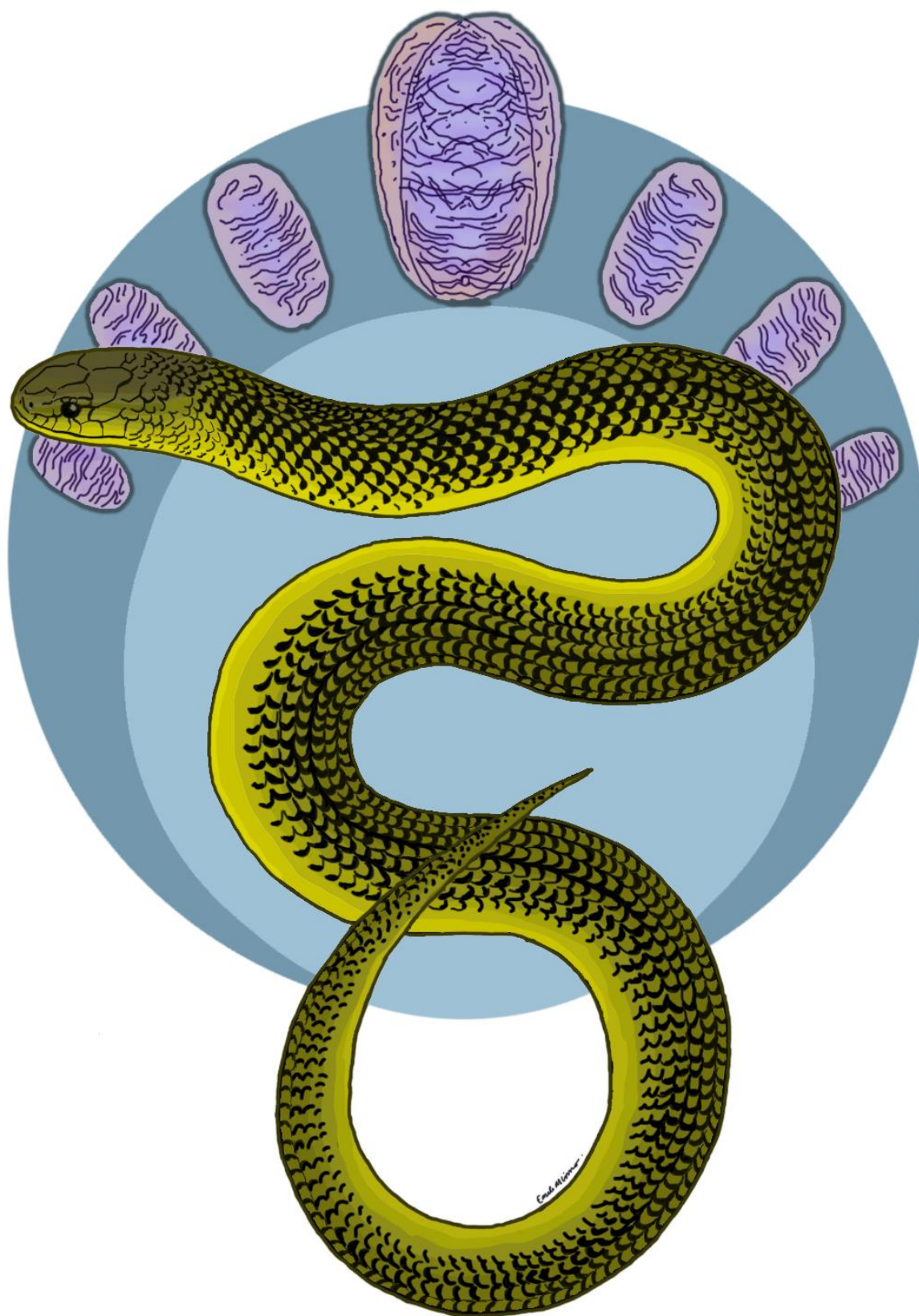
Para serpentes, existem poucas literaturas sobre alterações morfológicas das células espermáticas, apesar de ser possível observar diversas alterações morfológicas, ainda não há explicações precisas sobre o que pode gerar alterações nas células espermáticas e se essas alterações podem acontecer na produção ou na maturação dos espermatozoides, ou são alterações que ocorrem externamente, como a temperatura do ambiente interferindo na qualidade das células, composição e temperatura do meio de cultura utilizado, ou técnica utilizada na colheita do material seminal. Porém, para bovinos há estudos descrevendo as alterações patológicas na peça intermediária, como originárias dos túbulos seminíferos, interferindo diretamente na produção de energia da célula espermática (ATP), prejudicando o batimento do flagelo para a célula se deslocar e em consequência, diminuindo a motilidade espermática (CELEGHINI et al., 2007; AMARAL et al., 2009).

Na avaliação do ciclo espermatogênico de *Erythrolamprus miliaris orinus*, foi constatado que a espermiogênese se inicia na primavera e tem seu pico no verão. Nesta estação, foi observado um maior volume testicular que, indiretamente, pode ser resultado da espermiogênese devido à intensidade da produção de espermatozoides. Como resultado dos parâmetros seminais, a maior concentração de espermatozoides também ocorreu no verão /outono. Neste trabalho, foi observado que esta espécie apresenta o ciclo espermatogênico descontínuo (MATHIES, 2011), com período de espermiogênese acontecendo intensamente no verão, e uma pausa na produção de espermatozoides no inverno. Prado (2003) relatou espermatogênese contínua para *E. m. orinus*, porém trabalhou apenas com análises morfológicas macroscópicas.

Na análise do potencial elétrico mitocondrial por citometria de fluxo, a estação em que foi obtida uma maior porcentagem de viabilidade foi o outono, mostrando a alta atividade mitocondrial espermática, comprovando viabilidade dessas células e coincidindo com a estação de cópula da espécie. Prado (2003) também relatou época de cópula para a mesma espécie estudada no outono.

Na análise por microscopia confocal a laser, as estações em que os espermatozoides obtiveram maior intensidade de fluorescência foram o verão e o outono, períodos em que ocorrem a espermiogênese e a cópula, respectivamente.

Este trabalho, em uma condição futura, poderá estabelecer um padrão de qualidade para os parâmetros seminais para espécies da família Dipsadidae em prol da conservação, com o intuito de aumentar a eficiência na utilização de outras biotécnicas reprodutivas, como inseminação artificial e criopreservação seminal.



CONCLUSÕES

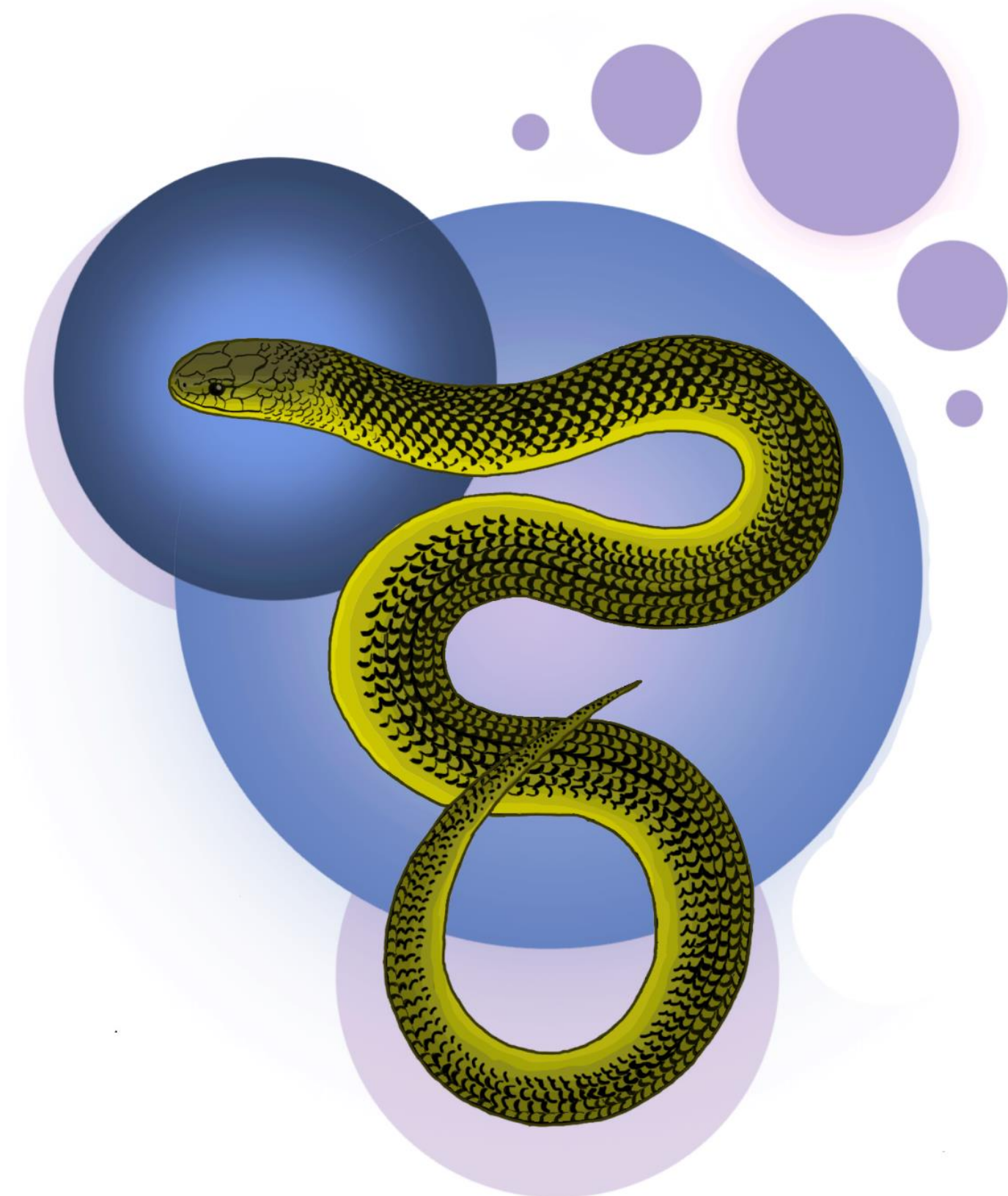
6 CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos por biotécnicas reprodutivas desenvolvidas neste projeto demonstrou convergência nos aspectos abaixo, indicando que:

Os machos de *Erythrolamprus miliaris orinus* apresentam o ciclo espermatogênico descontínuo, com picos de espermiogênese no verão.

A concentração espermática varia sazonalmente no verão e no outono, coincidindo tanto com os picos de espermatogênese, quanto com o período de cópula, respectivamente. O alto potencial elétrico espermático e a maior viabilidade dos espermatozoides também ocorrem no outono.

Observamos desta forma que a citometria de fluxo é uma técnica que engloba novos dados relativos ao estudo, proporcionando uma medida rápida, multiparamétrica e objetiva de determinadas características que possam estar relacionadas com o poder fecundante dos mesmos.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S. K.; AGRAWAL, K. A.; HAKIM, B. A.; VISHWAKARMA, A. L.; NARENDER, T.; SACHAN, REKHA; SACHDEV, M. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal**, v. 52, n. 9, p. 953-960, 2016.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 139, n. 2, p. 169-174, 2004.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; BRAZ, H. B.; SANTOS, L. C.; SUEIRO, L. R; BARROS, V. A.; ROJAS, C. A.; KASPEROVICZUS, K. N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 14-24, 2014.

AMARAL, T. B.; SERENO, J. R. B.; PELLEGRIN, A. O. **Fertilidade, funcionalidade e genética de touros zebuínos**. 1. ed. Corumbá: Embrapa Cerrados, 2009. 216 p.

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal reproduction science**, v. 99, p. 223-243, 2007.

ANDRADE, A. F. C.; PASSARELLI, M. S.; TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; MARTINS, S. M. K. Avaliação da qualidade do sêmen de cachacos: o que é possível ser feito? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte – MG, v. 41, n.1, p.283-291, 2017.

ANGRIMANI, D. S. R.; LOSANO, J. D. A.; RUI, B. R.; BICUDO, L. C.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte – MG, v. 39, n. 2, p.277-283, 2015.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C., ANDRADE, A. F. C.; GARCIA, A. A. R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. *In: 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA*, Paraná – PR, p. 166-179, 2005.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, L. Z.; OLIVEIRA, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte/ MG, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

BATISTA, S. F.; FACURE, K. G.; MARQUES, O. A. V. First record of mammal consumption by *Erythrolamprus miliaris*. How wide is the diet of this water snake? *Herpetology Notes*, v. 12, p. 713-715, 2019.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHICARINO, M. S.; ENDO, W.; MARQUES, O. A. V. Atividade, ciclo reprodutivo e dieta da cobra d'água *Liophis miliaris*, na porção sul da Mata Atlântica. *In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA*, 1998, Recife. **Resumos**, UFPE, p. 271-272, 1998.

CITELI, N.; HAMDAN, B.; GUEDES, T. Snake richness in urban forest fragments from Niterói and surroundings, Rio de Janeiro. *Biodiversity data journal*, n. 4, 2016.

COETI, R. Z.; SILVA, K. B.; PUORTO, G.; TAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Semen collection and evaluation in *Micrurus corallinus*. *Herpetological Conservation and Biology*, v 15, n. 3, p, 620-625, 2020.

COETI, R. Z.; ANTONIAZZI, M. M.; SÁNCHEZ, R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Sperm storage in coral snakes: A spermatozoa ultrastructural approach (Serpentes: Elapidae). *Zoologischer Anzeiger*, v. 290, p. 49-57, 2021.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

COSTA, H. C.; GUEDES, T. B.; BÉRNILS, R. S. Lista de répteis do Brasil: padrões e tendências. *Herpetologia brasileira*, v. 10, n. 3, p. 110–279, 2021.

DIXON, J. R. Taxonomic status of the South American snakes *Liophis miliaris*, *L. mazonicus*, *L. chrysostomus*, *L. mossoroensis* and *L. purpurans* (Colubridae: Serpentes).

Copeia, v. 1983, n. 3, p. 791-802, 1983.

DOMINGUES, S. F. S.; LIMA, J. S.; OLIVEIRA, K. G.; SANTOS, R. R. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação in situ de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 124-129, 2011.

DUARTE, M. R.; NETO, D. G.; JUNIOR, T. V. Predation on the sleeper goby, *Guavina guavina* (Perciformes, Eleotridae), by the military ground snake, *Erythrolamprus miliaris orinus* (Serpentes, Dipsadidae), in a mangrove area of Southeastern Brazil. **Herpetology Notes**, v. 7, p. 577-580, 2014.

ERAS, I. J. D. A.; MARTINS, T.G.S.; SILVA, A. L. S.; LEONARDO, S. D.; MIZANI, N. C.; SILVA, D. C. Q.; COGO, J. C. Observação do desenvolvimento dos ovos de *Liophis miliaris* (LINNAEUS, 1758) em cativeiro. In: **VIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino Americano de Pós Graduação**, Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, p. 89-91, 2004.

FAHRIG, B. M.; MITCHELL, M. A.; EILTS, B. E.; PACCAMONT, 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.

FICHT, H. Criteria for determining sex and breeding maturity in snakes. **Herpetologica**, v. 16, n. 1, p. 49-51, 1960.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401- 1406, 1997.

GRIBBINS, K. M.; GIST, D. H. Cytological evaluation of spermatogenesis within the germinal epithelium of the male European Wall Lizard, *Podarcis muralis*. **Journal of morphology**, v. 258, n. 3, p. 296-306, 2003.

GOLDBERG, S. R.; PARKER, W. S. Seasonal testicular histology of the colubrid snakes, *Masticophis taeniatus* and *Pituophis melanoleucus*. **Herpetologica**, v. 31, n. 3, p. 317-322, 1975.

HARTMANN, P. A. **História natural e ecologia de duas taxocenoses de serpentes na Mata Atlântica**. 2005. 125 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo, 2005.

HOWARD, D. J. Reinforcement: origin, dynamics, and fate of an evolutionary hypothesis. In: HARRISON, R. G.; HARRISON, G. R. **Hybrid zones and the evolutionary process**, Oxford University Press, 1993. p. 46-65.

IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2021-3. <https://www.iucnredlist.org>. Acessado em 04 janeiro 2022.

ICMBIO. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. 1 ed. Brasília/DF: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018. 492 p.

JAMIESON, B. G. M.; OLIVER, S. C.; SCHELTINGA, D. M. The ultrastructure of the spermatozoa of squamata. Scincidae, Gekkonidae and Pygopodidae (Reptilia). **Acta Zoologica**, v. 77, n. 1, p. 85-100, 1996.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Vet. Med. Zoot.**, v. 17, n. 39, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2013. 535 p.

LANGLADA, F. G.; FERREIRA, L. L.; SANTOS, S. Atividade espermiática de *Crotalus durissus* e a capacidade de fecundação. **Anais Acad. Bras. Ciên**, v. 63, n. 4, p. 427, 1991.

LANGLADA, F. G.; SANTOS, S.; FERREIRA, I. L. L. Técnica de inseminação artificial em *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae-Crotalinae). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 31, n. 2, p. 141-144, 1994.

LIMA, A. F. B.; COLOMBO, P. Observação do comportamento predatório de *Liophismiliaris orinus* (Serpentes, Colubridae) em *Hylodes meridionalis* (Anura, Hylodidae), Serra Geral, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zociências**, v. 10, n.1, 2008.

LIMA, T. C. **Coleta, avaliação seminal e inseminação artificial em *Erythrolamprus miliaris orinus***. 2020. 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização em Animais de Interesse da Saúde - Biologia Animal - Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

MARINHO, C. E.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; YAMASAKI, S. C.; SILVEIRA, P. F. Peptidase activities in the semen from the ductus deferens and uterus of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, n.5, p. 635-642, 2009.

MARQUES, O. A. V. **Composição faunística, história natural e ecologia de serpentes da Mata Atlântica, na região da estação ecológica Juréia-Itatins, São Paulo, SP.** 1998. 142 p. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Concentração: Zoologia) – Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

MATTSON, K. J.; DE VRIES, A.; MCGUIRE, S. M.; KREBS, J.; LOUIS, E. E.; LOSKUTOFF, N. M. Successful artificial insemination in the corn snake, *Elaphe gutatta*, using fresh and cooled semen. **Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association**, v. 26, n. 5, p. 363-369, 2007.

MATHIES, T. Reproductive cycles of tropical snakes. *In*: ALDRIDGE, R. D.; SEVER, D. M. **Reproductive biology and phylogeny of snakes.** Enfiled: Science Publishers, 2011. p. 511-550.

MENGDEN, G. A.; STOCK, A. D. Chromosomal evolution in Serpentes; a comparison of G and C chromosome banding patterns of some colubrid and boid genera. **Chromosoma**, v. 79, n. 1, p. 53-64, 1980.

MIKI, K.; QU, W.; GOULDING, E. H.; WILLIS, W. D.; BUNCH, D. O.; STRADER, L. F.; PERREAULT, S. D.; EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-s, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 47, p. 16501-16506, 2004.

MOREIRA, N. Técnicas reprodutivas para a conservação de felídeos silvestres. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 116-120, 2017.

MORTARA, R. A.; BONFIM-MELO, A.; LIMA, B. R.; PESSOA, C. C.; TOQUEIRO, C. M. O.; BAHIA, D.; FERREIRA, E. R. A.; REAL, F.; FLORENTINO, P. V. Microscopia confocal por varredura a laser: fundamentos e métodos. *In*: FERREIRA, E. R.; MORTARA, R. A.; FERREIRA, B. L.; BONFIM-MELO, A. **Microscopia confocal aplicada às ciências biológicas básicas.** São Paulo: Blucher, p. 221-247, 2015.

MANRRIQUEZ, M. A. M.; ALEJANDRO, A. R.; MASCORRO, G. F.; SANTOS, J. A. G.; BARRAGÁN, J. A. H. Caracterización seminal de *Boa imperator* (Sauropsida: Squamata: Boidae). **Ciencia y Mar**, v. 19, n. 57, p. 13-18, 2015).
MOZAFARI, S. Z.; SHIRAVI, A.; TODEHDEGHAN, F. Evaluation of reproductive parameters of vas deferens sperms in Caucasian snake (*Gloydius halys caucasicus*). **Veterinary Research Forum**, v. 3, p. 119-123, 2012.

NOGUEIRA, C. C.; ARGÔLO, A. J. S.; ARZAMENDIA, V.; AZEVEDO, J. A.; BARBO, F. E.; BÉRNILS, R. S.; BOLOCHIO, B. E.; BORGES-MARTINS, M.; BRASIL-GODINHO, M.;

BRAZ, H.; BUONONATO, M. A.; CISNEROS-HEREDIA, D. F.; COLLI, G. R.; COSTA, C. H.; FRANCO, F. L.; GIRAUDO, A.; GONZALEZ, R. C.; GUEDES, T.; HOOGMOED, M. S.; MARQUES, O. A. V.; MONTINGELLI, G. G.; PASSOS, P.; PRUDENTE, A. L. C.; RIVAS, G. A.; SANCHEZ, P. M.; SERRANO, F. C.; SILVA, N. J.; STRUSSMANN, C.; VIEIRA-ALENCAR, J. P. S.; ZAHER, H.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. **Atlas of Brazilian snakes: Verified point-locality maps to mitigate the Wallacean shortfall in a megadiverse snake fauna.** South American Journal of Herpetology. v. 14, p. 1-274, 2019.

OLIVER, S. C.; JAMIESON, B. G. M.; BARRIE, G. M.; CHELTINGA, D. M. The ultrastructure of spermatozoa of Squamata. II. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae (Reptilia). **Herpetologica**, v. 52, n. 2, p. 216-241, 1996.

PEREIRA, C. R.; ROQUE, F. O.; CONSTANTINO, P. A. L.; SABINO, J.; UEHARA-PRADO. **Monitoramento in situ da biodiversidade: proposta para um Sistema Brasileiro de Monitoramento da Biodiversidade.** 2. ed. Brasília/DF: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2013. 61 p.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V. Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. **The Herpetological Journal**, v. 16, n. 4, p. 353-362, 2006.

PRADO, L. P. **Reprodução de *Liophis miliaris* (Serpentes: Colubridae) no Brasil: influência histórica e variações geográficas.** 2003. 103 f. Dissertação (Mestre em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

PLAGUEZUELOS, J. M.; FERICHE, M. Reproductive ecology of the horseshoe whip snake (*Coluber hippocrepis*) in the Iberian Peninsula. **Journal of Herpetology**, v. 33, n. 2, p. 202-207, 1999.

QUINN, H.; BLASEDEL, T.; PLATZ JR, C. C. Successful artificial insemination in the checkered garter snake *Thamnophis marcianus*. **International Zoo Yearbook**, v. 28, n. 1, p. 177-183, 1989.

ROJAS, C. A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikania* (Schlegel, 1937) from Southeastern Brazil. **Journal of Morphology**, n. 274, n. 2, p. 215-228, 2013.

ROJAS, C. A.; BARROS, V. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. A histological and ultrastructural investigation of the female reproductive system of the water snake (*Erythrolamprus miliaris*): oviductal cycle and sperm storage. **Acta Zoologica**, p. 1-12, 2017.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. Nh image to Image: 25 years of

image analysis. *Nature methods*, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHUETT, G. W. Is long-term sperm storage an important component of the reproductive biology of temperate pitvipers. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. *Biology of the Pitvipers*. Tyler, Texas: Selva, 1992, p. 169-184.

SCHULTE-HOSTEDDE, A. I.; MONTGOMERIE, R. Intraspecific variation in ejaculate traits of the northern watersnake (*Nerodia sipedon*). *Journal of Zoology*, v. 270, n. 1, p. 147-152, 2006.

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

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

SILVA JUNIOR, C. H. L. The Brazilian Amazon deforestation rate in 2020 is the greatest of the decade. ***Nature Ecology and Evolution***, v. 5, n. 2, p. 144–145, 2021.

SILVA, J. C. B.; NOGUEIRA, E.; SILVA, M. R. Processamento de sêmen bovino refrigerado. Corumbá/ MS: Embrapa Pantanal – Comunicado Técnico (INFOTECA-E), n. 108, p. 1-6, 2017.

SHINE, R. Reproduction in Australian Elapid snakes I. Testicular cycles and mating seasons. ***Australian Journal of Zoology***, v. 25, n. 4, p. 647-653, 1977.

SWANSON, W. F. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. ***Theriogenology***, v. 66, n. 1, p. 49-58, 2006.

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

TOURMENTE, M.; CARDOZO, G. A.; GUIDOBALDI, H. A.; GIOJALAS, L. L.; BERTONA, M.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm motility parameters to evaluate the seminal

quality of *Boa constrictor occidentalis*, a threatened snake species. *Research in Veterinary Science*, v. 82, n. 1, p. 93-98, 2007.

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

QUINN, H.; BLASEDEL, T.; PLATZ, C. C. Successful artificial insemination in the checkered garter snake *Thamnophis marcianus*. *International Zoo Yearbook*, v. 28, n. 1, p. 177-183, 1989.

UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; HOSEK, J. A Quarter Century of Reptile and Amphibian Databases. *Herpetological Review*, v. 52, n. 2, p. 246-255, 2021.

ZACARIOTTI, R. L. **Estudo longitudinal do espermograma e dos níveis de testosterona sérica de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) proveniente da natureza do Estado de São Paulo**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ZACARIOTTI, R. L.; GREGO, K. F.; SANT'ANNA, S. S.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). *Zoo Biology*, v. 26, n. 2, p. 155-160, 2007.

ZÚCCARI, C. E. S. N.; SERENO, J. Biotécnicas da reprodução animal aplicadas à conservação de cervídeos. **Embrapa Cerrados-Documents (INFOTECA-E)**, 2006.