

RAFAELA ZANI COETI

**Sperm storage in Neotropical snakes:**  
a spermatozoon physiological and ultrastructural approach

São Paulo

2020

## RESUMO

COETI, R. Z. **Estocagem de esperma em serpentes Neotropicais**: uma abordagem fisiológica e ultra estrutural do espermatozoide. 2020. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, e Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2020.

A estocagem de espermatozoides pelas fêmeas em vertebrados é bem descrita e ocorre por períodos de tempo distintos, em lugares diferentes ao longo do trato reprodutivo. Dentre todos os vertebrados, as fêmeas de répteis são conhecidas pelos mais longos períodos de estocagem de espermatozoides, sendo que em serpentes há relatos de até 5 anos, podendo ocorrer na região anterior da vagina, no útero posterior ou no infundíbulo, seja em criptas ou em tubos de estocagem de esperma especializados (SST). Além disso, os machos de serpentes também podem estocar espermatozoides durante pelo menos uma estação, dentro dos ductos deferentes. Entretanto, desde a primeira descrição de estocagem em serpentes, até trabalhos que relatam a quantidade estimada de tempo de estocagem e a variabilidade paterna da prole, a mesma pergunta permanece sem resposta, como é possível que os espermatozoides permaneçam vivos por tanto tempo? Há hipóteses que indicam que o oviduto feminino se encarregaria de manter esses espermatozoides, outros apontam que a manutenção dessas células se deve a secreções do segmento sexual renal masculino, mas poucos estudos focam em como a estrutura do espermatozoide e sua fisiologia poderiam ser a chave de sua longa sobrevivência. Assim, esse trabalho teve como objetivo analisar a célula germinativa masculina de serpentes Neotropicais, do ponto de vista ultra estrutural e fisiológico, com a finalidade de avaliar e descrever os espermatozoides maduros antes da cópula. Para tanto, esse estudo foi dividido nas seguintes partes: (1) um protocolo minimamente invasivo para obtenção de sêmen em serpentes; (2) parâmetros de avaliação seminal de motilidade, vigor e vitalidade das amostras; (3) a ultraestrutura dos espermatozoides e por fim (4) a integridade do material genético dos espermatozoides.

Palavras-chave: Estocagem de esperma. Avaliação espermática. Espermatozoides de serpente. Ultraestrutura. Citometria de fluxo.

## RESUMEN

COETI, R. Z. **Almacenamiento de semen en serpientes Neotropicales: un enfoque en la fisiología y ultraestructura de espermatozoides.** 2020. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2020.

El almacenamiento de esperma por las hembras en los vertebrados está bien descrito y ocurre durante diferentes períodos de tiempo, en diferentes lugares a lo largo del tracto reproductivo. Entre todos los vertebrados, las hembras de reptiles son conocidas por los períodos más largos de almacenamiento de esperma, y en las serpientes hay informes de hasta 5 años, que pueden ocurrir en la región anterior de la vagina, en el útero posterior o en el infundíbulo, ya sea en criptas o en tubos especializados de almacenamiento de esperma (SST). Además, las serpientes machos pueden almacenar esperma durante al menos una temporada, dentro del conducto deferente. Sin embargo, desde la primera descripción del almacenamiento en serpientes, hasta estudios que informan la cantidad estimada de tiempo de almacenamiento y la variabilidad paterna de la descendencia, la misma pregunta permanece sin respuesta, ¿Cómo es posible que los espermatozoides permanezcan vivos durante tanto tiempo? Existen hipótesis que indican que el oviducto femenino estaría a cargo de mantener estos espermatozoides, otros señalan que el mantenimiento de estas células se debe a secreciones del segmento sexual renal masculino, pero pocos estudios se centran en cómo la estructura del esperma y su fisiología podrían ser la clave para su larga supervivencia. Por ésta razón, este trabajo tuvo como objetivo analizar la célula germinal masculina de las serpientes neotropicales, desde un punto de vista ultraestructural y fisiológico, con el propósito de evaluar y describir el esperma maduro antes de la copulación. Por lo tanto, este estudio se dividió en las siguientes partes: (1) un protocolo mínimamente invasivo para obtener semen de serpientes; (2) parámetros para la evaluación seminal de la motilidad, el vigor y la vitalidad de las muestras; (3) la ultraestructura del esperma y finalmente (4) la integridad del material genético del esperma.

Palabras clave: Almacenamiento de semen. Evaluación de esperma. Esperma de serpiente. Ultraestructura. Citometría de flujo.

## ABSTRACT

COETI, R. Z. **Sperm storage in Neotropical snakes: a spermatozoon physiological and ultrastructural approach.** 2020. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, e Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, 2020.

The sperm storage in vertebrate females is a well described process and occurs for distinct time periods, taking place in different portions of female reproductive tract. Among all vertebrates, the reptile females are known for the longer sperm storage and in snakes there are reports of up to 5 years, occurring inside the anterior vagina, posterior uterine tube and infundibulum, whether in crypts or in SST. In addition, male snakes can also store sperm for at least one season, inside the ductus deferens. However, since the first sperm storage description in snakes, until works reporting the estimated storage time and within-clutch multiple paternity, the same question stills without answer: How is possible that the spermatozoa be alive for so long? There are hypothesis indicating that female oviduct is in charged for sperm maintenance, others suggest that sperm cells maintenance are due to sexual segment of kidney (SSK) secretions, but few studies focus on how the spermatozoon structure and physiology could be the key for its long survival. Thus, this work aimed to analyse the Neotropical snakes' spermatozoa with a physiological and ultrastructural approach, for the purpose of evaluating and describing mature sperm before copulation. Therefore, we divided our study on four topics: (1) establishing a minimally invasive snake semen collection protocol; (2) evaluation of the snake semen parameters motility, vigor and vitality; (3) description the spermatozoa ultrastructure and (4) recognize if the genetic material of mature snake sperm is viable.

Keywords: Sperm storage. Sperm evaluation. Snake spermatozoa. Ultrastructure. Flow cytometry.

