

REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM RÉPTEIS

Rogério Loesch Zacariotti

O crescente interesse mundial pelos répteis em diversas áreas da ciência possibilita cada vez mais estudos sobre taxonomia, fisiologia, comportamento, história natural, patologia, anestesia e semiologia desses fascinantes animais.

Os répteis compõem hoje uma classe com aproximadamente 7.000 espécies, uma diversidade maior que a dos anfíbios e até mesmo dos mamíferos. Essas espécies têm evoluído nos mais diferentes ambientes, desde desertos, florestas tropicais, oceanos, até zonas temperadas próximas ao círculo ártico. Assim a diversidade de adaptações a esses ambientes, criou uma diversidade fisiológica e morfológica muito grande¹, e generalizar constatações feitas em uma espécie para toda a classe Reptília pode levar a grandes erros.

Restrições atuais na importação de répteis, o risco de introdução de doenças exóticas na nossa fauna e o crescente número de espécies ameaçadas no mundo tornam a reprodução e a manutenção em cativeiro desses animais muito importante. No entanto, a ausência de cópulas ou problemas com a concepção, em parte devido ao desconhecimento ou dificuldade na reprodução das condições ambientais necessárias para essas espécies, tornam a reprodução em cativeiro limitada². Alguns autores consideram a inseminação artificial como uma das ferramentas que podem aperfeiçoar a reprodução de répteis em cativeiro³⁻⁶. A inseminação artificial e a transferência de embriões revolucionaram a criação de animais domésticos, sendo que estas técnicas fazem parte de uma série de estratégias para incrementar a reprodução e a formação de bancos de germoplasma de animais silvestres⁷.

A reprodução assistida de répteis ainda é muito pouco explorada na literatura científica mundial, porém técnicas como a colheita e avaliação de sêmen e a inseminação artificial vêm sendo progressivamente desenvolvidas.

Anatomia básica reprodutiva dos répteis

O testículo dos répteis é uma massa ovóide composta por túbulos seminíferos, células intersticiais e vasos sanguíneos, envolvidos por tecido conjuntivo (túnica própria), localizados na cavidade celomática, sendo o direito mais cranial que o esquerdo em serpentes⁸. Os ductos deferentes ligam os testículos à papila genital na cloaca (figura 1), próximo à base do pênis, onde existe o sulco espermático, já que répteis não possuem uretra peniana⁹.

Os machos dos lagartos e das serpentes possuem inúmeras características que não são observadas em outros répteis¹⁰, como por exemplo, o órgão copulatório (hemipênis) que é duplo, sendo que apenas um dos pares é usado durante a cópula¹¹.

Nas fêmeas os ovários são difusos como nas aves e localizados próximos aos ovidutos (figura 2). Os ovidutos (geralmente dois, mas algumas espécies de serpentes apresentam apenas um) são estruturas alongadas que recebem os ovos após a ovulação. Na cloaca é possível visualizar a entrada dos ovidutos (figura 3).

Os répteis possuem basicamente dois modos de reprodução: a viviparidade e a oviparidade (quadro 1). As espécies ovíparas põem ovos e os embriões desenvolvem-se a maior parte no ambiente, enquanto que as vivíparas retêm os embriões que completam o desenvolvimento no útero durante a gestação⁸.

O ciclo ovariano em uma fêmea de réptil é basicamente dividido em vitelogênese primária (foliculos pequenos, arredondados e transparentes) e vitelogênese secundária (foliculos maiores, arredondados ou ovais e variando de coloração branca a amarelada). A vitelogênese primária ocorre principalmente devido ao acúmulo de água no interior do foliculo, enquanto que a secundária é a fase de grande crescimento folicular devido à deposição de vitelo (lipo-proteínas) no interior do foliculo⁸. Os ovários geralmente apresentam estruturas foliculares (figura 4) com tamanho entre 1 e 50 mm,

Quadro 1. Modos de reprodução dos répteis em geral

MODOS DE REPRODUÇÃO DOS RÉPTEIS EM GERAL	
Ovíparas	Vivíparas
Todos os crocodiliano	Alguns lagartos
Todos os quelônios	Algumas espécies família Agamidae
Alguns lagartos	Algumas espécies família Anguidae
Maior parte família Agamidae	Família Anniellidae
Várias espécies Família Anguidae	Algumas espécies família Chamaleodontidae
Várias espécies família Chamaleodontidae	Algumas espécies família Iguanidae
Família Gekkonidae	Algumas espécies família Scincidae
Família Helodermatidae	Família Xenosauridae
Maior parte família Iguanidae	Algumas serpentes
Família lacertidae (exceto Lacerta vivipara)	Família Boidae (exceto pítons)
Várias espécies família Scincidae	Várias espécies família Colubridae
Família Teiidae	Maior parte da família Viperidae
Família Varanidae	Várias espécies da família elapidae
Algumas serpentes	
Várias espécies família Colubridae	
Algumas espécies família Viperidae	
Várias espécies família Elapidae	

variando de acordo com a espécie e fase do ciclo reprodutivo.

Colheita de sêmen

Existem alguns relatos descrevendo técnicas de colheita de sêmen em répteis, uma importante etapa a ser desenvolvida antes da inseminação artificial.

LARSEN e CARDEILHAC¹² (1984) realizaram a colheita de sêmen post-mortem em *Alligator mississippiensis* (jacaré-americano) através da compressão dos dutos deferentes em um tubo de colheita. PLATZ *et al.*⁵ (1980) realizaram a colheita de sêmen utilizando a eletroejaculação com sucesso em alguns quelônios: *Chelonia mydas* (tartaruga-verde), *Geochelone elephantopus* (tartaruga-de-Galápagos) e *Trachemys scripta elegans* (tigre d'água americano). Os quelônios de menor tamanho foram contidos manualmente enquanto que os de maior porte eram suspensos com o auxílio de cintas sob o plastrão dos animais, não permitindo o contato dos membros com o chão. Após massagem manual no interior da cloaca estimulando a exposição do pênis, o transdutor do eletroejaculador era introduzido no reto do animal. Eram aplicados estímulos elétricos semelhantes às técnicas usadas em mamíferos selvagens e o sêmen que percorria o sulco ejaculatório era depositado em um tubo de colheita.

Sêmen foi obtido pela primeira vez em serpentes através da compressão do terço final do corpo do animal, no entanto era comum a contaminação das amostras por fezes e urato¹³. MENGDEN *et al.*⁴ (1980) descreveram uma técnica para a colheita de sêmen em serpentes contidas fisicamente e realizando massagens digitais na região ventral do terço final do animal, colhendo o sêmen quase sem contaminação diretamente da cloaca com o auxílio de uma seringa. As espécies utilizadas foram: *Elaphe subocularis* ("ratsnake"), *E. obsoleta* ("ratsnake"), *Epicrates inornatus* ("rainbow boa"), *Eunectes notaeus* (sucuri-amarela), *Python anchietae* (píton-de-angola), *P. timoriensis* (píton-do-timor), *Bitis gabonica* (víbora-do-gabão) e *Notechis scutatus* (cobra-tigre). QUINN⁴ (1989) descreveu a colheita de sêmen com auxílio da eletroejaculação, seguida de massagens digitais na região ventral de *Thamnophis marcianus* ("checkered garter snake"), mas a contaminação por fezes e uratos era comum. Nosso grupo realizou a colheita de sêmen em cascavéis (*Crotalus durissus*) utilizando a técnica descrita por MENGDEN *et al.*⁴ (1980), mas modificada com uso de anestésico local¹⁴. A lidocaína 1% na dose de 15 mg/Kg era aplicada em quatro diferentes pontos ao redor da cloaca (figura 5), permitindo o relaxamento da mesma e a exposição da papila genital, o que permite um maior controle sobre o procedimento para evitar contaminação. Após as massagens o

sêmen era colhido com auxílio de uma seringa de 1 ml (Figura 6).

Em um outro método descrito para *Crotalus durissus*, os machos sofriam a eutanásia para retirada dos ductos deferentes e colheita do sêmen por meio da compressão dos mesmos em uma placa de Petri3, porém este método não é indicado, pois implica na morte do macho.

Não existem até o momento na literatura científica relatos de colheita de sêmen em lagartos, apenas descrições da morfologia espermática ou da espermatogênese, utilizando técnicas de histologia e microscopia eletrônica. As avaliações são realizadas após a remoção e fixação de estruturas como testículos e dutos deferentes.

Avaliação do sêmen

A avaliação do espermograma é muito importante antes de utilizar-se um macho específico em um programa de reprodução, seja essa natural ou assistida, pois permite avaliar o potencial do animal, além de gerar informações para o estabelecimento de parâmetros normais para a espécie. Informações como espermograma são praticamente inexistentes para répteis. A pouca informação disponível para algumas espécies encontra-se na tabela 1.

Freqüentemente o sêmen deve ser diluído antes da avaliação, especialmente em serpentes devido à sua alta concentração. Os meios usados para a cultura de células M199 e Ham F-10 tem mostrado bons resultados para a diluição inicial e avaliação do sêmen em diversas espécies. Quando possível, uma avaliação rápida da concentração aparente auxilia na

Tabela 1. Dados de espermograma disponíveis para répteis.

Espécie	Método de colheita	Volume seminal (μl)	Concentração espermática ($\times 10^9 \text{sptz/ml}$)	Motilidade espermática (%)	Vigor espermático
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Massag em ventral	0,02 - 97	0,24 - 4,70	0 - 95	0 - 4
<i>Thamnophis marcianus</i>	Massag em ventral	60 - 100	-	50 - 70	4 - 5
<i>Crotalus durissus</i>	Post-mortem	800 - 1000	0,004	-	-

escolha da proporção de diluição da amostra. Estudos realizados com serpentes demonstraram que uma diluição ao redor de 1:500 mostrou-se adequada para a avaliação da motilidade e vigor espermático, bem como da morfologia do espermatozóide.

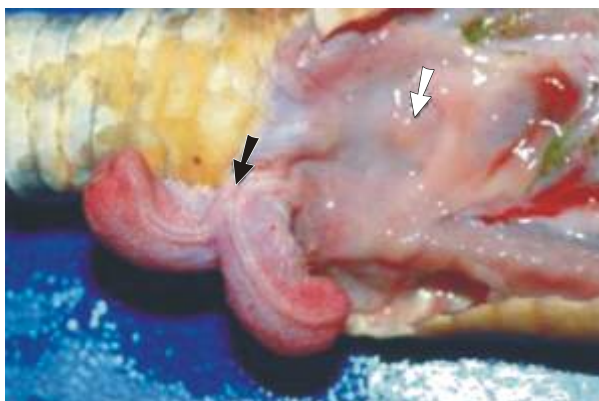


Figura 1. A seta preta indica a localização da papila genital na cloaca. A seta branca indica o sulco espermático no pênis de uma cascavel.



Figura 2. Oviduto esquerdo (seta preta) e ovário esquerdo repleto de folículos pré-ovulatórios (seta branca) em uma fêmea de *Varanus komodensis* (Dragão-de-Komodo).

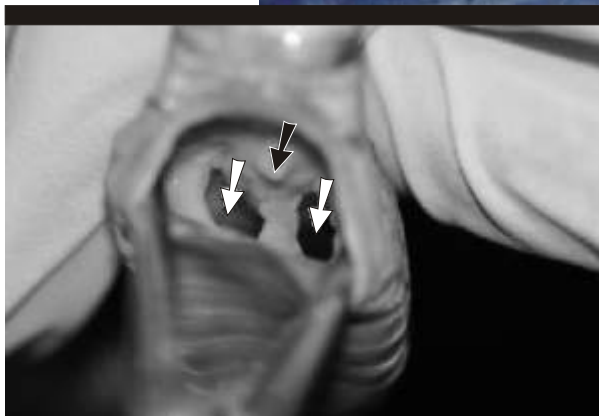


Figura 3. As setas brancas indicam as aberturas dos dois ovidutos na cloaca de *Crotalus ruber* (Cascavel) e a seta preta aponta a papila genital (local onde terminam os ureteres).

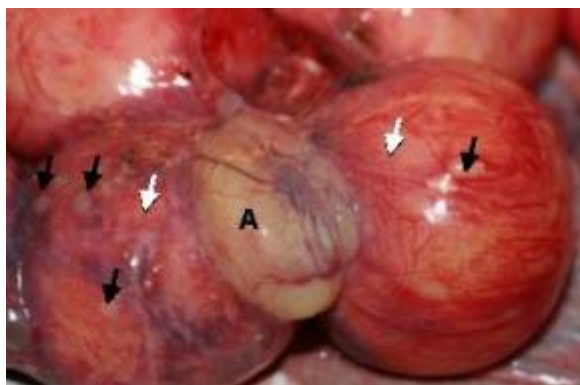


Figura 4. Estruturas foliculares no ovário de *Varanus komodensis* (Dragão-de-Komodo). Pode-se observar folículos primários (setas pretas), folículos pré-ovulatórios (setas brancas) e um folículo em degeneração ou atresia (letra A)

Figura 5. As Linhas indicam os locais de aplicação de lidocaína 1% para a anestesia local da cloaca em *Crotalus durissus* (Cascavel).

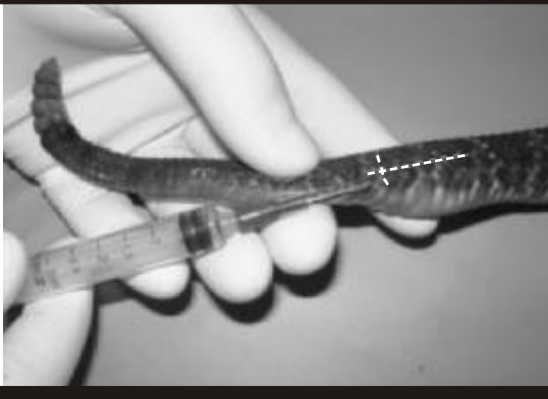


Figura 6. Após as massagens ventrais pode-se observar a colheita de sêmen com auxílio de uma seringa a partir da papila genital em *Crotalus durissus* (Cascavel).

É importante ressaltar que os répteis são animais ectotérmicos, assim o uso de placas ou platinas aquecedoras para a manutenção de equipamentos e amostras a uma temperatura de 36°C é desnecessária, podendo ser até mesmo prejudicial à amostra de sêmen. Porém não se deve submeter às amostras a grandes variações de temperatura. O ideal é trabalhar em temperaturas próximas a 25°C desde que não se queira resfriar ou congelar o sêmen. O acondicionamento da amostra em recipiente térmico durante avaliação ou transporte permite que a amostra permaneça protegida da luz e variações bruscas de temperatura.

Um espermograma deve conter no mínimo as informações relacionadas abaixo:

- Volume: pode ser avaliado com auxílio de pipeta volumétrica ou no caso de volumes muito pequenos pode-se utilizar micropipeta de volume variável.
- Concentração: é avaliada utilizando-se câmara hematómica de Neubauer como habitualmente para outras espécies.
- Coloração do sêmen: avaliada no próprio tubo de colheita. É importante para a detecção de contaminação por fezes, urato, sangue, etc.
- Motilidade e Vigor: para avaliação do vigor e da motilidade, uma alíquota da amostra de sêmen, devido à sua alta concentração, pode ser diluída de maneira que a concentração final permita individualizar um espermatozóide no campo ao microscópio. As amostras devem ser avaliadas em microscópio de luz sob objetiva com aumento de 10 a 20 vezes. A motilidade é definida levando-se em conta a proporção dos espermatozóides que apresentavam qualquer tipo de motilidade, numa escala de 0% (nenhum espermatozóide móvel) a 100% (todos os espermatozóides móveis). O vigor espermático é classificado como: 0 - ausência de motilidade, 1 - movimentos laterais leves sem progressão, 2 - movimentos laterais moderados com progressão ocasional, 3 - movimento progressivo freqüente, porém lento, 4 - movimento progressivo constante com velocidade moderada, 5 - movimento progressivo rápido.
- Morfologia: Uma alíquota, quando o volume de amostra permitir, deve ser separada e fixada em solução tamponada de formol para a posterior avaliação. Na figura 7 podem ser observadas algumas das alterações morfológicas observadas em espermatozoides de serpentes.

Adicionalmente às avaliações citadas, colorações específicas podem ser realizadas para tornar a caracterização da amostra mais completa. Atualmente a coloração simples de acrossoma e de peça intermediária utilizando a Diaminobenzidina estão validadas apenas para cascavel¹⁵, mas podem ser usadas em outras espécies em caráter experimental.

Avaliação da fêmea:

A avaliação das fêmeas também é importante para a realização da inseminação artificial. As fêmeas devem estar saudáveis e com uma condição corporal boa, pois a vitelogênese (processo fisiológico de crescimento dos folículos ovarianos) consome grande quantidade da reserva de gordura do animal.

O exame ultrassonográfico dos ovários também deve ser parte da avaliação reprodutiva das fêmeas.

No caso de répteis como lagartos, serpentes e crocodilianos, após a contenção física ou química, pode-se mergulhar parte do corpo do animal na água para facilitar o exame ultrassonográfico. A incidência do transdutor pode ser ventro-dorsal ou latero-lateral. No caso de quelônios, onde pode se utilizar o gel para ultrasonografia, o posicionamento do transdutor é na abertura inguinal, cranial aos membros pélvicos em direção ao dorso do animal, onde estão localizados os ovários.

A frequência do transdutor do ultra-som pode ser entre 5,0 e 13 MHz de acordo com o tamanho do animal e das estruturas que se pretende visualizar, a frequência de 7,5 MHz tem se mostrada eficiente em varias situações. O ultra-som também pode ser usado para o diagnostico de gestação em répteis. A figura 8 mostra o aspecto do ovário ao exame ultrassonográfico em uma cascavel (*Crotalus ruber*) e as estruturas observadas no inicio da gestação.

Estudos descritivos mais profundos da morfologia dos ovários durante diferentes fases do ciclo são

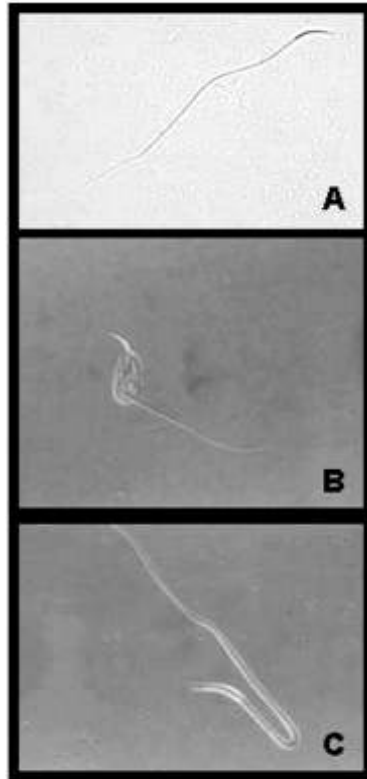


Figura 7. Algumas das alterações morfológicas observadas em espermatozoides de *Crotalus durissus terrificus* (Cascavel). A) Espermatozóide normal. B) Espermatozóide com peça intermediária enrolada. C) Espermatozóide com peça intermediária dobrada.

muito importantes para auxiliar a avaliação reprodutiva ultrassonográfica em uma fêmea. Por exemplo, foi estabelecido em algumas espécies de cascavel⁸ que folículos menores ou iguais a 10 mm estão em vitelogênese primária, enquanto que os maiores que 10 mm estão em vitelogênese secundária, fase que antecede a ovulação. A observação das estruturas semelhantes aos folículos nos ovidutos demonstra que a ovulação já aconteceu. A visualização do corpo lúteo em répteis é difícil com o auxílio do ultrassom.

A frequência do exame ultrassonográfico vai depender da espécie, bem como fase do ciclo reprodutivo, podendo variar de semanal a mensal, e sempre procurando evitar o estresse do animal. A fêmea pode estar sob contenção física ou química para o exame ultrassonográfico. Cascavéis suportam bem o exame ultrassonográfico sob contenção física utilizando um tubo plástico, desde que o exame não exceda 20 minutos de duração.

Aliado ao exame ultrassonográfico, a dosagem de hormônios como estradiol, progesterona e testosterona também podem auxiliar nos estudos do ciclo reprodutivo tanto do macho quanto da fêmea¹⁶.

Inseminação artificial

A técnica de congelamento de sêmen em répteis ainda não está desenvolvida, e existem poucos estudos preliminares e com resultados limitados^{4,12}, assim deve-se por enquanto priorizar a inseminação artificial com sêmen fresco diluído ou não. A inseminação artificial foi realizada com algum apenas em



Figura 8. Imagem ultrassonográfica do ovário direito em *Crotalus Michellii* (Cascavel) com observação de folículos entre 5 e 8 mm (seta branca). B) observação do ovo (linha pontilhada) no útero de *Crotalus ruber* (Cascavel) com a vesícula embrionária evidenciada (seta preta)

Thamnophis marcianus ("checkered garter snake")⁶ e *Crotalus durissus terrificus* (cascavel)³. Em 2006 o Zoológico Henry Doorly de Omaha anunciou o nascimento de filhotes de *Elaphe guttata* ("corn snakes") a partir da inseminação artificial com sêmen fresco. No entanto um fato observado nos casos citados anteriormente é o pequeno numero de filhotes por ninhada em comparação com aquelas produzidas naturalmente através de cópula.

LARSEN e CARDEILHAC¹² (1984) realizaram sem sucesso a inseminação artificial em *Alligator mississippiensis* (jacaré-americano). Até o momento não foram descritos na literatura científica procedimentos para a inseminação artificial em lagartos ou quelônios.

Nas técnicas de inseminação descritas os autores utilizaram sêmen fresco, depositando o mesmo no oviduto das fêmeas. Assim a localização da entrada nos ovidutos dentro da cloaca é muito importante. A grande maioria dos répteis possui dois ovidutos, mas estes podem ter aberturas individuais (quelônios e crocodilianos) ou duplas (lagartos e serpentes) na cloaca. Assim durante o procedimento de inseminação é importante certificar que os dois ovidutos estão sendo inseminados.

As técnicas de inseminação descritas usam uma sonda, flexível ou rígida, acoplada a uma seringa contendo o sêmen. Estas sondas devem possuir um diâmetro adequado ao tamanho da fêmea, já que o oviduto é bastante delgado. A determinação do momento da inseminação em répteis ainda não está definida e os pesquisadores utilizam como referência o período que normalmente corresponderia à fase de cópula para a espécie.

Considerações finais

A reprodução de répteis natural ou assistida representa um grande desafio, com raras exceções. O pequeno sucesso obtido com uso das técnicas de reprodução assistida usadas se deve em grande parte a escassez de informações sobre fisiologia reprodutiva dos répteis. Por exemplo, ainda não se sabe até que ponto o estímulo da cópula é importante na indução de ovulação ou vitelogênese de inúmeras espécies¹⁷.

Apesar das limitações, cada vez mais surgem estudos utilizando répteis como modelos experimentais e futuramente a reprodução assistida será uma realidade para esses animais como é para diversas espécies.

Referências bibliográficas

1. FITCH, H. S. **Reproductive cycles of lizards and snakes**. Museum of Natural History of University of Kansas, 1970
2. ROSS, R.A. and MARZEC, G. **Reproductive Husbandry of Pythons and Boas**. Institute for Herpetological Research, Stanford-CA, 1990
3. LANGLADA, F. G.; SANTOS, S.; FERREIRA, I. L. L. Techniques of artificial insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae – Crotalinae). **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal and Science**, v. 31, n. 2, p. 141-144, 1994.
4. MENGDEN, A. G.; PLATZ, G. C.; HUBBARD, R.; QUINN, H. Semen collection, freezing and artificial insemination in snakes. In: MURPHY, J. B. **Reproductive Biology and diseases of captive reptiles**. Kansas, The Society for the study of Amphibians and Reptiles, 1980. p. 71-78.
5. PLATZ, C. C.; MENGDEN, G.; QUINN, H.; WOOD, F.; WOOD, J. Semen collection, evaluation and freezing in the Green sea turtle, Galapagos tortoise, and Red-eared pond turtle. In: Congress for American Association of Zoo Veterinarians, 1980. **Proceedings...** American Association of Zoo Veterinarians, 1980. p. 47-54.
6. QUINN, H., BLASEDEL, T., AND PLATZ, C.C. (1989). Successful artificial insemination in the checkered garter snake. **Int Zoo Yb.** 28: 177-183.
7. WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology**, v. 1, p. 17-20, 1989. Supplement.
8. DeNARDO, D. Reproductive biology. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p. 212-224.
9. VASSE, Y. Hemipenes. In: BAUCHOT, R. **Snakes - a natural history**. New York: Sterling Publishing, 1994. p. 102.
10. LANCE, V. A. Reptile reproduction and endocrinology In: HOLT, W.; PICKARD, A. R., RODGER, J. C.; WILDT, D. C. **Reproductive science and integrated conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 426 p.
11. FOX, H. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. **Biology of reptilia**. New York: Academic Press, 1977. p. 1-157.

12. LARSEN, R. E.; CARDEILHAC, P. T. Artificial insemination, semen handling, and assessment of reproductive status in alligators. In: THE ANNUAL MEETING OF AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS, 1984. **Abstracts...** American Association of Zoo Veterinarians, 1984, p. 159.
13. FITCH, H. Criteria for Determining Sex and Breeding Maturity in Snakes. **Herpetologica** 16:49-51. 1960
14. ZACARIOTTI, R.L, GREGO, K.F. FERNANDES, W., SANT'ANNA, S.S. GUIMARAES, M.A.B.V. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). **Zoo Biology**. In press.
15. INNOCENTI, M.C., ZACARIOTTI, R.L., BETKOWSKY, S.E., GUIMARÃES, M.A.B.V. Avaliação do espermograma , validação da coloração simples do acrossoma e da atividade mitocondrial (citocromo c oxidase) em espermatozóide normal de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). 2006. In: Congresso da Associação Brasileira dos Veterinários de Animais Selvagens, 2006. Sao Pedro. Anais do Congresso da Associação Brasileira dos Veterinários de Animais Selvagens, 2006, p. 166.
16. BETKOWSKY, S.E., INNOCENTI, M.C., ZACARIOTTI, R.L., GUIMARÃES, M.A.B.V., Estudo dos níveis de progesterona e estradiol séricos e acompanhamento das características ultrassonográficas de ovários e ovidutos de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) mantidas em cativeiro em um período de 12 meses. In: Congresso da Associação Brasileira dos Veterinários de Animais Selvagens, 2006. Sao Pedro. Anais do Congresso da Associação Brasileira dos Veterinários de Animais Selvagens, 2006, p. 40.
17. MENDONÇA, M.T. and CREW, D. (1990). Mating-induced ovary recrudescence in the red-sided garter snake. *J. Comp. Physiol A* 166: 629-632