

ROGÉRIO LOESCH ZACARIOTTI

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

São Paulo
2004

ROGÉRIO LOESCH ZACARIOTTI

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

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães

São Paulo
2004

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1308
FMVZ

Zacariotti, Rogério Loesch

Estudo longitudinal do espermograma e dos níveis de testosterona sérica de caçavei (*Crotalus durissus terrificus*, Laurent, 1768) provenientes da natureza do Estado de São Paulo / Rogério Loesch Zacariotti. - São Paulo : R. L. Zacariotti, 2004.
90 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães.

1. Sêmen animal. 2. Hormônios testiculares. 3. Viperídeos.
4. Espermatozoides. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: ZACARIOTTI, Rogério Loesch

Título: 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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Data: 22/06/2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo A. de S. Urzêzar Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: Aprovado Assinatura: [Assinatura]

Prof. Dr. Valquiria Hippólito Bandeira Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: Aprovado Assinatura: [Assinatura]

Prof. Dr. Manoel Demicheli Instituição: FMVZ/UNESP/Botucatu

Julgamento: Aprovado Assinatura: [Assinatura]

Aos meus pais *Pedro* e *Eliana*, pelo amor, carinho,
amizade e incentivo em todos os momentos.

Aos meus irmãos Cristina (*Titi*), Daniela (*Dani*) e Ricardo
(*Cadinho*), meus companheiros de vida.

Eu amo vocês.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo, não só pela orientação deste trabalho, mas pela grande amizade. Um exemplo de caráter, competência e profissionalismo.

Ao amigo Samuel, que como um irmão muito tem feito por mim.

Aos amigos que fiz na pós-graduação, Thiesa, Paola, Luciana, Marcílio, Karina, Ana Paula, Vinícius, Bianca, Paulo e Nélcio. Vocês estarão para sempre no meu coração.

Aos amigos do LDH Patrícia, Érica, Priscila, Adriana, Débora, Lílian, Tatiana, Eduardo e Regina, pessoas maravilhosas.

Aos amigos do Instituto Butantan, Alex, Lú, Pablo, Bauer, Luciano, Marquinhos, que sempre me ajudaram na execução deste trabalho, mesmo às 4 horas da tarde na sexta-feira.

Ao Diretor do Laboratório de Herpetologia Wilson Fernandes que me recebeu de braços abertos desde o aprimoramento profissional e me abriu as portas do Instituto Butantan para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Katheleen e ao Sávio, que além de amigos, muito me ensinaram sobre répteis.

À Prof. Dr. Valquíria H. Barnabé e ao Prof. Dr. Renato C. Barnabé, que acreditaram neste projeto e abriram as portas do Departamento de Reprodução Animal e do Laboratório de Andrologia para a realização deste trabalho.

Aos amigos Kapitú, Miquin, Cremaster, Murra, Pepita, pelos momentos divertidos que passei com vocês.

À amiga Thais, pelo carinho e amizade, além de ter me apresentado pessoas muito queridas, Marion, Alberto, Dona Marieta, Levi e Rafael.

Aos funcionários da biblioteca, sempre atenciosos e prestativos, muito obrigado.

Aos funcionários do VRA, pela amizade e auxílio em várias ocasiões.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado concedida.

À Fapesp pelo auxílio à pesquisa concedido.

Enfim, tenho muito a agradecer a todos aqueles que me acompanharam e ajudaram em mais essa etapa da minha vida.

“Se deparamos com uma pessoa que levou uma flechada, não perdemos tempo nos perguntando de onde a flecha pode ter vindo, a que casta pertencia o indivíduo que a atirou; analisando de que tipo de madeira a flecha seria feita, ou de que modo foi talhada a ponta da flecha. Em vez disso, deveríamos nos concentrar em arrancar a flecha imediatamente”.

- Shakyamuni, o Buda -

RESUMO

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.** [Longitudinal study of the semen evaluation and serum testosterone concentration in wild caught Brazilian rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) from Sao Paulo State]. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) está distribuída pelas regiões Sul e Sudeste do Brasil, e é responsável por aproximadamente 10% dos 20 mil acidentes ofídicos que acontecem anualmente. A cascavel tem grande importância no campo médico, farmacológico e toxicológico. Outro aspecto de grande importância é o papel que a espécie desempenha no equilíbrio ecológico e na manutenção da biodiversidade. O presente trabalho teve como objetivos padronizar uma técnica eficiente de colheita do sêmen para cascavel (*Crotalus durissus terrificus*), avaliar as características do espermograma, além de verificar os níveis de testosterona sérica de machos adultos recém chegados de natureza. Foram utilizados 152 animais provenientes de natureza do estado de São Paulo. Foi possível obter sêmen em 112 animais, sendo o volume seminal (média±EPM) de 18,49±2,04 µL. A concentração espermática (média±EPM) encontrada foi de 1,39±0,080 sptz.10⁹/mL. Os níveis de testosterona sérica variaram entre 0,17 ng/mL e 189,75 ng/mL, sendo que o verão apresentou as maiores concentrações e o inverno as menores.

Palavras-chave: Sêmen animal. Espermatozóides. Hormônios testiculares. Viperidae.

ABSTRACT

ZACARIOTTI, R. L. **Longitudinal study of the semen evaluation and serum testosterone concentration in wild caught Brazilian rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) from Sao Paulo State.** [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 Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The Brazilian rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) is found in the South and Southwest regions of Brazil, being responsible for 10% of the 20,000 snake bitten in this country. This snake has a great importance in the medical, pharmacological and toxicological fields. In addition, these animals are very important for the ecological balance and the maintenance of the biodiversity. The aim of this study was to standardize an efficient technique of semen collection and evaluation in the Brazilian rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), and to quantify the serum testosterone levels. Semen samples were collected from 152 wild caught animals from Sao Paulo State. It was possible to collect semen of 112 snakes. The seminal volume (mean±SE) and sperm concentration were $18.49 \pm 2.04 \mu\text{L}$ and $1.39 \pm 0.080 \text{ sptz} \times 10^9/\text{mL}$, respectively. The testosterone levels found in the rattlesnakes ranged from 0.7ng/mL to 189.75ng/mL, being the higher levels ($p < 0.05$) found during the summer when compared to the levels found during the winter.

Key-words: Animal semen. Espermatozoa. Testosterone. Viperidae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Exemplo adulto de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*)..... 23
- Figura 2 - Hemipênis de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*)..... 28
- Figura 3 - Mapa do Estado de São Paulo dividido em macro-regiões. A legenda indica a quantidade de machos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) oriundos de cada município (áreas coloridas)..... 39
- Figura 4 - Massagem ventral para colheita de sêmen em cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). A seta indica o sentido da massagem..... 41
- Figura 5 - Colheita de sêmen em cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) a partir da papila genital localizada na cloaca..... 41
- Figura 6 - Espermatozóide de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) sob microscopia de luz com interferência de fase (Olympus BX 50) e aumento da objetiva de 100 vezes. **A** – Espermatozóide normal. A seta aponta o fim da peça intermediária. (As setas nas fotos a seguir apontam as alterações morfológicas descritas) **B** – Acrossoma dobrado. **C** – Gota citoplasmática proximal. **D** – Gota citoplasmática distal. **E** – Peça intermediária enrolada. **F** – Peça intermediária dobrada. **G** – Forma teratológica. **H** – Cauda fortemente dobrada..... 56
- Figura 7 - Perfil da concentração sérica de testosterona e defeitos espermáticos totais em machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, ao longo das estações climáticas..... 59
- Figura 8 - Espermatozóide normal de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) corado através da coloração simples de acrossoma. A seta aponta o acrossoma corado (Microscópio de luz, Olympus BX 50, objetiva 100X)..... 60
- Figura 9 - Demonstração gráfica da validação do conjunto diagnóstico DPC® para a quantificação de testosterona sérica de machos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*)..... 61
- Figura 10 - Perfil da concentração média de testosterona sérica de 116 machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do estado de São Paulo, durante 12 meses. A linha verde indica a fase de cópula nesta espécie..... 65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios, erro padrão e valores mínimo e máximo dos resultados da análise dos parâmetros estudados em machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do estado de São Paulo. São Paulo, 2004..... 49
- Tabela 2 - Peso e comprimento (média±EPM) por estação climática de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo. São Paulo, 2004..... 50
- Tabela 3 - Eficiência da colheita de sêmen em machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, dividida por estação climática. São Paulo, 2004..... 51
- Tabela 4 - Concentração espermática e volume seminal (média±EPM) de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do estado de São Paulo, divididos por estação climática. São Paulo, 2004..... 51
- Tabela 5 - Motilidade e vigor espermático (média±EPM) de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, divididos por estação climática. São Paulo, 2004..... 53
- Tabela 6 - Prevalência (média±EPM) das alterações morfológicas espermáticas observadas no sêmen de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes do Estado de São Paulo, ao longo das estações climáticas. São Paulo, 2004..... 57
- Tabela 7 - Níveis séricos de testosterona (média±EPM) de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, divididos por estação climática. São Paulo, 2004..... 64

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Níveis de testosterona plasmática em serpentes, descritos na literatura..... 31
- Quadro 2 - Alterações morfológicas observadas no espermatozóide de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) proveniente de natureza do Estado de São Paulo..... 55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	BIOLOGIA DA CASCAVEL.....	22
2.2	BIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA DE CASCAVEL.....	25
2.3	BIOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO DE CASCAVEL.....	26
2.4	ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTIVO DO MACHO DE SERPENTES.....	27
2.5	ESPERMATOGÊNESE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	29
2.6	HORMÔNIOS ANDRÓGENOS EM SERPENTES.....	30
2.7	COLHEITA DE SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM RÉPTEIS.....	32
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1	ANIMAIS.....	38
4.2	CONTENÇÃO FÍSICA E BIOMETRIA.....	39
4.3	COLHEITA DE SANGUE E SÊMEN.....	40
4.4	AVALIAÇÃO SEMINAL.....	42
4.5	COLORAÇÃO SIMPLES DE ACROSSOMA.....	43
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE TESTOSTERONA SÉRICA ATRAVÉS DE RADIOIMUNOENSAIO (RIE).....	44
4.6.1	Validação da técnica.....	45
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1	RESULTADOS GERAIS.....	49
5.2	BIOMETRIA DOS ANIMAIS.....	50

5.3	COLHEITA DE SÊMEN.....	50
5.4	AVALIAÇÃO DO ESPERMOGRAMA.....	51
5.5	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	54
5.6	COLORAÇÃO SIMPLES DE ACROSSOMA.....	60
5.7	QUANTIFICAÇÃO DE TESTOSTERONA SÉRICA NOS MACHOS DE CASCAVEL.....	61
5.7.1	Validação dos conjuntos diagnósticos.....	61
5.7.2	Controle de qualidade do Radioimunoensaio.....	62
5.7.3	Perfil da testosterona sérica.....	62
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXOS.....	80

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As serpentes compreendem aproximadamente 2700 espécies distribuídas por todo o globo terrestre, exceto nas calotas polares e regiões de grande altitude (GREENE, 1997). O Brasil possui por volta de 260 espécies de serpentes, sendo 70 delas peçonhentas (GRANTSAU, 1991), provocando acidentes ofídicos em praticamente todas as regiões do país (BRASIL, 1998).

Os acidentes ofídicos têm grande importância médica devido à sua frequência e gravidade. No período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, foram notificados 81.611 acidentes ofídicos, o que representa uma média de 20.000 casos/ano, sendo a maioria das notificações (aproximadamente 60%) provenientes das regiões Sul e Sudeste, as mais populosas do país e que possuem melhor organização dos serviços de saúde e sistemas de informações. Do total dos acidentes ofídicos, a cascavel (*Crotalus durissus*) foi responsável por 7,7%, com 95 óbitos, uma taxa de letalidade de 1,87%, a maior encontrada no Brasil (BRASIL, 1998). Esses números justificam a produção de aproximadamente 80 mil ampolas de soro anti-ofídico pelo Instituto Butantan¹ em 2002 (informação verbal).

Nos venenos das serpentes também existem substâncias que podem ser usadas como medicamentos, como ocorreu com a jararaca (*Bothrops jararaca*) e a descoberta da Bradicinina por ROCHA E SILVA (1949), que serviu de base para a produção de um medicamento para hipertensão arterial usado no mundo todo.

¹ Informação fornecida pelo Setor de Produção de Imunobiológicos do Instituto Butantan, em 2002

O veneno da cascavel que apresenta atividades miotóxica, neurotóxica e coagulante, também possui substâncias interessantes, por exemplo, a crotamina que possui uma ação analgésica 30 vezes mais potente que a morfina em doses terapêuticas extremamente baixas (0,4% da DL-50) (MANCIN et al., 1998). Essa mesma toxina provoca a contração da musculatura extensora dos membros posteriores de camundongos (GONÇALVES, 1956), provando ser uma importante ferramenta para estudos de mecanismos fisiológicos e farmacológicos.

A cascavel, como mostrado anteriormente, tem grande importância nos campos médico, farmacológico e toxicológico. Ainda outro aspecto, é o papel fundamental que a cascavel e outras serpentes desempenham no equilíbrio ecológico e na manutenção da biodiversidade.

As serpentes têm evoluído nos mais diferentes ambientes, desde desertos, florestas tropicais até zonas temperadas próximas ao círculo ártico. Assim a diversidade de adaptações criou uma diversidade fisiológica e morfológica muito grande (FITCH, 1970).

Características da biologia reprodutiva das serpentes têm sido estudadas por muitos pesquisadores (FITCH, 1970), porém esses estudos enfocam principalmente serpentes da América do Norte, Europa e Japão (SLIP; SHINE, 1988). Seigel e Ford (1987) contestam que características do ciclo reprodutivo das serpentes de regiões temperadas possam ser extrapoladas para o universo das serpentes. As informações sobre o ciclo reprodutivo de espécies tropicais e subtropicais são escassas (TSAI; TU, 2000).

A biologia reprodutiva de serpentes neotropicais estudada em *Bothrops asper* (jararaca da Costa Rica), *B. jararaca* (jararaca), *B. moojeni* (caissaca), *B. insularis*

(jararaca-ilhoa) e *Crotalus durissus terrificus* (cascavel), constituem a pouca informação disponível (ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002).

Ebenhard (1995) estima que existem 290 espécies de répteis que necessitam de manejo intensivo para a conservação, sendo que 113 destas espécies estão ameaçadas e apenas 103 apresentam trabalhos de manejo intensivo *in situ*.

Segundo o relatório da IUCN – International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (2003), existem:

- 26 espécies de serpentes consideradas vulneráveis, 14 espécies ameaçadas de extinção e 13 espécies seriamente ameaçadas de extinção;
- No Brasil existem duas espécies de serpentes seriamente ameaçadas, a jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*) e a jararaca-de-Alcatrazes (*Bothrops* sp.), uma ameaçada de extinção (*Calamodontophis* sp), além de outras três espécies consideradas vulneráveis (*Bothrops pirajai*, *Calamodontophis paucidens* e *Liophis atraventer*).

Segundo o IBAMA (2003) apenas a surucucu (*Lachesis muta rombheata*) está ameaçada de extinção.

As cascavéis descritas na literatura como ameaçadas são a *Crotalus willardi* (BARKER, 1992), *Crotalus polystictus* (GREENE; CAMPBELL, 1992) e a *Crotalus unicolor* (IUCN, 2003), sendo todas as espécies da América Central e do Norte.

Assim estudos de aspectos reprodutivos em serpentes das regiões tropicais e sub-tropicais são muito importantes, especialmente como fonte de informação para otimizar a reprodução em cativeiro, seja ela para a conservação ou com o propósito de pesquisas farmacológicas e produção de soro antiofídico.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O texto a seguir contém informações, separadas em tópicos, referentes à biologia e reprodução de serpentes.

2.1 BIOLOGIA DA CASCAVEL

A cascavel (*Crotalus sp*) pertence à subfamília *Crotalinae* (família *Viperidae*), que além deste gênero com 26 espécies, possui mais 15 gêneros e 118 espécies, todas peçonhentas (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Essa família é caracterizada pela presença de um órgão termorreceptor de cada lado da cabeça, entre o olho e a narina, denominado fosseta loreal. O gênero *Crotalus* possui uma estrutura especializada na ponta da cauda chamado guizo ou chocalho, que produz som, sendo que apenas o gênero *Sistrurus*, grupo filogeneticamente próximo ao *Crotalus*, também possui essa característica (GREENE, 1997).

Na América do Sul o gênero *Crotalus* está representado por 14 subespécies, sendo conhecida no Brasil como boicinga, boiçununga, boiquira, cascavel de quatro ventos, cobra de guizo, maracá e maracabóia (KOLESNIKOVAS, 1997). Segundo Campbell e Lamar (1989), no Brasil só ocorre a espécie *Crotalus durissus*, dividida em 7 subespécies: *C.d. ruruima* encontrada nos altiplanos de Roraima e Venezuela; *C.d. marajoensis*, que ocorre na ilha de Marajó; *C.d. cascavella*, na região de caatinga do nordeste brasileiro; *C.d. dryinus* e *C.d. trigonicus*, de ocorrência

provável, pois são encontradas nos países adjacentes à Amazônia brasileira; *C.d. collilineatus* distribuída nas áreas de cerrado pelos estados de Rondônia, Mato Grosso, Goiás, sudoeste da Bahia, oeste de Minas Gerais, São Paulo e provavelmente oeste do Paraná. Por fim, *C.d. terrificus* (Figura 1) encontrada em áreas abertas, campos cultivados, áreas devastadas, áreas de mata Atlântica subcaducifólia e matas de Araucária das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e em São Paulo onde ocorreria a intergradação com *C.d. collilineatus* (CAMPBELL; LAMAR, 1989).



Figura 1 - Exemplar de macho adulto de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*)

A classificação zoológica da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) segundo Hoge et al. (1979) é a seguinte:

Filo: *CHORDATA*
Sub-Filo: *VERTEBRATA*
Classe: *REPTILIA*
Ordem: *SQUAMATA*
Sub-Ordem: *OPHIDEA* (SERPENTES)
Família: *VIPERIDAE*
Sub-Família: *CROTALINAE*
Gênero: *Crotalus* (LINNÉ, 1758)
Espécie: *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768)

Na região sudeste do Brasil, a cascavel (*C.d.t.*), uma serpente predominantemente noturna, é ativa do fim do verão ao início do inverno, se alimentando principalmente no verão e outono (SALOMÃO; SANTOS, 2002).

Segundo Sant'Anna (1999), a dieta alimentar da cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) é composta basicamente de mamíferos, sendo aproximadamente 70% de roedores silvestres, nativos ou introduzidos. Dentre os roedores nativos, os gêneros *Calomys*, *Bolomys* e *Oligoryzomys* foram os mais encontrados. São roedores terrícolas de regiões de vegetação aberta, que podem ocupar ambientes antrópicos, como campos de cultivo ativos ou abandonados. Em seguida os murídeos introduzidos (gêneros *Mus* e *Rattus*) representam os itens alimentares mais capturados pelas cascavéis, estando geralmente associados aos locais habitados pelo homem. Estas informações ilustram a importância da cascavel, exercendo um controle de roedores, tanto silvestres quanto sinantrópicos.

2.2 BIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA DE CASCAVEL:

Segundo Santos e Orsi (2002), a cascavel (*C.d.t.*) é um animal com ciclo reprodutivo sazonal, onde a fase de cópula ocorre no outono, como em outras espécies de cascavel da América do Norte, *Crotalus adamanteus*, *C. horridus*, *C. lepidus*, *C. molossus*, *C. pricei*, *C. viridis* e *C. willardi*. A ovulação e a fecundação acontecem na primavera, devido à armazenagem de espermatozóides durante o inverno, enquanto que os nascimentos estão concentrados no verão (SANTOS; FERREIRA, 1993).

Solórzano e Cerdas (1988) estudando a cascavel (*Crotalus durissus durissus*) na Costa Rica, relatam a concentração de nascimentos entre maio e agosto (estação chuvosa) enquanto que a cópula foi observada nos meses de janeiro e dezembro (estação seca).

O modo de reprodução da cascavel é conhecido como vivíparo (MARQUES; SAZIMA, 2003), ou seja, desenvolvimento fetal completo no ambiente uterino, permitindo que após o parto, o neonato seja capaz de movimentação e alimentação independentes (SHINE, 1985).

O período de gestação tem duração estimada entre 4 e 5 meses (SANTOS; FERREIRA, 1993). Fitch (1970) relata de 20 a 41 filhotes para *Crotalus durissus*, Solórzano e Cerdas (1988) 14 a 35 filhotes para *Crotalus durissus durissus*, Lira-de-Silva e Queiroz (1993) descreve uma ninhada de 23 filhotes de *Crotalus durissus cascavella*, e em outro estudo, Lira-da-Silva et al. (1993) observaram uma média de 15 filhotes por ninhada para esta mesma espécie.

2.3 BIOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO DE CASCAVEL

Existe a hipótese de que os machos de cascavel (*C.d.t*) têm a capacidade de reproduzir o ano inteiro (LANGLADA et al., 1991; MELLO; BELLUOMINI, 1965; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002) enquanto que as fêmeas apresentariam ciclos bienais, trienais e até menos freqüentes (LANGLADA, 1972).

Mello e Belluomini (1965) realizaram um acompanhamento da atividade testicular de cascavéis adultas (*C.d.t*) através do peso mensal médio do testículo. Nos meses de maio a setembro (outono/inverno) foram observados os menores pesos, sendo que o aumento do peso iniciou-se em outubro, atingindo o máximo em janeiro (verão). A presença de espermatozóide em esfregaço foi observada durante praticamente o ano inteiro.

Salomão e Almeida-Santos (2002) acompanharam a espermatogênese em cascavel (*C.d.t*) através da histologia testicular. Foi possível encontrar atividade espermatogênica entre setembro e março, com a maior atividade em janeiro, enquanto que a regressão testicular aconteceu no inverno, semelhante aos achados de Mello e Belluomini (1965).

A cascavel (*C.d.t*) apresenta comportamento de disputa entre os machos (dança combate), onde um indivíduo tenta subjugar o outro apenas com movimentos corporais sem agressões, que poderiam ser fatais (SANTOS; LAPORTA-FERREIRA; PUORTO, 1992). O macho vencedor tem a prioridade sobre a cópula com a fêmea.

2.4 ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTIVO DO MACHO DE SERPENTES

O testículo dos répteis é uma massa ovóide composta por túbulos seminíferos, células intersticiais e vasos sanguíneos, envolvidos por tecido conjuntivo (túnica própria), e as serpentes têm os testículos localizados na cavidade celomática, sendo o direito mais cranial que o esquerdo (DENARDO, 1996; NORRIS, 1996).

A presença de epidídimo em serpentes é constatada por alguns autores (ALDRIDGE; METTER, 1973; GOLDBERG; PARKER, 1975; LANGLADA et al., 1994; MITCHELL; ZUG, 1984; SAINT-GIRONS, 1994), mas não por DeNardo (1996). Os dutos deferentes ligam os testículos à papila genital na cloaca, próximo à base dos hemipênis, já que répteis não possuem uretra peniana (VASSE, 1994).

Os machos dos lagartos e das serpentes possuem inúmeras características que não são observadas em outros répteis (LANCE, 2003), como por exemplo, o órgão copulatório (hemipênis) que é duplo, sendo que apenas um dos pares é usado durante a cópula (FOX, 1977).

O macho da cascavel (*C.d.t.*) apresenta cada um dos hemipênis bilobado (Figura 2), com estruturas em forma de ganchos e papilas, usados possivelmente para fixação do hemipênis na vagina durante a cópula.

Apesar da ausência de órgãos sexuais acessórios, os machos das serpentes e lagartos apresentam uma região dos rins chamada de segmento sexual, que tem o papel de secretar substâncias que são essenciais na ativação e sobrevivência dos espermatozóides durante a cópula (CUELLAR; ROTH; FAWCETT, 1972; NORRIS, 1996; SAINT-GIRONS, 1994).



Figura 2 – Hemipênis de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*)

O desenvolvimento do segmento sexual do rim tem relação direta com os níveis plasmáticos de testosterona em *Agkistrodon piscivorus* (Boca-de-algodão) (JOHNSON et al., 1982), comportamento de cópula e a espermatogênese em *Trimeresurus stejnegeri stejnegeri* ("green tree viper") (TSAI; TU, 2000) e *Nerodia sipedon* (cobra d'água) (WEIL e ALDRIDGE, 1981).

Existem dados sobre as alterações de comportamento reprodutivo, segmento sexual do rim, tiróide, níveis de andrógenos testiculares e plasmáticos. No entanto, poucas informações estão descritas sobre alterações histológicas de dutos eferentes, epididimários e deferentes (SCHUETT, 1992).

Além disso, os estudos envolvendo aspectos reprodutivos das serpentes foram realizados em sua maioria com espécimes de museus, de várias regiões e em diferentes anos (SAINT GIRONS, 1982; SEIGEL; FITCH, 1985). Poucos estudos utilizaram amostras contínuas de áreas mais restritas (TSAI; TU, 2000).

2.5 ESPERMATOGÊNESE E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A espermatogênese nos répteis recomeça, na maioria das espécies, antes da estação reprodutiva e está completa pouco antes do inverno (NORRIS, 1996).

Tsai e Tu (2000) utilizaram uma classificação para caracterizar as fases da espermatogênese nas serpentes: Estágio 1 - túbulos seminíferos com presença, principalmente, de espermatogônias e espermatócitos primários, e alguns espermatócitos secundários e espermatídes; Estágio 2 - espermatozóides começam a surgir nos túbulos seminíferos; Estágio 3 - grande quantidade de espermatozóides, enquanto que espermatócitos secundários e espermatídes começam a desaparecer; Estágio 4 - diminuição do número de espermatozóides, presença de espermatogônias e espermatócitos primários; Estágio 5 - ausência de espermatozóides e uma ou duas camadas de espermatogônias ou espermatócitos primários.

Aldridge (1975) num estudo sobre o controle ambiental da espermatogênese na *Crotalus viridis* (Cascavel da Pradaria), comenta que o aumento da temperatura ambiental é um fator determinante para o início da espermatogênese, enquanto que o fotoperíodo não interferiu na atividade testicular em temperatura constante de 22°C. Em outro estudo, Aldridge (1979) constatou que a serpente *Arizona elegans* iniciou e concluiu a espermatogênese com aumento da temperatura ambiente sem influência do fotoperíodo, isto é, na ausência total de luz. Ainda não existem estudos dessa natureza em serpentes no Brasil.

Vários autores descreveram a morfologia do espermatozóide de serpentes através da ultra-estrutura (AUSTIN, 1965; HAMILTON; FAWCETT, 1968; JAMIESON; KOEHLER, 1994; OLIVER et al., 1996):

- Forma filiforme, acrossoma em forma de cone e cabeça alongada, distinção de medula e cortex acrossomal, bem como o *perforatorium* no espaço subacrossomal;
- Peça intermediária extremamente longa (característica exclusiva das serpentes) e envolvida por um sistema de multi-membranas. Estruturas chamadas de corpos densos (transformação mitocondrial) ao longo da peça intermediária;
- Presença de dois centríolos ao invés de um, como nos mamíferos em geral.

Apesar do grande número de observações da ultra-estrutura do espermatozóide, praticamente não existem descrições na literatura das alterações morfológicas como as observadas no sêmen de mamíferos (BARTH; OKO, 1989) e aves (CELEGHINI, 2000). Mengden et al. (1980) apresentaram apenas uma fotografia dos espermatozóides da serpente *Python anchietae* (Piton-de-Angola) com enrolamento da cauda devido à choque térmico.

2.6 HORMÔNIOS ANDRÓGENOS EM SERPENTES

A ordem squamata (lagartos e serpentes) contém os répteis que evoluíram mais recentemente e exibe a maior diversidade em morfologia, fisiologia, biologia em geral, incluindo padrões reprodutivos (LANCE, 2003).

As serpentes, por exemplo, possuem apenas uma gonadotrofina com propriedades biológicas dos hormônios foliculo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH)

(LICHT, 1984; NORRIS, 1996). Os hormônios andrógenos desempenham um importante papel na biologia reprodutiva dos machos dos répteis (LICHT, 1982), mas poucas informações estão disponíveis sobre as serpentes. Segundo Andò (1990), alterações sazonais na concentração de hormônios sexuais circulantes têm sido relatada em inúmeras espécies de répteis e essas alterações acontecem em paralelo com a variação de tamanho e histologia do testículo e órgãos sexuais acessórios.

A variação anual dos níveis de testosterona é semelhante entre as serpentes, quelônios e crocodilianos, onde o pico das concentrações coincide com o pico da espermatogênese (LANCE, 2003), porém nem sempre são observada a coincidência dos níveis elevados de testosterona sérica e comportamento de cópula em serpentes (MOORE; LINDZEY, 1992).

No quadro 1 estão representados os níveis de testosterona plasmática encontrados em serpentes e relatados na literatura:

Família	Espécie	Testosterona (ng/mL)	Referência
Elapidae	<i>Naja naja</i>	0,06 - 2,5	Bonna-Gallo et al. (1980)
Viperidae	<i>Agkistrodon contortix</i>	1,03 - 103,8	Schuet et al. (1997)
	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0,1 - 3,0	Johson et al. (1982)
	<i>Vipera aspis</i>	0,1 - 60,0	Naulleau et al. (1987)
	<i>Vipera berus</i>	0,51 - 45,0	Naulleau e Fleury (1988)
Colubridae	<i>Coluber viridiflavus</i>	3,9 - 45,0	Bonnet e Naulleau (1996)
	<i>Thamnophis sirtalis</i>	2,4 - 38,3	Weil (1985)
	<i>Thamnophis sirtalis concinnus</i>	2,0 - 88,0	Moore et al. (2000)
	<i>Nerodia sipedon</i>	0,1 - 21,5	Weil e Aldridge (1981)

Quadro 1 - Níveis de testosterona plasmática em serpentes, descritos na literatura

É importante salientar que o quadro anterior representa diversas metodologias utilizadas para mensuração da testosterona em serpentes, as quais serão oportunamente discutidas.

2.7 COLHEITA DE SÊMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM RÉPTEIS

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 ou formação de bancos de germoplasma de animais silvestres (WILDT, 1989).

Mendgen et al. (1980) relataram que a menor disponibilidade de animais e um aumento na restrição da importação de anfíbios e répteis, incentivaram zoológicos e criadores particulares a incrementarem a reprodução em cativeiro de inúmeras espécies. Essas instituições passaram a investir no controle das condições ambientais para favorecer a reprodução em cativeiro, porém limitações espaciais e financeiras, principalmente em grandes coleções, dificultaram essa alternativa.

A inseminação artificial é apontada por alguns autores como uma opção para otimizar a reprodução de répteis em cativeiro (LANGLADA, 1994; MENGDEN et al., 1980; PLATZ et al., 1980; QUINN et al., 1989).

Para a realização da inseminação artificial, uma etapa importante a ser desenvolvida é a padronização da colheita de sêmen. Larsen e Cardeilhac (1984) realizaram colheita de sêmen e inseminação artificial em *Alligator mississippiensis* (aligatores) enquanto Platz et al. (1980) realizaram em alguns quelônios: *Chelonia*

mydas (Tartaruga verde), *Testudo elephantopus* (Tartaruga-de-Galápagos) e *Pseudemys scripta elegans* (Tartaruga-orelha-vermelha). Mengden et al. (1980) descreveram pela primeira vez uma técnica para realização de tal procedimento em serpentes. As espécies utilizadas foram: *Elaphe subocularis* ("Ratsnake"), *E. obsoleta* ("Ratsnake"), *Epicrates inornatus* ("Rainbow boa"), *Eunectes notaeus* (Sucuri-amarela), *Python anchietae* (Piton-de-angola), *P. timoriensis* (Piton-do-timor), *Bitis gabonica* (Víbora-do-gabão) e *Notechis scutatus* (Cobra-tigre).

Um dos métodos descritos por Mengden et al. (1980) consistia na contenção física da serpente, limpeza da região cloacal com solução fisiológica (NaCl 0,9%) ou Ringer simples, exposição da papila genital na cloaca, e massagem sobre a região ventral da serpente, sendo que o sêmen foi colhido com auxílio de uma seringa de 1 mL. No outro método foi utilizada a estimulação elétrica antes do procedimento descrito anteriormente, mas o autor relata a contaminação do sêmen por fezes. Quinn (1989) descreveu a colheita de sêmen com auxílio da eletroejaculação e massagens ventrais subseqüentes em *Thamnophis marcianus* ("Checkered garter snake").

No único método descrito para cascavel (LANGLADA et al., 1991; LANGLADA et al. 1994), os machos sofriam a eutanásia para retirada dos dutos deferentes e o sêmen era colhido através da compressão dos dutos em uma placa de Petri.

As características seminais de serpentes descritas na literatura são: volume seminal de 0,06 mL a 0,10 mL, motilidade 50 a 70 % e vigor entre 4 a 5 para *Thamnophis marcianus* (QUINN et al., 1989); volume seminal de 0,8 a 1,0 mL e concentração média anual de $4,1 \cdot 10^6$ espermatozoides/mL para *Crotalus durissus* (LANGLADA, 1991).

A inseminação artificial foi realizada em serpentes com resultados satisfatórios apenas em *Bitis gabonica* (Víbora-do-gabão) (MENGDEN et al., 1980), *Tamnophis marcianus* ("Checkered Garter Snake") (QUINN et al., 1989) e *Crotalus durissus terrificus* (Cascavel) (LANGLADA et al. 1994), no qual os machos que forneciam o sêmen sofriam a eutanásia. Desde então nada mais foi relatado na literatura.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos principais:

- Padronizar uma técnica de colheita de sêmen para cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) sem a eutanásia do indivíduo;
- Padronizar a avaliação do espermograma em serpentes;
- Avaliar as características do espermograma e os níveis de testosterona sérica de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) recém chegados de natureza ao longo das estações climáticas, num período de 12 meses;
- Realizar a análise de correlação entre os dados de biometria, parâmetros seminais, níveis de testosterona sérica e temperatura de colheita das amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir estão descritos os materiais e as metodologias empregadas neste trabalho.

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste experimento foram utilizados 152 cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) machos com comprimento superior a 65 cm, que segundo Salomão e Santos (1993) foi o menor comprimento em que foram observados espermatozóides nos dutos deferentes. Todos os animais foram provenientes do Estado de São Paulo (Figura 3), sendo registrada a origem (município) dos mesmos. Esses animais foram capturados na natureza por sítiantes, trabalhadores rurais, entre outros, e enviados ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

A cascavel foi escolhida devido ao número e regularidade do aporte de indivíduos ao Laboratório de Herpetologia. Privilegiou-se a colheita de material, quando possível, num período máximo de 48 horas da chegada do animal ao Laboratório, para reduzir a influência do cativeiro.

Após as colheitas de material, os animais permaneceram no Instituto Butantan, seguindo o fluxo normal da rotina do Laboratório de Herpetologia.

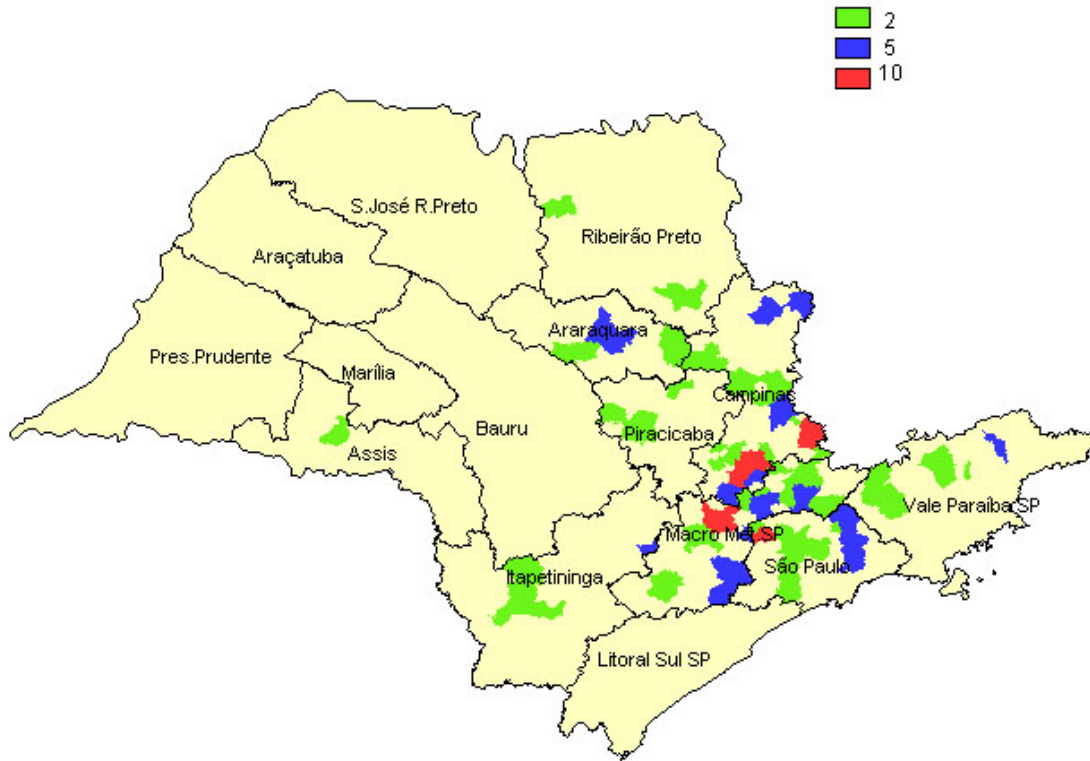


Figura 3 - Mapa do Estado de São Paulo dividido por macro-regiões. A legenda indica a quantidade de machos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) oriundos de cada município (áreas coloridas)

4.2 CONTENÇÃO FÍSICA E BIOMETRIA

As serpentes foram contidas fisicamente com auxílio de gancho e introduzidas em um tubo de plástico para a realização das colheitas. Foi realizada a pesagem e a biometria das serpentes (comprimento total), sendo os dados registrados em ficha padrão (ANEXO A).

4.3 COLHEITA DE SANGUE E SÊMEN

O sangue foi colhido logo após a contenção física, através da punção da veia caudal com auxílio de agulha e seringa descartáveis, sendo acondicionado em tubo plástico. O sangue foi centrifugado para obtenção do soro, sendo este armazenado em microtubo tipo eppendorf[®] em freezer à - 20°C, para mensuração hormonal posterior.

A colheita do sêmen foi realizada através da técnica descrita por Mengden et al. (1980) modificada pelo uso associado de anestesia local. Após a contenção física, a serpente recebia o anestésico local (dose total 1mL, Lidocaína 2%, Cristália, São Paulo) ao redor da cloaca, levando ao relaxamento da mesma em 15 minutos em média, permitindo a exposição da papila genital.

A colheita de sêmen era iniciada com uma massagem cuidadosa sobre a região ventral do animal no sentido crânio-caudal (Figura 4). O sêmen era colhido com auxílio de uma seringa plástica de 1 ml a partir da papila genital (Figura 5) e acondicionado em microtubo tipo eppendorf[®] para as avaliações posteriores.

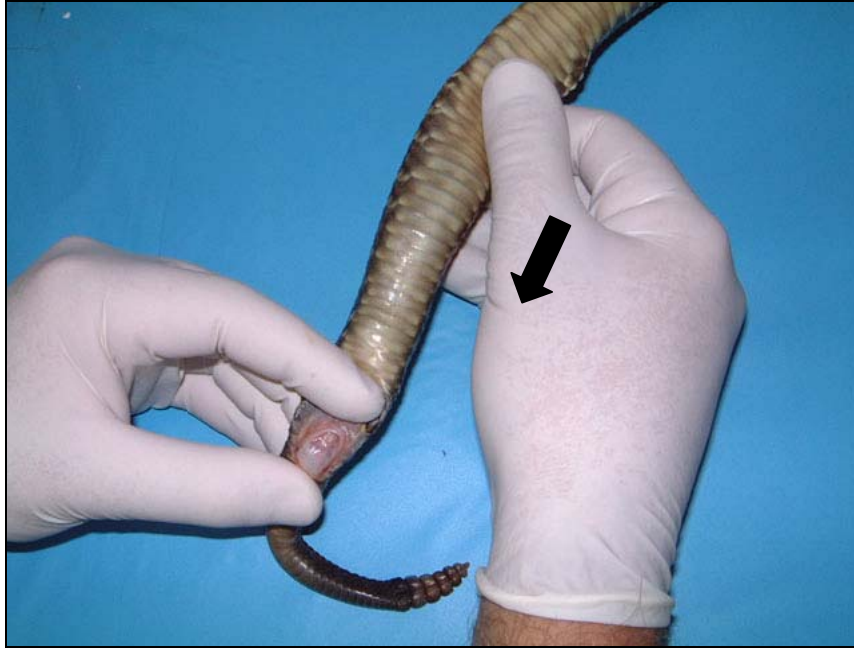


Figura 4 - Massagem ventral para colheita de sêmen em cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). A seta indica o sentido da massagem



Figura 5 - Colheita de sêmen em cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) a partir da papila genital localizada na cloaca

4.4 AVALIAÇÃO SEMINAL

Logo após a colheita, o sêmen foi avaliado conforme as seguintes características:

- **Volume:** estimativa da quantidade através do uso de micropipeta automática de volume variável (Finnpipete, Labsystem®, Finlândia).
- **Coloração:** verificação da coloração do sêmen no próprio tubo de colheita.
- **Motilidade e Vigor:** para avaliação do vigor e da motilidade, o sêmen foi previamente diluído (1/490) em meio de cultura de células (Ham – F10, Nutricell, Campinas), devido à sua alta concentração. As amostras foram avaliadas em microscópio de luz (Taimin, TM212B) sob aumento de 100 vezes. Foram utilizados os critérios definidos por Howard (1993) para a avaliação da motilidade e vigor. A motilidade foi definida levando-se em conta a proporção dos espermatozoides que apresentavam qualquer tipo de motilidade, numa escala de 0% (nenhum espermatozoide móvel) a 100% (todos os espermatozoides móveis). O vigor foi 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.

- **Concentração e morfologia espermática:** após a colheita, uma alíquota de 2 μ L de sêmen puro foi diluída em 980 μ L de solução formol salino. Essa amostra preservada em formol salino foi usada para determinação da concentração e avaliação morfológica dos espermatozóides. Para a determinação da concentração foi utilizado o método da câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de luz (Olympus BX 50) sob aumento de 400 vezes. A concentração foi expressa em bilhões de espermatozóides por mililitro (sptz. 10^9 /mL). Para avaliação morfológica, os defeitos encontrados foram classificados segundo a nomenclatura estabelecida para mamíferos (BARTH; OKO, 1989), uma vez que não existe uma nomenclatura padronizada para serpentes ou mesmo répteis. Os defeitos encontrados nos espermatozóides foram divididos em alterações de cabeça, peça intermediária e cauda como descrito para cães por Johnston (2002). Essa avaliação foi realizada em microscópio de luz sob interferência de fase (DIC) (Olympus BX50) e aumento de 1000 vezes.

4.5 COLORAÇÃO SIMPLES DE ACROSSOMA

Foi realizada com algumas amostras (n=33), a coloração simples do acrossoma através do método proposto por Pope, Zhang e Dresser (1991) para felinos. Esse método permite avaliar a integridade do acrossoma, classificando-o como:

- **Acrossoma Intacto:** região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal;

- Acrossoma ausente: região acrossomal de coloração rósea, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

Para a realização desta coloração, uma alíquota de 3 μ L do sêmen previamente diluído (1/490) em meio de cultura para células (Ham F-10, Nutricell, Campinas) era misturada a igual volume do corante e após tempo entre 90 e 120 segundos era realizado a extensão em lâmina. O material corado era avaliado em microscópio de luz (Olympus BX50) no aumento de 1000 vezes.

As avaliações de volume, cor, motilidade e vigor foram realizadas imediatamente após a colheita do sêmen, no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, enquanto que as demais avaliações foram realizadas no laboratório de Fisiologia Espermática do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ - USP. É importante salientar que todas as avaliações foram realizadas em temperatura ambiente, ou seja, sem a utilização de placa aquecedora ou platina aquecida. No entanto, todo o material que entrou em contato com o sêmen estava a temperatura ambiente, visando prevenir um possível choque térmico do material.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE TESTOSTERONA SÉRICA ATRAVÉS DE RADIOIMUNOENSAIO (RIE)

A quantificação da testosterona sérica foi realizada através da técnica de radioimunoensaio (RIE). O princípio desta técnica é baseado na reação antígeno-anticorpo, usando-se como competidor o hormônio (testosterona) marcado com I¹²⁵ (iodo radioativo). Após as etapas do ensaio, a radioatividade remanescente é detectada em um contador gama computadorizado (COBRA, MOD. AUTO-

GAMMA[®]), provido de *software* específico para o cálculo matemático dos resultados. Estes foram apresentados em nanogramas por mililitro.

Para a mensuração da testosterona sérica utilizou-se o conjunto diagnóstico de fase sólida, Coat-a-Count, DPC[®] (DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para quantificar a testosterona em soro humano. Todas as amostras foram quantificadas em duplicata. Para a verificação dos coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram utilizados pontos (um valor alto e um baixo) da curva padrão do conjunto diagnóstico. As retas obtidas foram comparadas para evidenciar a existência de paralelismo entre elas.

4.6.1 Validação da técnica

Foi realizada a validação dos conjuntos diagnósticos da DPC[®] para uso em soro de serpentes, uma vez que estes foram desenvolvidos para soro humano. O procedimento utilizado para validação foi o paralelismo utilizando matriz depletada. Esse método permite indicar se a matriz onde estão os hormônios mensurados (soro sanguíneo) está interagindo com o anticorpo do conjunto diagnóstico de forma similar ao hormônio usado como padrão.

A técnica utilizada consistiu em realizar a depleção hormonal de um "pool" de amostras de soro com carvão dextran. Em seguida, adicionou-se a esta matriz depletada, o hormônio padrão em diluições seriadas. A curva estabelecida nestas diluições foi comparada com a curva padrão do conjunto diagnóstico (mesmas diluições) por meio de uma análise de regressão simples.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do programa SAS - *system for windows* (SAS Institute, 2000).

Utilizando o aplicativo *Guided Data Analysis*, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Nos casos em que os dados não obedeceram a essas premissas, estes foram transformados e quando a normalidade não foi obtida utilizamos o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Caso os dados obedecessem às premissas, era realizada a análise de variância paramétrica (PROC GLM / Teste de Tukey).

Os resultados estão descritos através de média e erro padrão da média (média \pm EPM) dos dados e os níveis de significância (p) desses dados.

O nível de significância usado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, ou seja, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se diferenças estatísticas entre as variáveis-resposta.

A variável classificatória utilizada foi estação do ano (Primavera, Verão, Outono e Inverno).

Para efeito de análise estatística, as alterações morfológicas espermáticas foram divididas em defeitos de cabeça, de cauda, de peça intermediária e defeitos totais.

As variáveis-resposta incidência de defeitos de peça intermediária, incidência de defeitos totais e níveis testosterona sérica não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para o logaritmo de seus valores na base 10.

A variável volume seminal também não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo que a mesma foi obtida após transformação para a raiz quadrada de seus valores. Para esta variável foi necessária a retirada de um animal (0308/03), que se comportou como *outlier*.

A variável concentração espermática também não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo que a mesma foi obtida após transformação para seus valores elevados a -2 ($X^{**}-2$).

As variáveis-resposta incidência de defeitos de cabeça e cauda, motilidade e vigor, não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-las. Estas variáveis foram então analisadas através do *PROC NPAR1WAY* de análise de variância não paramétrica. Nestes casos, utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos, para a comparação dois a dois.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho.

5.1 RESULTADOS GERAIS

Na tabela abaixo estão descritos os resultados referentes aos parâmetros avaliados nos machos adultos de cascavéis utilizados neste experimento:

Tabela 1 - Valores médios, erro padrão e valores mínimo e máximo dos resultados da análise dos parâmetros estudados em machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo. São Paulo, 2004

	Média ±EPM	(mínimo-máximo)
Peso (g) (n=152)	560,09 ±18,80	205 - 1180
Comprimento (cm) (n=152)	95,19 ±0,94	75 - 121
Volume seminal (µL) (n=84)	18,49 ±2,04	0,02 - 97
Concentração (sptz.10⁹/ mL) (n=77)	1,39 ±0,080	0,24 - 4,70
Vigor (n=112)	2,7 ±0,10	0 - 4,0
Motilidade (%) (n=112)	60,26 ±2,49	0 - 95
Testosterona sérica (ng/mL) (n=116)	30,66 ±4,01	0,17 - 189,75
Defeitos espermáticos totais (%) (n=85)	28,53 ±1,63	5,0 - 91,0
Defeitos de cabeça (%) (n=85)	1,19 ±0,37	0 - 30,0
Defeitos de peça intermediária (%) (n=85)	21,68 ±1,25	3,0 - 63,50
Defeitos de cauda (%) (n=85)	4,41 ±0,39	0 - 18,50

5.2 BIOMETRIA DOS ANIMAIS

Nas tabelas abaixo estão representados os dados referentes ao comprimento e peso dos animais estudados, separados por estação climática:

Tabela 2 - Peso e comprimento (média \pm EPM) por estação climática de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo. São Paulo, 2004

Estação climática	(n)	Peso (g)	Comprimento (cm)
Verão	33	545,83 \pm 37,73 ^a	96,24 \pm 2,26 ^a
Outono	43	600,88 \pm 40,76 ^a	95,42 \pm 1,98 ^a
Inverno	31	519,84 \pm 34,44 ^a	95,83 \pm 1,68 ^a
Primavera	45	584,69 \pm 37,43 ^a	93,78 \pm 1,75 ^a

^a Letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa (P<0,05).

Não foram observadas diferenças estatísticas significantes para os valores de peso e comprimento dos animais ao longo das estações climáticas.

5.3 COLHEITA DE SÊMEN

No presente trabalho foi possível obter sêmen de 112 dos 152 animais estudados (Tabela 1). A tabela 3 apresenta os resultados de eficiência da colheita ao longo das estações climáticas.

Tabela 3 - Eficiência da colheita de sêmen em machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, dividida por estação climática. São Paulo, 2004

Estação climática	Total animais	Eficiência da colheita (n)	(%)
Verão	33	23	69,69
Outono	43	29	67,44
Inverno	31	27	87,09
Primavera	45	33	73,33

O menor macho de cascavel (*C.d.t.*) em que foram observados espermatozóides possuía 75 cm de comprimento total. O valor é pouco acima dos 65 cm de comprimento referidos por Salomão e Santos (1993), como o menor macho de cascavel (*C.d.t.*) que apresentou espermatozóides nos dutos deferentes ao exame histológico.

5.4 AVALIAÇÃO DO ESPERMOGRAMA

Na tabela a seguir estão representados os resultados referentes às variáveis de concentração e volume seminal dos animais estudados, separados por estação climática:

Tabela 4 - Concentração espermática e volume seminal (média \pm EPM) de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, divididos por estação climática. São Paulo, 2004

Estação climática	(n)	Concentração(sptz. 10^9 /mL)	Volume (μ L)
Verão	33	1,32 \pm 0,18 ^a	21,52 \pm 4,15 ^a
Outono	43	1,38 \pm 0,13 ^a	18,52 \pm 5,61 ^a
Inverno	31	1,68 \pm 0,15 ^a	15,73 \pm 2,81 ^a
Primavera	45	1,17 \pm 0,13 ^a	15,26 \pm 3,02 ^a

^a Letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Não foram observadas diferenças significantes nos valores de concentração espermática e volume seminal, embora no verão o volume seja ligeiramente maior que nas outras estações (Tabela 4).

Também não foi observada correlação significativa entre o tamanho dos animais (variáveis peso e comprimento) e o volume de sêmen colhido ou mesmo a concentração espermática.

Os dados de concentração e volume seminal observados diferem dos relatados por Langlada, Laporta-Ferreira e Santos (1991) para a cascavel (*C.d.t.*), 800 a 1000 μL para volume seminal e concentração média anual de $0,004 \cdot 10^9$ spz/mL. Porém, a colheita de sêmen realizada pelos autores citados consistia na remoção dos dutos deferentes e compressão dos mesmos em uma placa de Petri. A grande diferença entre as técnicas de colheita do sêmen pode explicar os resultados obtidos em nosso experimento (Tabela 4), com um volume seminal muito menor, mas a concentração muito maior. Possivelmente, a técnica descrita pelos autores citados obtém um volume maior de fluidos, que acabam por diluir o sêmen.

Quinn, Blasedel e Platz (1989) relataram um volume seminal entre 60 e 100 μL para *Thamnophis marcianus* ("Checkered garter snake"), utilizando uma técnica de colheita semelhante à nossa, valores esses, próximos aos encontrados em nosso experimento.

Na literatura alguns autores (LANGLADA; LAPORTA-FERREIRA; SANTOS, 1991; MELLO; BELLUOMINI, 1965; SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002) relatam que o macho da cascavel (*C.d.t.*) apresenta espermatozóides nos dutos deferentes o ano todo, e portanto, a capacidade reprodutiva seria contínua. Essa informação pode ser verdadeira em parte, pois apesar de verificarmos a presença de espermatozóides durante todo o ano, apenas a presença de espermatozóides não demonstra totalmente a capacidade reprodutiva de um animal.

Nas tabelas a seguir estão representados os valores de vigor e motilidade espermática nos animais estudados, separados por estação climática:

Tabela 5 - Motilidade e vigor espermáticos (média \pm EPM) de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, divididos por estação climática. São Paulo, 2004

Estação climática	(n)	Motilidade(%)	Vigor
Verão	33	62,65 \pm 4,50 ^a	2,65 \pm 0,22 ^a
Outono	43	63,88 \pm 4,43 ^a	2,96 \pm 0,17 ^a
Inverno	31	59,37 \pm 4,89 ^a	2,45 \pm 0,19 ^a
Primavera	45	55,00 \pm 6,00 ^a	2,70 \pm 0,22 ^a

^a Letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

Não foram observadas diferenças significantes nos valores de motilidade e vigor espermático nas diferentes estações climáticas.

Os valores encontrados para motilidade e vigor espermático da cascavel (*C.d.t.*) (Tabela 5) diferem dos relatados na literatura para outra serpente (*Thamnophis marcianus*) com motilidade entre 50 e 70% e o vigor entre 4 e 5 (QUINN; BLASEDEL; PLATZ, 1989). Não foram encontradas na literatura outras descrições sobre a motilidade e/ou vigor espermático em serpentes.

As avaliações de motilidade e vigor espermático foram realizadas imediatamente após a colheita e à temperatura ambiente, sem auxílio de platina aquecedora. Assim, um dos objetivos deste trabalho, foi verificar se existia relação entre as variáveis temperatura de avaliação das amostras, vigor e motilidade, através da análise de correlação.

Embora não tenha sido observada correlação entre motilidade e a temperatura de avaliação, foi encontrada uma correlação significativa de baixa intensidade ($p=0,038$ / $r=0,2143$) entre vigor espermático e a temperatura ambiente. Assim não foi possível afirmar que a temperatura ambiente tenha grande relação com a variação nos parâmetros seminais avaliados. As informações disponíveis sobre a colheita e avaliação de sêmen em répteis (LANGLADA; SANTOS; FERREIRA, 1994; LARSEN; CARDEILHAC, 1984; MENGDEN et al., 1980; PLATZ et

al., 1980; QUINN; BLASEDEL; PLATZ, 1989) não abordam a temperatura de avaliação do sêmen.

Essas informações sugerem que a temperatura de manipulação do sêmen em espécies animais ectotérmicas pode não ser tão importante como é em mamíferos, embora seja recomendável prevenir o choque térmico da amostra de sêmen.

Observamos uma correlação negativa de baixa intensidade entre o vigor e a concentração ($p=0,0137$ / $r= -0,2914$). Como a diluição prévia para a avaliação do vigor e motilidade era a mesma para todas as amostras (1/490), provavelmente a maior concentração de algumas amostras avaliadas dificultou o deslocamento do espermatozóide no campo, interferindo no parâmetro de vigor espermático.

5.5 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Realizou-se a avaliação da morfologia espermática de 85 amostras de sêmen da cascavel conservado em formol salino, e as alterações observadas são apresentadas no quadro 2.

Alterações de cabeça	Macrocefalia
	Microcefalia
	Gota proximal
	Acrossoma dobrado
	Cabeça solta anormal
Alterações de peça intermediária	Gota distal
	Enrolada
	Dobrada
	Fortemente dobrada
	Dobrada com gota
	Enrolada na cabeça
	Fratura de colo
Alterações de cauda	Cauda dobrada
	Fortemente dobrada
	Enrolada
	Cauda dupla

Quadro 2 - Alterações morfológicas observadas no espermatozóide de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) proveniente de natureza do Estado de São Paulo

Algumas das alterações morfológicas podem ser visualizadas na figura 6. Foram observadas algumas células com macrocefalia, múltiplas peças intermediárias e caudas, caracterizando uma forma teratológica (Figura 6-G). Não foi observada variação estatisticamente significativa na prevalência (%) desta alteração no sêmen dos machos de cascavel ao longo das estações climáticas.

Devido à ausência de informações na literatura sobre as alterações morfológicas do espermatozóide de serpentes, este trabalho apresenta possivelmente a primeira descrição detalhada destas alterações. No entanto, algumas das alterações observadas necessitam de uma avaliação mais detalhada.

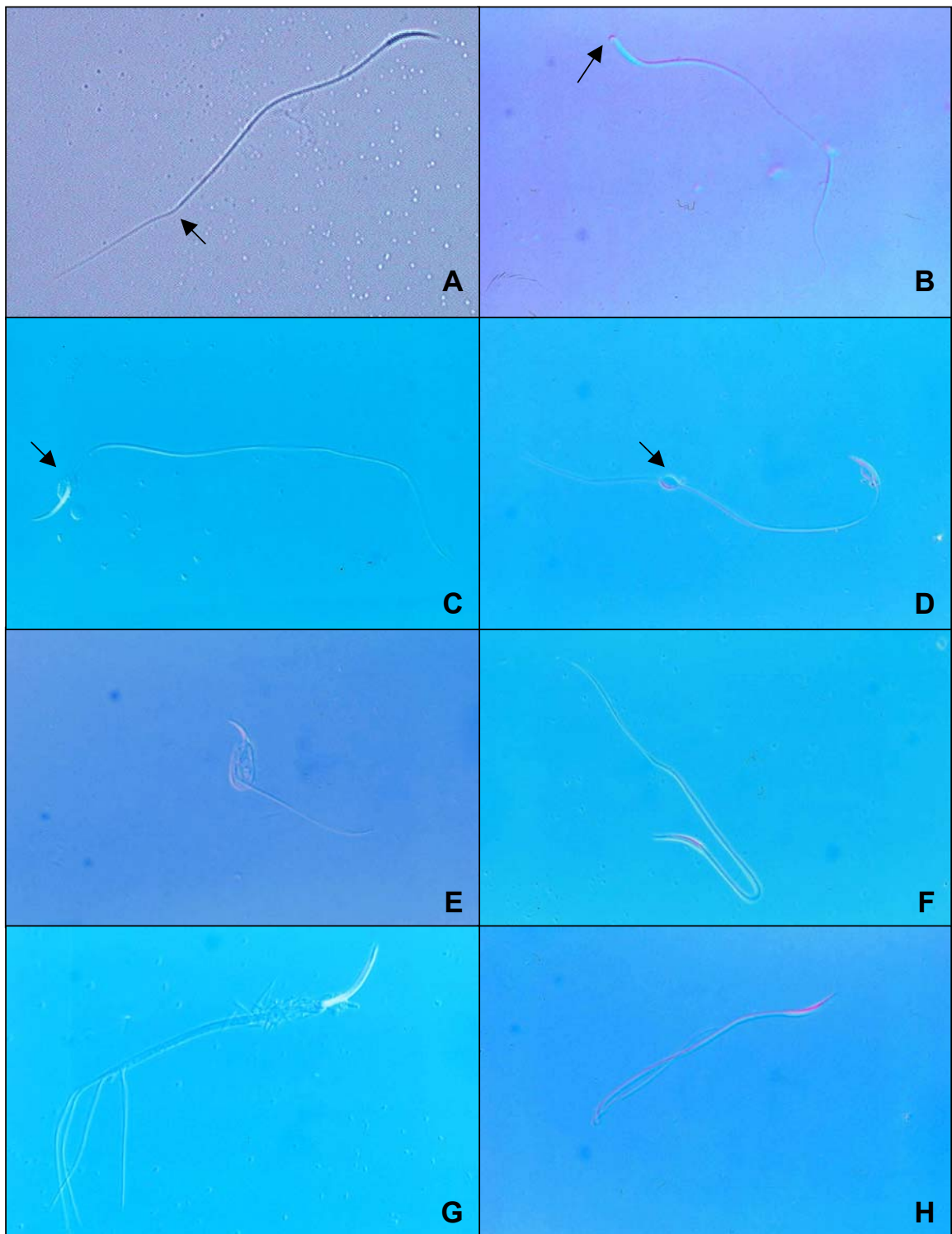


Figura 6 – Espermatozóide de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) sob microscopia de luz com interferência de fase (Olympus BX 50) e aumento da objetiva de 100 vezes. **A** – Espermatozóide normal. A seta aponta o fim da peça intermediária. (As setas nas fotos a seguir apontam as alterações morfológicas descritas) **B** – Acrossoma dobrado. **C** – Gota citoplasmática proximal. **D** – Gota citoplasmática distal. **E** – Peça intermediária enrolada. **F** – Peça intermediária dobrada. **G** – Forma teratológica. **H** – Cauda fortemente dobrada

A partir da observação, com auxílio de microscopia de luz, da gota citoplasmática nos espermatozoides de cascavel, não foi possível caracterizar com segurança a presença desta alteração. A gota citoplasmática nunca foi observada em espermatozoide de galo doméstico (*Gallus gallus*) (CELEGHINI, 2000) por exemplo, e sendo as aves filogeneticamente próximas dos répteis, é importante que essa alteração precise de avaliações mais detalhadas para sua caracterização. Assim sendo, a avaliação da ultra-estrutura sob microscopia eletrônica de transmissão, por exemplo, seria de grande valia para elucidação desta alteração.

A prevalência das alterações morfológicas foi avaliada ao longo das estações climáticas como pode ser observado na tabela a seguir:

Tabela 6 - Prevalência (média±EPM) das alterações morfológicas espermáticas observadas no sêmen de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes do Estado de São Paulo, ao longo das estações climáticas. São Paulo, 2004

	Defeitos totais (%)	Defeitos de cabeça(%)	Defeitos de peça-intermediária (%)	Defeitos de cauda (%)
Verão (n=25)	28,72 ±2,73 ^a	0,62 ±0,15 ^a	23,11 ±2,73 ^a	3,73 ±0,53 ^a
Outono (n=23)	28,53 ±1,83 ^a	0,84 ±0,35 ^a	22,21 ±1,49 ^a	4,86 ±0,86 ^a
Inverno (n=19)	42,35 ±4,18 ^b	3,53 ±1,70 ^a	29,24 ±2,08 ^a	6,77 ±1,05 ^a
Primavera (n=25)	17,67 ±2,45 ^c	0,36 ±0,10 ^a	13,73 ±2,28 ^a	2,89 ±0,52 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa (P<0,05).

Salomão e Almeida-Santos (2002) descrevem para os machos da cascavel (*C.d.t*), o início da espermatogênese na primavera, que tem seu pico de atividade no verão, com a fase de cópula ocorrendo no outono, enquanto que o inverno é um período de inatividade e até regressão testicular. Essa informação vem de encontro aos dados obtidos em nosso trabalho, pois a prevalência dos defeitos totais foi estatisticamente diferente nas estações climáticas. A maior porcentagem de defeitos

aconteceu no inverno e a menor na primavera, enquanto que o verão e o outono, valores intermediários, não diferiram entre si.

Foi possível demonstrar estatisticamente que durante a fase de cópula existe uma menor porcentagem de defeitos espermáticos totais em comparação com o inverno, embora não tenhamos observado a variação do volume seminal médio nas estações climáticas e tenhamos encontrado espermatozóides durante o ano todo. Esta informação sugere que os machos não apresentem a mesma capacidade reprodutiva durante o ano todo.

Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre os defeitos totais e as variáveis: volume seminal, concentração, vigor e motilidade. Os defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda analisados separadamente, também não apresentaram correlação estatisticamente significativa com nenhum dos parâmetros citados anteriormente.

A incidência de defeitos espermáticos pode estar correlacionada aos níveis séricos de testosterona em várias espécies animais (HAFEZ, 2004), no entanto não encontramos correlação estatisticamente significativa, embora a incidência de defeitos totais seja maior no inverno, período em que foram observados os menores níveis séricos de testosterona (Figura 7).

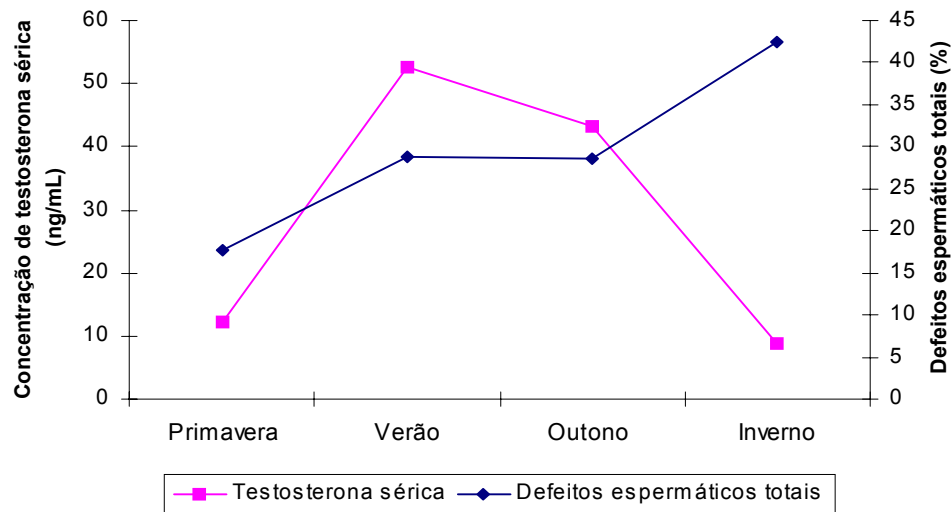


Figura 7 - Perfil da concentração sérica de testosterona e defeitos espermáticos totais em machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, ao longo das estações climáticas

Com relação à influência da temperatura ambiente sobre as alterações espermáticas, Mengden et al. (1980) relataram a observação de enrolamento de cauda em espermatozoides de *Python anchietae* (Piton-de-Angola) devido ao choque térmico. Em nosso trabalho, encontramos apenas uma tendência estatística negativa e de baixa intensidade ($p= 0,0542$ / $r= -0,2232$) entre os defeitos de cauda e a temperatura ambiente.

Essa informação pode reforçar a hipótese de que o espermatozoide de uma espécie animal ectotérmica não seja tão susceptível à temperatura ambiente baixa quanto em endotérmicos (mamíferos e aves).

5.6 COLORAÇÃO SIMPLES DE ACROSSOMA

Foi realizada a coloração simples de acrossoma (POPE; ZHANG; DRESSER; 1991) em algumas amostras (n=33) de sêmen. Como essa coloração não era objetivo do trabalho proposto, não foi realizada a validação do método para o espermatozóide da cascavel (*C.d.t.*). No entanto existem evidências de que o método possa ser utilizado, pois foi possível observar a coloração de uma estrutura compatível com o acrossoma (Figura 8).

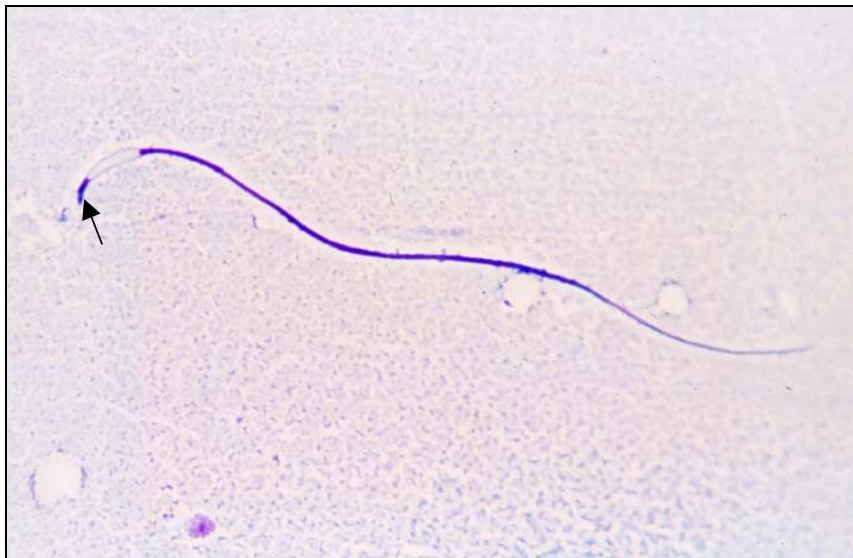


Figura 8 - Espermatozóide normal de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) corado através da coloração simples de acrossoma. A seta aponta o acrossoma corado (Microscópio de luz, Olympus BX 50, objetiva 100X)

5.7 QUANTIFICAÇÃO DE TESTOSTERONA SÉRICA NOS MACHOS DE CASCAVEL

A seguir serão apresentados e discutidos os dados referentes à quantificação de testosterona sérica em machos de cascavel (*C.d.t.*).

5.7.1 Validação dos conjuntos diagnósticos

Foi possível validar os conjuntos diagnóstico para mensuração de testosterona através de radioimunoensaio (DPC/MEDLAB[®]) em soro de cascavel (*C.d.t.*). Foi encontrado paralelismo entre as curvas de diluição em soro de cascavel e a curva do conjunto comercial, com $r=0,98$ e $p<0,05$ (Figura 9).

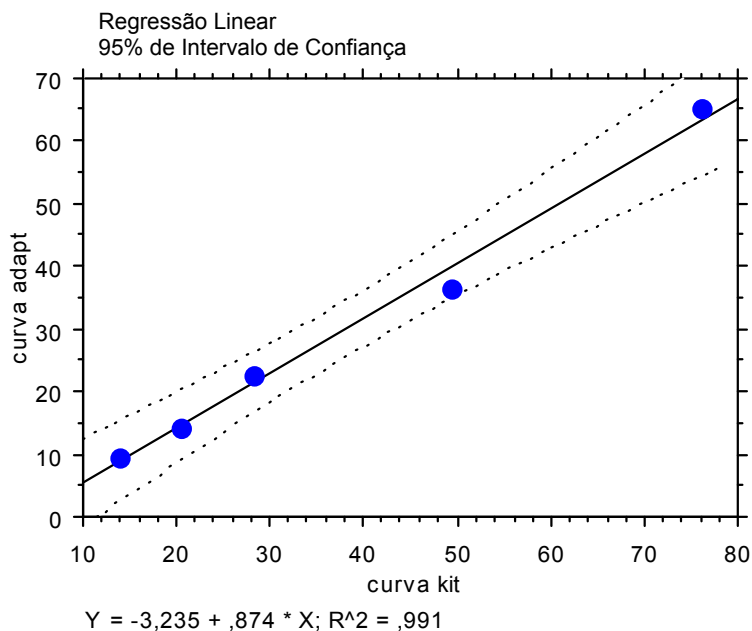


Figura 9 - Demonstração gráfica da validação do conjunto diagnóstico DPC[®] para a quantificação de testosterona sérica de machos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*)

5.7.2 Controle de qualidade do Radioimunoensaio

No caso dos ensaios para mensuração da testosterona sérica em cascavéis, a média dos coeficientes de variação intra-ensaio baixo foi de 11,05% e do intra-ensaio alto foi 2,76%. A sensibilidade média dos ensaios foi de 93,43%.

5.7.3 Perfil da testosterona sérica

Embora alguns autores (ANDÒ et al., 1990; BONA-GALLO et al., 1980; JOHNSON; JACOB; TORRANCE, 1982) tenham utilizado recursos como extração dos esteróides séricos com éter, denaturação da proteína carreadora de andrógeno por calor, previamente à quantificação hormonal por radioimunoensaio, os valores séricos médios de testosterona encontrados em nosso experimento estão dentro do intervalo observado em serpentes (Quadro 1), mesmo sem qualquer protocolo de extração.

Encontramos uma correlação significativa positiva e de baixa intensidade ($p=0,0162$ / $r=0,2320$) entre os níveis séricos de testosterona e o peso dos animais estudados. Em várias espécies existe a correlação dos níveis de testosterona e peso, graças ao efeito anabólico deste hormônio (HAFEZ, 2004).

Schuett et al. (1997) relataram que existem evidências de que os níveis elevados de esteróides sexuais, como andrógenos e estrógenos, ativam e mantêm o comportamento de combate entre os machos de serpentes, sob controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Ainda, Almeida-Santos e Salomão (2002) sugerem que a tendência da manifestação do comportamento de combate entre os machos está

associada a espécies que apresentam dimorfismo sexual, sendo os machos maiores que as fêmeas (ex: *Agkistrodon sp*, *Bitis sp*, *Crotalus sp*, *Calloselasma sp*, *Sistrurus sp*, *Trimeresurus sp* e *Vipera sp*).

Como descrito anteriormente, a cascavel apresenta o comportamento de combate entre os machos. Provavelmente, os níveis mais altos de testosterona favorecem um maior desenvolvimento da massa muscular (característica sexual secundária), sendo que os machos mais robustos teriam maiores chances de cópula.

Neste experimento foi observada uma correlação significativa de baixa intensidade ($p=0,0254$ / $r=0,2224$) entre os níveis séricos de testosterona e a temperatura ambiente no momento da colheita do sangue.

As serpentes têm toda a sua fisiologia influenciada pela temperatura ambiente (FUNK, 1996). A temperatura ambiente em que foi realizada a colheita do sangue, variou ao longo do ano entre 20 e 29°C, o que pode ter influenciado nos níveis séricos de testosterona. No entanto, esses níveis apresentaram-se relacionados a algumas alterações das características seminais e aos eventos biológicos reprodutivos, de cópula e espermatogênese descritos em literatura (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS, 2002).

Não foram observadas correlações significantes entre os níveis séricos de testosterona e as variáveis: comprimento total da serpente, volume seminal, concentração espermática e os defeitos espermáticos.

Na tabela a seguir estão representados os valores dos níveis séricos de testosterona encontrados nos machos de cascavel ao longo das estações climáticas.

Tabela 7 - Níveis séricos de testosterona (média±EPM) de machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, divididos por estação climática. São Paulo, 2004

Estação climática	(n)	Testosterona sérica (ng/mL)
Verão	32	52,60 ^a ±9,24
Outono	31	43,12 ^a ±8,89
Inverno	20	08,89 ^b ±3,81
Primavera	35	12,09 ^b ±3,58

^{a,b} Letras diferentes representam valores com diferença estatística significativa ($P < 0,05$).

As descrições de Salomão e Almeida-Santos (2002) para o ciclo reprodutivo dos machos da cascavel (*C.d.t.*) estão de acordo com os níveis séricos de testosterona encontrados em nosso trabalho. Os maiores níveis observados foram no verão e outono, pico da atividade de espermatogênese e fase de cópula, respectivamente. No inverno, fase de inatividade e até regressão testicular, foram verificados os menores níveis.

Moore e Lindzey (1992) descrevem basicamente duas estratégias reprodutivas em répteis: o padrão associado, onde a maior atividade gonadal coincide com a fase de cópula, e o dissociado que não apresenta essa coincidência.

No gráfico (Figura 10) a seguir, é possível observar os níveis séricos de testosterona e a fase de cópula nas cascavéis de nosso experimento.

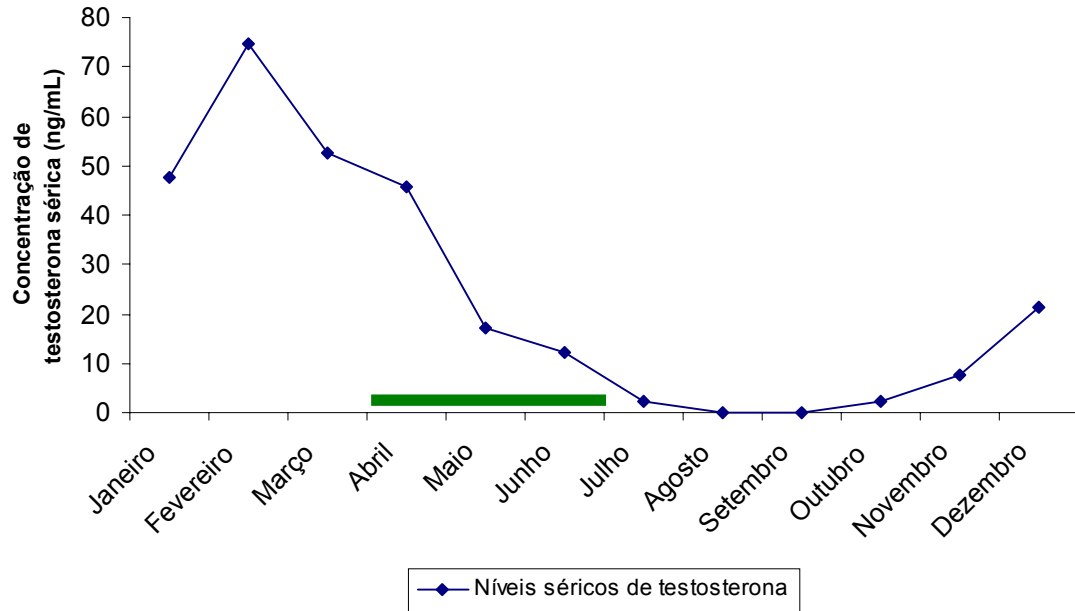


Figura 10 - Perfil da concentração média de testosterona sérica de 116 machos adultos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) provenientes de natureza do Estado de São Paulo, durante 12 meses. A linha verde indica a fase de cópula nesta espécie

Como pudemos observar no gráfico acima, o macho de cascavel (*C.d.t.*), provavelmente, tem uma estratégia reprodutiva com o padrão associado. Os níveis séricos de testosterona mostraram-se elevados durante o verão, que corresponde ao período de maior atividade espermato gênica. Durante o período de cópula (outono), os níveis hormonais começam a cair, sendo que fora da estação reprodutiva os níveis hormonais são basais.

Johnson, Jacob e Torrance (1982) observaram uma coincidência entre os níveis plasmáticos de testosterona e a espermatogênese em *Agkistrodon piscivorus* (Boca de algodão), onde os níveis mais elevados estavam relacionados à alta atividade espermatogênica. Bona-Galo et al. (1980) encontraram um único pico de testosterona plasmática, com valores similares em *Naja naja* (cobra naja).

Weil e Aldridge (1981) encontraram dois picos de testosterona plasmática em *Nerodia sipedon* (cobra d'água), um coincidindo com a hipertrofia do segmento sexual e atividade de cópula e o outro com o máximo da atividade espermatogênica.

Foi observada uma correlação significativa positiva e de baixa intensidade entre os parâmetros espermáticos de vigor ($p=0,0214$ / $r=0,2585$), motilidade ($p=0,0126$ / $r=0,2742$) e os níveis de testosterona sérica.

A testosterona, em mamíferos, pode atuar dentro dos túbulos seminíferos modificando a quantidade de células espermáticas (ZIRKIN, 1998), enquanto que no epidídimo, influencia a síntese e secreção do epitélio e, conseqüentemente os processos de transporte e maturação do espermatozóide, principalmente os ligados à motilidade espermática (HARPER, 1994; SETCHELL et al., 1994; YANAGUIMACHI, 1994). Em lagartos, a secreção do segmento sexual do rim, fortemente influenciada pela testosterona (JOHNSON et al., 1982), aumenta a motilidade espermática, possivelmente provendo nutrientes ou ativando o espermatozóide (CUELLAR; ROTH; FAWCETT, 1972).

Assim, essa correlação observada entre os parâmetros de motilidade espermática e a testosterona sérica, pode ser devido às alterações que este hormônio provoca tanto na espermatogênese e maturação espermática, quanto no segmento sexual do rim, onde existe a secreção de substâncias que irão compor o ejaculado nas serpentes e lagartos.

Os níveis de testosterona no sangue parecem refletir a atividade espermatogênica e interferir no comportamento reprodutivo em várias serpentes, inclusive a cascavel (*C.d.t.*).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de colheita de sêmen utilizada em nosso experimento mostrou-se viável, abrindo espaço para o desenvolvimento de pesquisas com a criopreservação deste sêmen e mesmo a inseminação artificial.

As informações obtidas poderão servir de base para comparação com grupos de cascavéis mantidas em cativeiro, auxiliando na avaliação andrológica e seleção de reprodutores.

Os dados obtidos sobre os níveis de testosterona em cascavéis constituem informações preciosas, até agora inexistentes para serpentes neotropicais.

A variação dos níveis de testosterona sérica e defeitos espermáticos totais nos machos de cascavel de nosso experimento são informações que podem indicar uma capacidade reprodutiva maior apenas durante a fase de cópula, e não durante todo o ano. No entanto, seria ideal realizar uma avaliação dos níveis de testosterona sérica e parâmetros seminais de um mesmo indivíduo, durante um período mais longo que 12 meses, para esclarecer tal hipótese. As avaliações funcionais do espermatozóide auxiliarão ainda mais na compreensão da fisiologia reprodutiva no macho da cascavel.

Finalizando, com este trabalho esperamos ter aberto um grande campo a ser explorado dentro da Medicina Veterinária.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Foi possível concluir que:

- O método empregado para colheita de sêmen em cascavéis mostrou-se eficiente;
- Foi possível padronizar os métodos para avaliação do sêmen em serpentes;
- Foi possível quantificar a testosterona sérica das cascavéis validando conjuntos diagnósticos comerciais desenvolvidos para humanos;
- Os níveis de testosterona sérica no verão e outono são significativamente maiores do que os encontrados no inverno e primavera.
- Os resultados das mensurações de testosterona sérica sugerem que os machos das cascavéis apresentam uma estratégia reprodutiva com padrão associado.
- A prevalência de defeitos espermáticos totais apresentou diferença significativa entre as estações climáticas verão e outono e as demais.
- O inverno apresentou a maior prevalência de defeitos espermáticos totais ao longo do ano.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALDRIGE, R. D. Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, v. 3, p. 493-496, 1975.

ALDRIGE, R. D. Seasonal spermatogenesis in sympatric *Crotalus viridis* and *Arizona elegans* in New Mexico. **Journal of Herpetology**, v. 13, n. 2, p. 187-192, 1979.

ALDRIDGE, R. D.; METTER, D. E. The reproductive cycle of the western worm snake, *Carphophis vermis*, in Missouri. **Copeia**, p. 472-477, 1973.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the vipers**. Texas: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 445-462.

ANDÒ, S.; PANNO, M. L.; GIARCIA, G.; IMBROGNO, E.; BUFFONE, M.; BERARDI, E.; SISCI, D.; ANGELINI, F.; BOTTE, V. Plasma sex hormone concentrations cycle in the male lizard, *Podarcis s. sicula*. **Journal of Reproduction & Fertility**. v. 90, p. 353-360, 1990.

AUSTIN, C. R. Fine structure of the snake sperm tail. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 12, p. 452-462, 1965.

BARKER, D. G. Variations, intraspecific relationships and biogeography of the ridgnose rattlesnake, *Crotalus willardi*. In: CAMPBELL, J. A.; BROODIE, E. D. **Biology of pitvipers**. Texas: Selva, 1992. p. 89-105

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames : Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BONNA-GALLO, A. ; LICHT, P. ; MACKENZIE, D. S. ; LOFTS, B. Annual cycles in levels of pituitary and plasma gonadotropin, gonadal steroids, and thyroid activity in the Chinese Cobra (*Naja naja*). **General and Comparative endocrinology**. v. 42, p. 477-493, 1980.

BONNET, X.; NAULLEAU, G. Are body reserves important for reproduction in male dark green snake (Colubridae, *Coluber viridiflavus*). **Herpetologica**. V. 52, 137 – 146, 1996.

BRASIL. Ministério Da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 1998. 131 p.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Ithaca: Cornell University Press, 1989. 425 p.

CELEGHINI, E. C. C. **Avaliação do método de seleção de galos (*Gallus gallus domesticus*) para a reprodução pelo desenvolvimento da crista com relação à idade à puberdade, características seminais e testiculares**. 2000. 84 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

CUELLAR, H. S.; ROTH, J. J.; FAWCETT, J. D. Evidence for sperm sustenance by secretions of the renal sexual segment of male lizards, *Anolis carolinensis*. **Herpetologica**, v. 28, n. 1, p. 53-57, 1972.

DeNARDO, D. Reproductive biology. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p. 212-224.

EBENHARD, T. Conservation breeding as a tool for saving animal species from extinction. **Tree**, v. 10, n. 11, p. 438-443, 1995.

FITCH, H. S. **Reproductive cycles of lizards and snakes**. Museum of Natural History of University of Kansas. 1970

FOX, H. The urogenital system of reptiles. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. **Biology of reptilia**. New York: Academic Press, 1977. p. 1-157.

FUNK, R. S. Snakes. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p. 39-46.

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

GONÇALVES, J. M. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras II – *Crotalus durissus crotaminicus*, subespécie biológica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 28, n. 3, p. 365-367, 1956.

GRANTSAU, R. **As cobras venenosas do Brasil**. São Bernardo do Campo: Bandeirante, 1989, 101 p.

GREENE, H. W.; CAMPBELL, J. A. The future of pitvipers. In: CAMPBELL, J. A.; BROODIE, E. D. **Biology of pitvipers**. Texas: Selva, 1992.

GREENE, H. W. **Snakes: the evolution of mystery in nature**. Berkeley: University of California Press, 1997. 366 p.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

HARPER, M. J. K. Gamete and zygote transport. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 123-187.

HAMILTON, D. W.; FAWCETT, D. W. Unusual features of the neck and middle-piece of snake spermatozoa. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 23, p. 81-97, 1968.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine current therapy**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. p. 390-399.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção 2003**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 20 maio 2003.

IUCN - International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources. **Red list of threatened species**. Disponível em: <<http://www.iucn.org/redlist/2000/background.html>> . Acesso em: 20 maio 2003.

JAMIESON, B. G. M.; KOELER, L. The ultrastructure of the spermatozoon of northern water snake, *Nerodia sipedon* (Colubridae, Serpentes), with phylogenetic considerations. **Canadian journal of Zoology**, v. 72, p.1648-1652, 1994.

JOHNSON, L. F.; JACOB, J. S.; TORRANCE, P. Annual testicular and androgenic cycles of the cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus*) in Alabama. **Herpetologica**, v. 38, n. 1, p. 16-25, 1982.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. Pomona: W. B. Saunders, 2002. 500 p.

KOLESNIKOVAS, C. K. M. **Patologia comparada de cascavéis (*Crotalus durissus, Laurenti, 1768*) mantidas em cativeiro**. 1997. 60 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

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.

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.

LANGLADA, F. G.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; SANTOS, S.; Atividade espermática de *Crotalus durissus* e a capacidade de fecundação. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 63, n. 4, p. 427, 1991

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.

LICHT, P. Reptiles. In: LAMMING, G. E. . **Marshall's physiology of reproduction**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984. p. 206-282.

LICHT, P. Endocrine patterns in the reproductive cycles of turtles. **Herpetologica**, v. 38, p. 51-61, 1982.

LIRA-DE-SILVA, R. M.; QUEIROZ, I. B. Observações sobre a biologia reprodutiva de *Crotalus durissus cascavella* (SERPENTES: VIPERIDAE) em cativeiro - acompanhamento de uma ninhada. Congresso Latino-Americano de Herpetologia, 3., 1993, Campinas. **Anais...**, p. 153.

LIRA-DE-SILVA, R. M.; CASAIS-E-SILVA, L.; QUEIROZ, I. B.; NUNES, T.B. Contribuição à biologia reprodutiva de serpentes do estado da Bahia, Brasil: Vivíparas. Congresso Latino-Americano de Herpetologia, 3., 1993, Campinas. **Anais...**, p. 152.

MANCIN, A. C.; SOARES A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FAÇA, V. M.; GREENE, L. J.; ZUCCOLOTTO, I. R. P.; GIGLIO, J. R. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxic venom from *Crotalus durissus terrificus* (south american rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1927-1937, 1998.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Biologia das serpentes. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALÁQUE, C. L. S.; HADDAD, V. **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Sarvier, 2003.

MELLO, R. F.; BELLUOMINI, H. E. Ciclo anual da atividade testicular em *Crotalus d. terrificus*. **Ciência e Cultura**, v. 17, n. 2, p. 223, 1965.

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.

MITCHELL, J. C.; ZUG, G. R. Spermatogenic cycle of *Nerodia taxispilota* (SERPENTES:COLUBRIDAE) in southcentral Virginia. **Herpetologica**, v. 40, n. 2, p. 200-204, 1984.

MONTEGOMERY, W. B.; SCHUET, T. G. W. Autumnal mating with subsequent production of offspring in the rattlesnake *Sistrurus miliaris streckeri*. **Bulletin of Chicago Herpetological Society**, v. 24, n. 11, p. 205-207, 1982.

MOORE, I. T.; LERNER, J. P.; LERNER, D. T.; MASON, R. T. Relationships between annual cycles of testosterone, corticosterone, and body condition in male red-spotted garter snake, *Thamnophis sirtalis concinnus*. **Physiological and Biochemical Zoology**. V. 73, n. 3, p. 307-312, 2000.

MOORE, M. C.; LINDZEY, J. The physiological basis of sexual behavior in male reptiles. In: GANS, C.; CREWS, D. **Hormones, brain and behaviour - biology of reptilia**. Chicago: The University of Chicago Press, 1992. p. 70-113.

NALLEAU, G.; FLEURY, F. Cycles annuels de la testostéronémie et de la thyroïdémie chez *Vipera berus* L. (Reptilia: Viperidae) en relation avec le cycle sexuel et l'hivernage. **Amphibia-Reptilia**, v.9, p. 33-42, 1988.

NALLEAU, G.; FLEURY, F.; BOISSIN, J. Annual cycles in plasma testosterone and thyroxine in the male asp viper *Vipera aspis* L. (Reptilia, Viperidae), in relation to hibernation. **Amphibia-Reptilia**

NORRIS, D. **Vertebrate endocrinology**. San Diego: Academic press., 1996. 634 p.

OLIVER, S. C.; JAMIESON, B. G. M.; SCHELTINGA, 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.

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 fo American Association of Zoo Veterinarians, 1980. **Proceedings...** American Association of Zoo Veterinarians, 1980. p. 47-54.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrossosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo And Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

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

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykin, a hipotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and tripsin. **American Journal of Physiology**. v. 156, p. 261-273, 1949.

SAINT GIRONS, H. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycle. **Herpetologica**, v. 38, p. 5-16, 1982.

SAINT-GIRONS, H. Reproduction and growth. In: BAUCHOT, R. **Snakes - a natural history**. New York: Sterling Publishing, 1994. p. 92.

SALOMÃO, M. G.; SANTOS, S. M. A. Spermatogenesis and Cytological changes in the hipophysis of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae). In: Congresso Latino-Americano de Herpetologia, 3., 1993, Campinas. **Anais...**, p. 44.

SALOMÃO, M.G; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of male neotropical rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. **Biology of the vipers**. Texas: Eagle Mountain Publishing, 2002. p. 507-514.

SANTOS, S. M. A.; FERREIRA, I. L. L. Fatores moduladores do ciclo reprodutivo feminino em *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae). In: Congresso Latino-Americano de Herpetologia, 3., 1993, Campinas. **Anais...**, p. 186.

SANTOS, S.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; PUORTO, G. Ritual de combate em *Crotalus durissus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, vol. 62, n. 4, p. 418, 1992.

SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Biología reproductiva de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* (Serpentes:Viperidae) en Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 36, n. 2A, p. 221-226, 1988.

SHINE, R. The evolution of viviparity in reptiles: na ecological analysis. In: **Biology of the reptilia: development B**. New York: Wiley and Sons, 1985. p. 605-694.

SANT'ANNA, S. S. **Hábito alimentar da cascavel (*Crotalus durissus*) no Sudeste Brasileiro (Serpentes, Viperidae)**. 1999. 64 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1999.

SCHUETT, G. W. Is Long-term sperm storage na important component of the reproductive biology of temperate pitvipers In: CAMPBELL, J. A.; BROODIE, E. D. **Biology of pitvipers**. Texas: Selva, 1992. 467 p.

SCHUETT, G. W.; HARLOW, H. J.; ROSE, J. D.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Annual cycle of plasma testosterone in male cooperheads, *Agkistrodon contortix* (Serpentes, Viperidae); relationship to timing of spermatogenesis, mating and agonistic behaviour. **General and Comparative Endocrinology**, v. 105, p. 417-424, 1997.

SEIGEL, R. A.; FITCH, H. S. Annual variation in reproduction in snakes in a fluctuating enviroment. **Journal of Animal Ecology**. v. 54, p. 497-505, 1985.

SEIGEL, R. A.; FORD, N. B. Reproductive ecology. In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. **Snakes: ecology and evolutionary biology**, New York: McGraw-Hill, 1987. p. 210-252.

SETCHELL, B. P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D. E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 1063-1175.

SLIP, D. J.; SHINE, R. The reproductive biology and mating system of diamond pythons, *Morelia spilota* (Serpentes: *Boidae*). **Herpetologica**, v. 44, p. 396-404, 1988.

TEIN-SHUN TSAI; MING-CHUNG TU. Reproductive cycle of male chinese green tree vipers, *Trimeresurus s. stejnegeri*, in Northern Taiwan. **Journal of Herpetology**, v. 34, n.3, p.424-430, 2000.

VASSE, Y. Hemipenes. In: BAUCHOT, R. **Snakes - a natural history**. New York: Sterling Publishing, 1994. p. 102.

YANAGUIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New york:: Raven Press, 1994. p. 189-317.
ZIRKIN, B. R. Hormonal control of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. San Diego: Academic Press, 1998. v. 4, p. 556-563.

WEIL, M. R. Comparison of plasma and testicular testosterone levels during the active season in the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 81A, p. 585-587, 1985.

WEIL, M. R.; ALDRIDGE, R. A. Seasonal androgenesis in the male water snake, *Nerodia sipedon*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 44, p. 44-53, 1981.

WILDT, D. E. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. **Zoo Biology**, v. 1, p. 17-20, 1989. Supplement.

ANEXO A

n^o

DATA DE COLHEITA:

ESPÉCIE:

DATA DE CHEGADA:

PESO (g):

COMP. (cm):

TEMP. AMBIENTE (°C):

ESTADO GERAL:

PROCEDÊNCIA:

COLHEITA DE MATERIAL: sangue total () soro () sêmen () outros:

ESTAÇÃO DO ANO:

AVALIAÇÃO DA ANESTESIA:

OBS:

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Volume (µl):	Vigor (0-5):
Motilidade (%):	Coloração:
Concentração (milhões/ml):	Diluição:
Obs.:	

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Defeitos de cabeça (%):	Defeitos de peça intermediária (%):	Defeitos de cauda (%):
Defeitos totais (%):		

OBS: