



Aplicações da biotecnologia na reprodução de serpentes

Application of biotechnology in snake reproduction

R.L. Zacariotti^{1,3}, M.A.B.V. Guimarães²

¹Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Cruzeiro do Sul, 08070-060, São Paulo, SP, Brasil.

²Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.

³Correspondência: rogeriozacariotti@yahoo.com.br

Resumo

O crescente número de espécies de serpentes ameaçadas de extinção, estudos sobre suas toxinas, entre outros motivos, tornam a reprodução em cativeiro desses animais muito importante. Todavia, a ausência de cópulas ou problemas com a concepção são questões que dificultam a reprodução em cativeiro. A reprodução assistida em serpentes pode ser uma importante ferramenta para modificar essa realidade. Sêmen foi obtido pela primeira vez em serpentes pela compressão do terço final do corpo do animal, no entanto é comum a contaminação das amostras por fezes e urato. Em geral, os relatos da coleta de sêmen consistem na realização de massagens digitais ventrais no terço final do animal e posterior coleta utilizando-se uma seringa na região da cloaca. Poucas publicações contemplam a avaliação, o resfriamento ou a congelamento de sêmen em serpentes. Meios de cultura de células como M199 e Ham's F 10, diluidores como Test-gema, à base de leite ou água de coco, são alguns dos exemplos citados na literatura, porém seu uso ainda apresenta limitações e grande variabilidade nos resultados. Até o momento, não existe um protocolo eficiente para a congelamento do sêmen em serpentes. A inseminação artificial utilizando sêmen fresco ou resfriado está descrita em poucas espécies de serpentes, com poucos resultados satisfatórios. Assim, a biotecnologia na reprodução de serpentes, apesar de ainda ser pouco utilizada, pode ser uma ferramenta muito importante para conservação dessas espécies em cativeiro.

Palavras-chave: criopreservação de sêmen, inseminação artificial, serpentes.

Abstract

The increasing number of endangered snake species and the need of research to better combat their venom, among other reasons, emphasize how important is their reproduction in captivity. Unfortunately, mating or conception problems have restricted the reproduction of snakes in captivity and assisted reproduction could be an important tool to change this scenario. Snake's semen was first collected stroking the final third of animal's body at the cloaca region, but contamination with feces and urates were often reported. Semen is usually collected from the cloaca using a small syringe, after digital ventral massages along final third of snake's body. Very few publications describe techniques for evaluation, cooling or freezing semen of snakes. Extenders for snake semen are cell culture media as M199 and Ham's F 10 or extenders using Test-yolk, milk or coconut water, however their efficiency are restricted and inconsistent. So far, there is no protocol for cryopreservation of snake semen. The use of artificial insemination is reported for few species either with fresh or cooled semen, however, results are questionable. Although assisted reproduction biotechnologies in snakes are still limited, their use could be an important tool for the conservation of these species in captivity.

Keywords: artificial insemination; semen cryopreservation, snakes.

Introdução

O crescente interesse mundial pelos répteis tem estimulado cada vez mais, estudos sobre taxonomia, fisiologia, comportamento, história natural, patologia, farmacologia, toxicologia, anestesiologia e semiologia, entre outras áreas de conhecimento. Os répteis compõem uma classe com 8.734 espécies, sendo mais de 3.000 espécies de serpentes (Uetz, 2008), uma diversidade que supera a classe 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 evolução adaptativa a esses ambientes resultou em uma diversidade fisiológica e morfológica muito grande (Fitch, 1970), consequentemente generalizar características constatadas em uma espécie para uma ordem ou mesmo toda a classe *Reptilia* pode levar a grandes erros.

Existem alguns exemplos interessantes da variabilidade nos aspectos reprodutivos dentro de um mesmo gênero ou até dentro de uma mesma espécie de serpente. No gênero *Helicops* (cobra d'água), o modo de reprodução pode ser ovípara ou vivípara (De Aguiar e Di-Bernardo, 2005; Sale-Nunes, 2006). Na espécie



Liophis miliaris (cobra d'água), a sazonalidade na reprodução varia em função da localização das serpentes, nas porções sul e norte da mata atlântica (Pizzatto e Marques, 2006). O gênero *Micrurus* (corais verdadeiras) pode apresentar, de acordo com a espécie, grandes diferenças na estratégia reprodutiva, com comportamento de disputa entre machos (dança-combate) e dimorfismo sexual (*Micrurus frontalis*) ou ausência de disputas e dimorfismo (*Micrurus corallinus*; Marques et al., 2006). Assim, se apenas uma espécie do gênero fosse estudada, ou estudada em parte, considerando, por exemplo, apenas uma área de ocorrência, poder-se-iam generalizar de forma errônea informações sobre determinadas características reprodutivas.

A importância em desenvolver métodos de criação em cativeiro aumenta ainda mais, considerando-se as restrições que existem para a importação de répteis, o crescente número de espécies ameaçadas no mundo e o interesse em estudar as toxinas desses animais, entre outros motivos (Mengden et al., 1980; Alberts et al., 1998; Gibbons et al., 2000; Tourmente et al., 2007). No entanto, a ausência de ocorrência de cópulas ou a existência de problemas ligados à concepção, em parte devido ao desconhecimento ou à dificuldade em mimetizar as condições ambientais necessárias para essas espécies, tornam a reprodução em cativeiro limitada (Ross e Marzec, 1990; Mattson et al., 2007).

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 assistida e a formação de bancos de germoplasma de animais silvestres (Wildt, 1989). Vários autores consideram a inseminação artificial como uma das ferramentas que podem melhorar o desempenho reprodutivo dos répteis em cativeiro (Mengden et al., 1980; Platz et al., 1980; Quinn et al., 1989; Langlada et al., 1994; Fahrig et al., 2007; Mattson et al., 2007).

Atualmente os maiores obstáculos para o sucesso na reprodução de animais selvagens em cativeiro é o desconhecimento de informações básicas sobre essas espécies, incluindo a biologia reprodutiva (Swanson, 2006). A reprodução assistida de répteis, por sua vez, ainda é muito pouco explorada, tendo-se ainda poucas informações sobre os métodos de coleta, avaliação e congelamento de sêmen ou inseminação artificial (Tourmente et al., 2006; Mattson et al., 2007; Zacariotti et al., 2007).

Anatomia do aparelho reprodutor das serpentes

As fêmeas apresentam os ovários difusos e localizados próximos aos dois ovidutos, que são estruturas alongadas ligadas às vaginas. Os ovidutos recebem os ovos após a ovulação e a fecundação (Almeida-Santos, 2005). Algumas espécies de serpentes (*Tantilla* spp.) apresentam dois ovários e um único oviduto (Greene, 1997). As funções do oviduto são, entre outras, produção de albúmen, produção da casca, placentação, estocagem de espermatozoides (Almeida-Santos, 2005).

Outro aspecto interessante da reprodução de serpentes é a capacidade mitótica das oogônias, ou seja, as oogônias sofrem mitoses mesmo na fase adulta da fêmea, reabastecendo seu “estoque” nos ovários (Rothchild, 2003).

Os machos possuem testículos ovoides compostos por túbulos seminíferos, células intersticiais e vasos sanguíneos, envolvidos por tecido conjuntivo (túnica própria). Estão localizados na cavidade celomática, e, geralmente, o testículo direito é mais cranial que o esquerdo (DeNardo, 1996). Os ductos deferentes ligam os testículos à papila genital na cloaca, próximo à base do hemipênis, onde existe o sulco espermático, já que répteis não possuem uretra peniana (Vasse, 1994). A porção mais distal dos ductos deferentes, diferenciada em algumas espécies, é denominada ampola e tem função relacionada ao armazenamento de espermatozoides no macho (Sever, 2004).

Na cloaca, a papila genital dos machos é o fim de uma via comum aos tratos genital (ductos deferentes) e urinário (ureteres; Oliveira et al., 2004). 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, mas apenas um é usado durante a cópula (Fox, 1977).

Espermatogênese e morfologia espermática das serpentes

A espermatogênese, para algumas espécies de serpentes encontradas na América do Norte, parece estar extremamente condicionada à elevação da temperatura e não às alterações do fotoperíodo. Em estudo sobre o controle ambiental da espermatogênese de *Crotalus viridis*, foi constatado que o início da espermatogênese ocorreu com a elevação da temperatura em apenas 7°C (Aldridge, 1975), e em outro estudo usando a espécie *Arizona elegans*, a espermatogênese foi iniciada elevando-se a temperatura e na ausência total da luz (Aldridge, 1979).

A espermatogênese em serpentes é dividida em vários estágios, a saber: Estágio 1 - túbulos seminíferos com presença predominante de espermatogônias e espermatócitos primários, e alguns espermatócitos secundários e espermátides; Estágio 2 - surgimento dos primeiros espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos; Estágio 3 - presença de grande quantidade de espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos e diminuição do número de espermatócitos secundários e espermátides; Estágio 4 - diminuição do número de



espermatozoides, presença de apenas espermatogônias e espermatócitos primários; Estágio 5 - ausência de espermatozoides e presença de uma ou duas camadas de espermatogônias ou espermatócitos primários (Tsai e Tu, 2000). No entanto, não é descrita na literatura a duração de cada estágio.

O espermatozoide das serpentes é filiforme e é basicamente composto por um acrossoma em forma de cone e uma cabeça alongada. Observa-se uma distinção entre medula e córtex acrossomal e a presença de um *perforatorium* no espaço subacrossomal. A peça intermediária é envolvida por um sistema de multimembranas e é extremamente longa, uma característica exclusiva das serpentes (sinapomorfia). Ao longo da peça intermediária, observam-se estruturas chamadas de corpos densos (possível transformação mitocondrial) e a presença de dois centríolos (proximal e distal) ao invés de um, como observado em mamíferos (Austin, 1965; Hamilton e Fawcett, 1968; Jamieson e Koeler, 1994; Oliver et al., 1996; Tourmente et al., 2006).

Biologia reprodutiva das serpentes

É necessário, para que ocorra o início da fase reprodutiva, que ambos os sexos passem por uma fase de aquisição de energia (alimentação). O custo energético para a reprodução é elevado nas fêmeas (Aldridge e Duvall, 2002; Aubret et al., 2002; Bonnet et al., 2002; Shine, 2003) devido à mobilização das reservas de gordura para a vitelogênese (Santos e Llorente, 2004), e embora este custo não esteja claro para os machos, alguns autores relatam que pode ser tão elevado quanto nas fêmeas (Olsson et al., 1997; Shine e Mason, 2005).

O ciclo vitelogênico no ovário é basicamente dividido em vitelogênese primária (foliculos pequenos, arredondados e transparentes) e vitelogênese secundária (foliculos maiores, arredondados ou ovais, com coloração variando de branca a amarelada). O crescimento folicular durante a vitelogênese primária ocorre principalmente devido ao acúmulo de água no interior do folículo, enquanto a vitelogênese secundária é a fase de maior crescimento folicular, com a deposição de vitelo (lipoproteínas) no interior do folículo (DeNardo, 1996; Santos e Llorente, 2004). A vitelogênese secundária pode ou não estar associada à cópula em serpentes (Medonça e Crews, 1990; Aldridge e Duvall, 2002; Taylor e DeNardo, 2005).

A partir da fecundação, o desenvolvimento embrionário acontecerá no útero ou no ovo (ambiente externo), pois as serpentes possuem dois modos de reprodução: vivípara ou ovípara. As espécies ovíparas põem ovos, e a maior parte do desenvolvimento embrionário ocorre no ambiente, enquanto as vivíparas retêm os embriões no útero até o final da gestação, quando ocorre o parto (DeNardo, 1996; Blackburn, 2006). O vitelo acumulado durante a vitelogênese secundária servirá de substrato e energia para o crescimento embrionário, seja no ovo ou no útero da serpente (Thompson e Speake, 2002).

Uma estratégia reprodutiva utilizada por várias espécies de serpentes é a estocagem de espermatozoides na fêmea, que pode variar de alguns meses a até alguns anos (Aldridge, 2002; Aldridge e Duvall, 2002; Almeida-Santos et al., 2004; Almeida-Santos, 2005). Recentemente foi proposto que uma série de peptidases estaria envolvida na sobrevida destes espermatozoides por tanto tempo (Marinho et al., 2008). A estocagem de espermatozoides parece ocorrer em compartimentos formados com a contração em formato espiral da porção caudal do útero (Yamanouye et al., 2004; Siegel e Sever, 2006).

Coleta e avaliação de sêmen

Existem alguns relatos que descrevem as técnicas de coleta de sêmen em répteis, uma importante etapa a ser desenvolvida antes da inseminação artificial (Platz et al., 1980; Wood et al., 1982; Larsen e Cardeilhac, 1984; Samour, 1986).

A primeira coleta de sêmen em serpentes foi obtida pela compressão realizada no terço final do corpo do animal, no entanto, com esta técnica, foi frequente a contaminação das amostras por fezes e urato (Fitch, 1960). Mengden et al. (1980) coletaram sêmen realizando massagem digital na região ventral do terço final em animal contido, colhendo o sêmen com o auxílio de uma seringa diretamente da cloaca, minimizando, desta forma, a contaminação. As espécies submetidas a coletas de sêmen foram: *Elaphe subocularis* (ratsnake), *E. obsoleta* (ratsnake), *Epicrates inornatus* (rainbow boa), *Eunectes notaeus* (sucuri-amarela), *Python anchietae* (pítion-de-angola), *P. timoriensis* (pítion-do-timor), *Bitis gabonica* (víbora-do-gabão) e *Notechis scutatus* (cobra-tigre). Quinn et al. (1989) descreveram o método de coleta de sêmen em *Thamnophis marcianus* (checkered garter snake) usando a eletroejaculação seguida de massagem digital realizada na região ventral, no entanto, com este método, a contaminação do sêmen por fezes e uratos foi frequente. Foi relatada a coleta de sêmen em *Boa constrictor occidentalis* (jiboia argentina; Tourmente et al., 2007) e *Lampropeltis triangulum sinaloae* (sinaloan milk snake; Samour, 1986) usando-se o método proposto por Mengden et al. (1980). Zacariotti et al. (2007) realizaram com sucesso a coleta de sêmen em cascavéis utilizando a técnica descrita por Mengden et al. (1980) fazendo uso de anestésico local. Foi utilizada a lidocaína a 1% na dose de 15 mg/Kg, aplicada em quatro diferentes pontos ao redor da cloaca. A anestesia do local resultou no relaxamento da cloaca e na exposição da papila genital, o que permitiu um maior controle sobre o procedimento de coleta, minimizando a contaminação. Após as massagens, o sêmen era colhido com auxílio de uma seringa de 1 ml. Outro método descrito para serpentes consiste na eutanásia dos machos, retirada dos ductos deferentes e coleta do sêmen (Langlada et al.,



1994; Tourmente et al., 2006, 2008), sendo este menos indicado, pois implica a morte do indivíduo.

A realização de espermograma permite conhecer os parâmetros normais de cada espécie e avaliar o potencial reprodutivo de um macho. No entanto, existem poucos parâmetros de espermograma publicados para serpentes (Mengden et al., 1980; Samour, 1986; Langlada et al., 1994; Tourmente et al., 2006, 2007; Zacariotti e Durrant, 2006; Mattson et al., 2007; Zacariotti et al., 2007).

Devido à alta concentração espermática, o sêmen de serpentes é geralmente diluído antes de sua avaliação inicial. Têm sido utilizados para esta diluição meios de cultivo de células como o M199 e Ham's F-10 (Zacariotti, 2007), o PBS (*phosphate-buffered saline*; Tourmente et al., 2007) e a solução TL HEPES (Mattson et al., 2007). Uma avaliação rápida da concentração aparente auxilia na escolha da diluição necessária. Diluições ao redor de 1:500 têm sido adequadas para a avaliação da motilidade e do vigor espermático, bem como da morfologia do espermatozoide de serpentes (Mattson et al., 2007; Tourmente et al., 2007; Zacariotti et al., 2007).

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 mais elevada que a temperatura ambiente é desnecessário. Temperaturas entre 25 e 27°C têm sido utilizadas com sucesso para a avaliação da motilidade e do vigor espermático (Fahrig et al., 2007; Tourmente et al., 2007; Zacariotti et al., 2007).

Foi validada apenas para os espermatozoides de cascavel a técnica de coloração simples de acrossoma e de peça intermediária utilizando-se a diaminobenzidina (DAB; Innocenti et al., 2006).

Resfriamento e congelamento de sêmen

A literatura científica descreve poucas técnicas para a criopreservação de espermatozoides de serpentes (Mengden et al., 1980; Fahrig et al., 2007; Mattson et al., 2007).

Mengden et al. (1980) mantiveram alguma motilidade espermática por até 96 horas diluindo sêmen em meio de cultura celular modificado de McCoy e resfriando as amostras até 5°C. Os mesmos autores realizaram a congelamento de espermatozoides de serpentes utilizando um diluidor comercial (detalhes sobre o diluidor não foram fornecidos) e obtiveram 30% de motilidade após a descongelamento.

Fahrig et al. (2007) mantiveram a motilidade espermática acima de 50% por até 48 horas em amostras de sêmen de *Elaphe guttata* (*corn snake*) diluídas 1:1 em Test-gema à temperatura ambiente e resfriadas a 4°C em refrigerador comum, enquanto Mattson et al. (2007) mantiveram a motilidade espermática de *E. guttata* entre 70,4 e 95% por até três dias sob refrigeração (4-10°C), diluindo o sêmen em solução TL HEPES para obter concentrações espermáticas variando entre 2,5 e 13,5 x10⁶ spz/mL. Millar e Watson (2001) reportam que o glicerol é tóxico para o espermatozoide de serpentes, no entanto Zacariotti e Durrant (2006) congelaram espermatozoides de *Crotalus ruber* (cascavel) utilizando Test-gema com 8% de glicerol e obtiveram 70% da motilidade imediatamente após a descongelamento. Não foram encontradas informações adicionais sobre o uso de outros crioprotetores na congelamento de espermatozoides de serpentes.

Inseminação artificial

A inseminação artificial foi realizada com sucesso utilizando-se sêmen fresco ou resfriado em *Thamnophis marcianus* (*checkered garter snake*; Quinn et al., 1989), *Crotalus durissus terrificus* (cascavel; Langlada et al., 1994), *Elaphe guttata* (*corn snake*; Mattson et al., 2007), e sem sucesso em *Python anchietae* (*piton de angola*) (Mengden et al., 1980). Nos casos citados, a inseminação artificial gerou ninhadas com número reduzido quando comparadas àquelas produzidas naturalmente por cópula. Até o momento, não existem relatos que indiquem sucesso no uso da inseminação artificial de serpentes utilizando sêmen congelado.

A grande maioria dos répteis possui dois ovidutos, mas estes podem ter aberturas simples (testudinos e crocódilios) ou duplas (lagartos e serpentes) na cloaca. Assim, durante o procedimento de inseminação, é importante se certificar de que a deposição do sêmen está sendo realizada nos dois ovidutos (Langlada et al., 1994; Mattson et al., 2007). As técnicas de inseminação descritas usam acoplada a uma seringa contendo o sêmen uma sonda, flexível ou rígida, com 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 (Langlada et al., 1994; Mattson et al., 2007).

Perspectivas

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 se deve em grande parte à escassez de informações disponíveis sobre a 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 espécies (Mendonça e Crew, 1990). Apesar destas limitações, cada vez mais surgem estudos utilizando os répteis como modelos



experimentais. Não há dúvida de que futuramente a reprodução assistida será uma realidade para as serpentes como o é para outras espécies.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de doutorado concedida sob processo: 140066/2007-1.

Referências bibliográficas

- Alberts AC, Oliva ML, Worley MB, Telford Jr SR, Morris PJ, Janssen DL.** The need for pre-release health screening in animal translocations: a case study of the Cuban iguana (*Cyclura nubila*). *Anim Conserv*, v.1, p.165-172, 1998.
- Aldridge RD.** Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. *Copeia*, v.3, p.493-496, 1975.
- Aldridge RD.** Seasonal spermatogenesis in sympatric *Crotalus viridis* and *Arizona elegans* in New Mexico. *J Herp*, v.13, p.187-192, 1979.
- Aldridge RD.** The link between mating season and male reproductive anatomy in the rattlesnakes *Crotalus viridis oreganus* and *Crotalus viridis helleri*. *J Herp*, v.36, p.295-300, 2002.
- Aldridge RD, Duvall D.** Evolution of the mating season in the pitvipers of North America. *Herpet Mono*, v.16, p.1-25, 2002.
- Almeida-Santos SM.** Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (serpentes:viperidae). 2005. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- Almeida-Santos SM, Laporta-Ferreira IL, Antoniazzi MM, Jared C.** Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. *Comp Biochem Phys, Part A*, v.139, p.169-174, 2004.
- Aubret F, Bonnet X, Shine R, Lourdais O.** Fat Is Sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). *Horm Behav*, v.42, p.135-147, 2002.
- Austin CR.** Fine structure of the snake sperm tail. *J Ultrastruct Res*, v.12, p.452-462, 1965.
- Blackburn DG.** Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpet Mono*, v.20, p.131-146, 2006.
- Bonnet X, Lourdais O, Shine R, Naulleau, G.** Reproduction in a typical capital breeder: costs, currencies, and complications in the Aspic Viper. *Ecology*, v.83, p.2124-2135, 2002.
- De Aguiar LFS, Di-Bernardo M.** Reproduction of the water snake *Helicops infrataeniatus* (Colubridae) in southern Brazil. *Amph Rept*, v.26, p.527-533, 2005.
- Denardo D.** Reproductive biology. In: Mader DR (Ed.). *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.212-224.
- Fahrig BM, Mitchell MA, Eilts BE, Paccamonti D L.** Characterization and cooled storage of semen from corn snakes (*Elaphe guttata*). *J Zoo Wild Med*, v.38, p.7-12, 2007.
- Fitch HS.** Criteria for determining sex and breeding maturity in snakes. *Herpetology*, v.16, p.49-51, 1960.
- Fitch HS.** *Reproductive cycles in lizards and snakes*. Lawrence KS: University of Kansas, Museum of Natural History, 1970. 247p.
- Fox H.** The urogenital system of reptiles. In: Gans C, Parsons TS. (Ed.). *Biology of reptilia*. New York: Academic Press, 1977. p.1-157
- Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, Buhlmann KA, Tuberville TD, Metts BS.** The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *BioScience*, v.50, p.653-666, 2000.
- Greene HW.** *Snakes: evolution of mystery in nature*. Berkeley, CA: University of California Press, 1997. 366p.
- Hamilton DW, Fawcett DW.** Unusual features of the neck and middle-piece of snake spermatozoa. *J Ultrastruct Res*, v.23, p.81-97, 1968.
- Innocenti MC, Zacariotti RL, Betkowsky SE, Guimarães MABV.** Avaliação do espermograma, validação da coloração simples do acrossoma e da atividade mitocondrial (citocromo C oxidase) em espermatozoide normal de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). In: Congresso da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens, 10, 2006, São Pedro, SP. *Anais...* São Pedro, SP: ABRAVAS, 2006. p.166.
- Jamieson BGM, Koeler L.** The ultrastructure of the spermatozoon of northern water snake, *Nerodia sipedon* (Colubridae, Serpentes), with phylogenetic considerations. *Can J Zool*, v.72, p.1648-1652, 1994.
- Lance VA.** Reptile reproduction and endocrinology. In: Holt W, Pickard AR et al. (Ed.). *Reproductive science and integrated conservation*. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p.426
- Langlada FG, Santos S, Ferreira ILL.** Techniques of artificial insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae – Crotalinae). *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.31, p.141-144, 1994.
- Larsen RE, Cardeilhac PT.** Artificial insemination, semen handling, and assessment of reproductive status in



- alligators. In: Annual Meeting of American Association of Zoo Veterinarians, 1984. *Proceedings...* Lawrence, KS: AAZV, 1984. p.159.
- Marinho C, Almeida-Santos S, Carneiro S, Yamasaki S, Silveira P.** Peptidase activities in *Crotalus durissus terrificus* semen. *Reproduction*, v.136, p.767-776, 2008.
- Marques OAV, Almeida-Santos SM, Rodrigues MG.** Activity patterns in coral snakes, genus *Micrurus* (Elapidae), in South and Southeastern Brazil. *South Am J Herpet*, v.1, p.99-105, 2006.
- Mattson KJ, Vries AD, McGuire SM, Krebs J, Louis EE, Loskutoff NM.** Successful artificial insemination in the corn snake (*Elaphe gutatta*), using fresh and cooled semen. *Zoo Biol*, v.26, p.363-369, 2007.
- Medonça MT, Crews D.** Mating-induced ovarian recrudescence in the red-sided garter snake. *J Comp Physiol A*, v.166, p.629-632, 1990.
- Mengden AG, Platz GC, Hubbard R, Quinn H.** Semen collection, freezing and artificial insemination in snakes. In: Murphy JB. *Reproductive biology and diseases of captive reptiles*. Lawrence, KS: The Society for the study of Amphibians and Reptiles, 1980. p.71-78.
- Millar JD, Watson PF.** Cryopreservation of gametes and embryos in reptiles and amphibians. In: Watson PF, Holt WV (Ed.). *Cryobanking the genetic resource: wildlife conservation for the future*. London: Taylor & Francis, 2001. p.171-177.
- Oliveira CA, Silva RM, Germán MMS, Mahecha AB.** Location of the ureteral openings in the cloacas of tinamous, some ratite birds, and crocodilians: a primitive character. *J Morphol*, v.260, p.234-246, 2004.
- Oliver SC, Jamieson BGM, Scheltinga DM.** The ultrastructure of spermatozoa of squamata. II. Agamidae, Varanidae, Colubridae, Elapidae, and Boidae (Reptilia). *Herpetologica*, v.52, p.216-241, 1996.
- Olsson M, Madsen T, Shine R.** Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. *Proc R Soc Lond B*, v.264, p.455-459, 1997.
- Pizzatto L, Marques OAV.** Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (colubridae) in Brazil. *Herpet J*, v.16, p.353-362, 2006.
- Platz CC, 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: Annual Meeting of American Association of Zoo Veterinarians, 1980. *Proceedings...* Lawrence, KS: AAZV, 1980. p.47-54.
- Quinn H, Blasedel T, Platz CC.** Successful artificial insemination in the checkered garter snake. *Int Zoo Yb*, v.28, p.177-183, 1989.
- Ross RA, Marzec G.** *Reproductive husbandry of pythons and boas*. Stanford: Institute for Herpetological Research, 1990
- Rothchild I.** The yolkless egg and the evolution of eutherian viviparity. *Biol Reprod*, v.68, p.337-357, 2003.
- Sale-Nunes PM.** *Filogenia da tribo Hydropsini baseada em caracteres morfológicos (Serpentes: Xenodontidae)*. 2006. 130f. Tese (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- Samour JH.** Recent advances in artificial breeding techniques in birds and reptiles. *Int Zoo Yb*, v.24/25, p.143-148, 1986.
- Santos X, Llorente GA.** Lipid dynamics in the viperine snake, *Natrix maura*, from the Ebro Delta (NE Spain). *Oikos*, v.105, p.132-140, 2004.
- Sever DM.** Ultrastructure of the reproductive system of the Black swamp snake (*Seminatrix pygaea*) IV: Occurrence of an ampulla ductus deferentis. *J Morphol*, v.262, p.714-730, 2004.
- Shine R.** Reproductive strategies in snakes. *Proc R Soc Lond B*, v.270, p.995-1004, 2003.
- Shine R, Mason RT.** Do a male garter snake's energy stores limit his reproductive effort? *Can J Zool*, v.83, p.1265-1270, 2005.
- Siegel DS, Sever DM.** Utero-muscular twistin and sperm storage in viperids. *Herpet Conserv Biol*, v.1, p.87-92, 2006.
- Swanson W.** Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, v.66, p.49-58, 2006.
- Taylor EN, Denardo DF.** Reproductive Ecology of Western Diamond-Backed Rattlesnakes (*Crotalus atrox*) in the Sonoran Desert. *Copeia*, v.1, p.152-158, 2005.
- Thompson MB, Speake BK.** Energy and nutrient utilisation by embryonic reptiles. *Comp Biochem Phys A*, v.133, p.529-538, 2002.
- Tourmente M, Cardozo G, Guidobaldi H, Giojalas L, Bertona M, Chiaraviglio M.** Sperm motility parameters to evaluate the seminal quality of *Boa constrictor occidentalis*, a threatened snake species. *Res Vet Sci*, v.82, p.93-98, 2007.
- Tourmente M, Cardozo G, Guidobaldi H, Giojalas L, Bertona M, Chiaraviglio M.** The ultrastructure of the spermatozoa of *Boa constrictor occidentalis*, with considerations on its mating system and sperm competition theories. *Acta Zool*, v.87, p.25-32, 2006.
- Tourmente M, Giojalas L, Chiaraviglio M.** Sperm ultrastructure of *Bothrops alternatus* and *Bothrops diporus* (Viperidae, Serpentes), and its possible relation to the reproductive features of the species. *J Zoomorphol*, v.127, p.241-248, 2008.
- Tsai TS, Tu MC.** Reproductive cycle of male chinese green tree vipers (*Trimeresurus s. stejnegeri*) in Northern



Taiwan. *J Herpet*, v.34, p.424-430, 2000.

Uetz P. The reptile database. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>. Acessado em: 22 out. 2008.

Vasse Y. Hemipenes. In: Bauchot R (Ed.). *Snakes: a natural history*. New York: Sterling Publ, 1994. p.102.

Wildt DE. Strategies for the practical application of reproductive technologies to endangered species. *Zoo Biol*, v.1, p.17-20, 1989.

Wood F, Platz C, Critchley K, Wood F. Semen collection by electroejaculation of the green turtle (*Chelonia mydas*). *Br J. Herpet.*, 6(1), 200 - 202, 1982.

Yamanouye N, Silveira PF, Abdalla FMF, Almeida-Santos SM, Breno MC, Salomão MG. Reproductive cycle of the Neotropical *Crotalus durissus terrificus*: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. *Gen Comp Endocrinol*, v.139, p.151-157. 2004.

Zacariotti RL. Reprodução assistida em répteis. In: Vilani RC. *Avanços na clinica de animais selvagens - medicina de répteis*. Curitiba: Fotolaser Gráf Ed, 2007. p.297-308.

Zacariotti RL, Durrant BS. *Baby rattles*: reproductive studies of free ranging snakes at the Wild Animal Park. *Zoonooz*, v.79, p.8-9, 2006.

Zacariotti RL, Grego KF, Fernandes W, Sant'Anna SS, Guimarães MABV. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). *Zoo Biol*, v.26, p.155-160, 2007.
