



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MATHEUS HENRIQUE ANDRADE DA SILVA**

**VIABILIZAÇÃO DA COLETA E ANÁLISE SEMINAL DE SERPENTES MANTIDAS  
EM CATIVEIRO**

**AREIA**  
**2025**

**MATHEUS HENRIQUE ANDRADE DA SILVA**

**VIABILIZAÇÃO DA COLETA E ANÁLISE SEMINAL DE SERPENTES MANTIDAS  
EM CATIVEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

**Orientador:** Prof. (a) Dr. (a) Luciana Diniz Rola

**Coorientador:** Prof. (a) Dr. (a) Abraão Ribeiro Barbosa

**Coorientadora:** Prof. (a) Dr. (a) Sildivane Valcacia Silva

**AREIA  
2025**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586v Silva, Matheus Henrique Andrade da.  
Viabilização da coleta e análise seminal de  
serpentes mantidas em cativeiro / Matheus Henrique  
Andrade da Silva. - Areia:UFPB/CCA, 2025.  
51 f.

Orientação: Luciana Diniz Rola.  
Coorientação: Abraão Ribeiro Barbosa, Sildivane  
Valcacia Silva.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal. 2. Gametas. 3. Germoplasma. 4.  
Squamata. 5. Reprodução. 6. Répteis. I. Rola, Luciana  
Diniz. II. Barbosa, Abraão Ribeiro. III. Silva,  
Sildivane Valcacia. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(043.3)

MATHEUS HENRIQUE ANDRADE DA SILVA

VIABILIZAÇÃO DA COLETA E ANÁLISE SEMINAL DE SERPENTES MANTIDAS  
EM CATIVEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovado em: 27/02/2025.

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente



LUCIANA DINIZ ROLA

Data: 27/02/2025 11:03:41-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (a) Dr. (a) Luciana Diniz Rola (Orientadora)  
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Documento assinado digitalmente



WASHINGTON LUIZ DA SILVA VIEIRA

Data: 05/03/2025 17:30:20-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (a) Dr. (a) Washington Luiz da Silva Vieira  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente



JOSE MATIAS PORTO FILHO

Data: 03/03/2025 15:18:01-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. (a) Dr. (a) José Matias Porto Filho  
Faculdade Reboças

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Matheus Henrique Andrade da Silva – Nascido em Areia, Paraíba, em 10 de Agosto de 1999. Graduado em Zootecnia pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Participou ativamente de projetos de pesquisa, extensão e monitoria durante toda a graduação e mestrado. Durante a graduação foi um dos fundadores e presidentes do Grupo de Estudos de Animais Selvagens do Centro de Ciências Agrárias (UFPB/CCA). Possui experiência nas áreas de reprodução, conservação, comportamento e nutrição de animais silvestres e exótico. É mestrando no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UFPB – Campus II – Areia e é membro do Laboratório de Estudos em Conservação de Animais Selvagens (LECAS UFPB/CCA).

Dedico a minha família, e aos amigos e parceiros  
que fiz ao longo do percurso.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e ao universo por toda generosidade e aprendizado ao longo desses últimos anos.

À minha mãe, Zeta, pelo apoio incondicional, esforço e incentivo que me permitiram alcançar meus objetivos. Ao meu pai, Álvaro (*in memoriam*), por despertar e nutrir em mim o amor pelos animais. À minha irmã, Julya, pelo constante apoio, e a todos os meus familiares de sangue: tia Jó, tia França, Lara, Antônio José. Aos familiares de coração: Rafaela Albuquerque, Ricardo Pinto, Dudu e Lia, por estarem ao meu lado em todos os momentos.

À minha orientadora, Luciana Diniz, que mesmo à distância nunca mediu esforços para me apoiar, e aos meus coorientadores, Abraão Ribeiro e Sildivane Valcácia, que estiveram comigo nos desafios mais recentes. Nada disso seria possível sem o suporte de vocês.

À família do Laboratório de Estudos em Conservação de Animais Selvagens (LECAS UFPB), que tornou essa jornada mais leve e divertida. Em especial, agradeço aos meus pupilos: Alice Câmara, Gabriel Barreto, Joyce Kamilly e Ramon Nascimento, que trouxeram sorte para minhas coletas e muitas risadas. Amo vocês!

Agradecer a minha amiga Amanda Albuquerque por todo apoio durante todo o experimento, sem ela nada seria possível.

Às minhas irmãs e amigas de graduação, pós-graduação e meus alinhamentos milenares, Izabel Milena e Mirta Oliveira, que mesmo à distância sempre se fizeram presentes. Eu amo vocês e sou grato por compartilharem essa caminhada comigo.

À Clara Vasconcelos, que acompanhou de perto cada desafio desses últimos anos e esteve comigo quando mais precisei.

À equipe do Répteis da Caatinga, pelo suporte constante à pesquisa, disposição em ajudar e compartilhar conhecimento. Em especial, agradeço a Silvaney Medeiros e Alisson Silva. À equipe da BICA, que sempre me recebeu de braços abertos e contribuiu com valiosas trocas de aprendizado. Minha gratidão a Kleber Filho, Thiago Nery e Diego Pontes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCan UFPB) pela oportunidade e pela estrutura oferecida para que eu pudesse realizar esse trabalho.

A CAPES, pela concessão de bolsa durante todo o período deste experimento.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para essa jornada, mesmo que não mencionados nominalmente aqui. Cada um de vocês foi essencial e tem um lugar especial na minha história.

“A conservação da biodiversidade não é apenas uma questão de sobrevivência, mas de compreender nossa conexão com todas as formas de vida.” Jane Goodall.

## RESUMO

A pesquisa teve como objetivo desenvolver um método eficiente de coleta e caracterização de sêmen de serpentes mantidas em cativeiro, contribuindo para a conservação de espécies ameaçadas. Foram utilizados 15 machos de serpentes mantidos em zoológicos no estado da Paraíba. Foram avaliados parâmetros físicos, como coloração e aspecto; químicos, como pH; e microscópicos, incluindo motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. O método apresentou alta eficácia, com resultados positivos mesmo em espécies de musculatura densa, ampliando o entendimento sobre suas peculiaridades reprodutivas. Os espermatozoides analisados mostraram alta qualidade, com motilidade progressiva acima de 70% em grande parte das amostras e elevada porcentagem de células normais. Os resultados reforçam a importância do manejo adequado e da aplicação de biotecnologias na reprodução assistida e conservação das espécies. Este trabalho fornece subsídios para aprimorar técnicas reprodutivas, uma vez que ele detalha um novo método de coleta seminal para serpentes que pode ser utilizado na preservação *in situ* e *ex situ*, destacando o papel essencial da ciência na mitigação dos impactos das atividades humanas sobre a fauna silvestre.

**Palavras-Chave:** gametas; germoplasma; Squamata; reprodução; répteis.

## ABSTRACT

The research aimed to develop an efficient method for collecting and characterizing semen from snakes kept in captivity, contributing to the conservation of endangered species. Fifteen male snakes housed in zoos in the state of Paraíba were used. Physical parameters such as color and appearance, chemical parameters such as pH, and microscopic parameters including motility, vigor, concentration, and sperm morphology were evaluated. The method demonstrated high efficacy, yielding positive results even in species with dense musculature, expanding the understanding of their reproductive peculiarities. The analyzed spermatozoa showed high quality, with progressive motility above 70% in most samples and a high percentage of normal cells. The results reinforce the importance of proper management and the application of biotechnologies in assisted reproduction and species conservation. This study provides valuable insights for improving reproductive techniques, as it details a new semen collection method for snakes that can be used in both in situ and ex situ conservation, highlighting the essential role of science in mitigating the impacts of human activities on wildlife.

**Keywords:** gametes; germoplasm; Squamata; reproduction; reptiles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Hemipênis de serpentes.....	19
Quadro 1 – Fases da vitelogênese.....	21
Figura 2 – Esporão de macho de Píton Birmanesa ( <i>P. morulus bivittatus</i> ).....	22
Figura 3 – Serpentes nas quais foram realizadas as coletas de material .....	28
Figura 4 – Contenção, massagem e coleta seminal. ....	29
Figura 5 – Teste de pH. ....	31
Figura 6 – Amostra colhida em capilar. ....	37
Figura 7 – Percentual de coloração dos ejaculados obtidos.....	37
Figura 8 – Vigor espermático dos ejaculados obtidos .....	38
Figura 9 – Motilidade espermática dos ejaculados obtidos.....	39
Figura 10 – Espermatozoides de serpentes. ....	42
Figura 11 – Porcentagem de células normais e com defeitos. ....	43
Figura 12 – Defeitos espermáticos.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre as espécies utilizadas. ....	27
Tabela 2 - Dados dos animais (Local, peso e dose de lidocaína utilizada).....	30
Tabela 3 - Tempo da massagem até obtenção do ejaculado .....	34
Tabela 4 - Características físicas dos ejaculados obtidos .....	36
Tabela 5 – Concentração espermática das serpentes mantidas em cativeiro no estado da Paraíba.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINPET	Associação Brasileira da Indústria de Produtos Para Animais de Estimação
CBEE	Centro Brasileiro de Estudos de Ecologia de Estradas
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MVRC	Museu Vivo dos Répteis da Caatinga
PZAC	Parque Zoobotânico Arruda Câmara
SPTZ	Espermatozoide

## LISTA DE SÍMBOLOS

μL Microlitro

% Porcentagem

® Registrado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Diminuição da biodiversidade .....	15
2.2 Características das serpentes .....	17
2.3 Sistema reprodutor de serpentes .....	18
2.4 Reprodução das serpentes .....	20
2.5 Desafios da aplicação de biotecnologias da reprodução em animais silvestres .....	23
2.6 Métodos de coleta seminal em serpentes.....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
4.1 Animais e Local .....	25
4.2 Coleta Seminal .....	28
4.3 Análise seminal .....	30
4.3.1 Avaliação das características físicas do ejaculado .....	31
4.3.2 Avaliação das características químicas do ejaculado.....	31
4.3.3 Avaliação das características microscópicas do ejaculado .....	31
4.4 Análise estatística .....	32
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As serpentes são animais cujo corpo é coberto de escamas e que, portanto, pertencem a ordem *Squamata*, e são da subordem *Ophidia*, que de forma geral, podem ser caracterizadas pela perda de patas. Estes animais se encontram dispersos por diversas regiões do globo, com exceção das regiões dos polos, e havendo preferência por regiões temperadas e tropicais. Essa preferência se deve ao fato de serem animais ectotérmicos e, portanto, dependerem da temperatura ambiental para regular suas atividades fisiológicas. As espécies de serpentes adaptaram-se a uma ampla variedade de ambientes e ecossistemas, apresentando hábitos terrestres, fossoriais, saxícolas, arborícolas, pantanosos ou aquáticos (Grego *et al.*, 2014).

Devido à grande heterogeneidade ambiental e ecossistêmica do Brasil, além de suas dimensões continentais, o país abriga uma expressiva diversidade de espécies, com aproximadamente 10 famílias, 81 gêneros e 430 espécies, onde as regiões Norte e Nordeste são aquelas mais ricas em espécies e subespécies de serpentes (Grego *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2021). Apesar da grande diversidade de espécies existentes no Brasil, as serpentes apresentam um visível declínio de suas populações, sendo ele relacionado com o aumento da expansão humana e do agronegócio, bem como do tráfico de animais. Outro fator relevante, é a sensibilidade que estes seres podem causar no ser humano, podendo gerar medo e ódio, o que contribui para a morte indiscriminada destas espécies (Mendes, 2018).

Dados os problemas relacionados a conservação da fauna nativa, a criação de animais em cativeiro surge como uma importante ferramenta para a conservação de diversas espécies. No entanto, ainda existem inúmeras lacunas de informações essenciais para a manutenção desses animais em cativeiro, especialmente no que se refere ao seu comportamento, nutrição, fisiologia e, principalmente, reprodução (Pizzutto *et al.*, 2021). As serpentes destacam-se para ilustrar essa problemática, uma vez que, ainda que sua criação em cativeiro venha se intensificando, seja para o mercado pet ou para fins de pesquisa, a sua reprodução ainda enfrenta desafios, que vão desde a ausência de reprodução até uma considerável ineficiência resultante da redução no número de filhotes obtidos (Zacariotti *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o uso de biotécnicas da reprodução podem contribuir significativamente para a manutenção e o aumento do número de indivíduos mantidos

sob cuidados humanos, bem como auxiliar no gerenciamento genético das populações (Zacariotti *et al.*, 2010; Pizzutto *et al.*, 2021). Diversas biotécnicas são utilizadas na reprodução assistida de animais selvagens, podendo ser citadas a colheita, avaliação e criopreservação seminal, a inseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões (Silva, 2014). Apesar dos avanços, o uso de reprodução assistida em répteis ainda apresenta desafios significativos quando comparado a outros grupos de animais (Zacariotti *et al.*, 2010). Nesse táxon, a coleta seminal é uma ferramenta essencial para a aplicação de biotécnicas reprodutivas, como por exemplo, a inseminação artificial.

Um dos métodos utilizado para a coleta de sêmen em serpentes é descrito por Zacariotti *et al.*, (2007), que consiste em uma combinação de massagens no terço final do corpo do animal e a aplicação de anestesia local na região cloacal. Contudo, esse procedimento é mais adequado para espécies peçonhentas, como a cascavel e a jararaca, ou para constritoras com musculatura menos densa, como observado nas cobras-do-milho (Silva, 2022). Já para serpentes com musculatura mais densa, Silva (2022) aponta que há dificuldade significativa para coletar o sêmen, resultando muitas vezes em descargas cloacais, o que acaba por inviabilizar a colheita de material gamético.

Para superar essa limitação, novas pesquisas são necessárias para adaptar ou desenvolver métodos eficazes de coleta seminal em serpentes. A obtenção bem-sucedida de células gaméticas pode beneficiar tanto a reprodução em cativeiro e o desenvolvimento do mercado de pets não convencionais, quanto a conservação de espécies ameaçadas, tanto *in situ* quanto *ex situ*. Ainda, se faz necessária a caracterização do ejaculado dessas espécies, visando criar abordagens mais adequadas para a correta avaliação e criopreservação de amostras, portanto, o atual trabalho, visa estabelecer um novo método de coleta seminal eficaz para diversas espécies de serpentes.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Diminuição da biodiversidade**

O Brasil é reconhecido como um dos países com maior biodiversidade de fauna e flora no mundo. No entanto, essa riqueza biológica vem diminuindo de forma evidente devido a diversos fatores, sendo o desmatamento o principal deles. Esse processo é altamente acentuado no Brasil, e provoca grandes alterações nas

paisagens naturais, já que a vegetação derrubada geralmente cede espaço às monoculturas extensivas, com a plantação de grãos e pastagens destinadas à produção agropecuária (Mittermeier *et al.*, 2005).

A perda de biodiversidade é um problema em escala global, e que vem sendo descrito como a sexta grande extinção em massa do planeta. No entanto, diferentemente das extinções anteriores, esta se destaca por ser amplamente influenciada pela ação antrópica. É importante ressaltar que as extinções naturais de espécies ocorrem há milhares de anos, em sua maioria devido a mudanças nos ambientes causadas por fatores naturais, que geralmente acontecem de forma gradual, permitindo que os indivíduos se adaptem, haja especiação e sobrevivam. Entretanto, na época do Antropoceno, as mudanças tornaram-se cada vez mais bruscas e rápidas, dificultando a adaptação das espécies e, conseqüentemente, levando muitas à extinção (Mega, 2024).

A perda da biodiversidade não afeta apenas a fauna e a flora, mas também impacta significativamente a vida humana, já que essa crise compromete diversos serviços ecossistêmicos, como a polinização e a purificação da água (Ceballos *et al.*, 2015). Uma das formas que é utilizada para quantificar o número de espécies que correm risco de extinção se trata da Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas, que foi criada em 1964 pela União Internacional Para a Conservação da Natureza (IUCN). A lista é utilizada como um indicador da biodiversidade mundial e como é uma ferramenta para aumentar o alcance de informações acerca das espécies e populações. De acordo com a IUCN, o número atual de espécies de animais que correm risco de extinção é de cerca de 46.300, sendo este um número que tende a aumentar ao longo dos anos (IUCN, 2025).

Diversos fatores contribuem para a aceleração da crise da biodiversidade. Diniz (2017) classifica essas causas em duas formas principais: direta e indireta. Na forma direta, o alvo principal são os animais e seus subprodutos, destacando-se a caça de subsistência ou esportiva, o tráfico e a captura ilegal de animais. Já a forma indireta ocorre devido a distúrbios ambientais que, embora não tenham como objetivo atingir diretamente as espécies selvagens, acabam impactando sua sobrevivência. Isso resulta, frequentemente, na remoção dos animais de seu habitat natural ou em sua morte, geralmente causadas pela perda e degradação de habitats, expansão humana e construção de estradas e rodovias.

O tráfico de fauna silvestres no Brasil é amplamente difundido, e está relacionado com a exploração irregular de animais. Dentre elas, estão a captura, transporte, comercialização e compra de animais ou parte de animais, que conseqüentemente gera impactos ao meio ambiente. Adicionalmente, as práticas empregadas no tráfico de animais silvestres, tendem a ser precárias e cruéis, uma vez que, muitos são enviados de forma irregular o que lhes conferem danos a sua integridade física e podem culminar na sua morte. Atualmente, o tráfico de animais silvestres é a terceira prática ilegal mais rentável do mundo, ficando atrás apenas do tráfico de drogas e armas, e assim como foi citado anteriormente, a taxa de mortalidade dos animais traficados é alta, levando-se em conta de que apenas 10% dos animais chegam vivos ao seu destino final (Nassaro, 2010).

Como exemplo de atividade antrópica que interfere na biodiversidade, pode-se citar a construção de novas estradas e rodovias. Essas infraestruturas frequentemente cortam fragmentos de matas, forçando muitos animais a atravessá-las para migrar de um fragmento para outro, o que resulta em atropelamentos, ocasionando mutilações ou morte, especialmente de animais de movimentação lenta como preguiças e serpentes de grande porte. De acordo com o Centro Brasileiro de Ecologia de Estradas, cerca de 15 animais são atropelados a cada segundo, totalizando 1,3 milhões por dia e cerca de 475 milhões por ano (ICMBio, 2014). Além disso, as estradas provocam vários problemas para a fauna, pois alteram comportamentos, facilitam a introdução de espécies exóticas e isolam populações em áreas menores. Isso aumenta as taxas de endogamia e reduz a adaptabilidade das espécies (Abrantes *et al.*, 2018).

## **2.2 Características das serpentes**

As serpentes apresentam corpo alongado e recoberto de escamas e com ausência de membros anteriores e inferiores, podendo em algumas espécies apresentarem esporões, que para alguns pesquisadores tratam-se de membros vestigiais (Fraga, 2014). As serpentes são predadores, que devido à ausência de audição e membros locomotores, e baixa visão (exceto as serpentes arborícolas), acabaram desenvolvendo outros sentidos, como o olfato, onde as mesmas utilizam da língua bifurcada para captar as moléculas de odor do ambiente e as transfere para o órgão de Jacobson, fazendo com que o animal consiga sentir o cheiro de suas presas, alguns animais apresentam fosseta loreal (Viperidae) e labial (Boidae), que funcionam

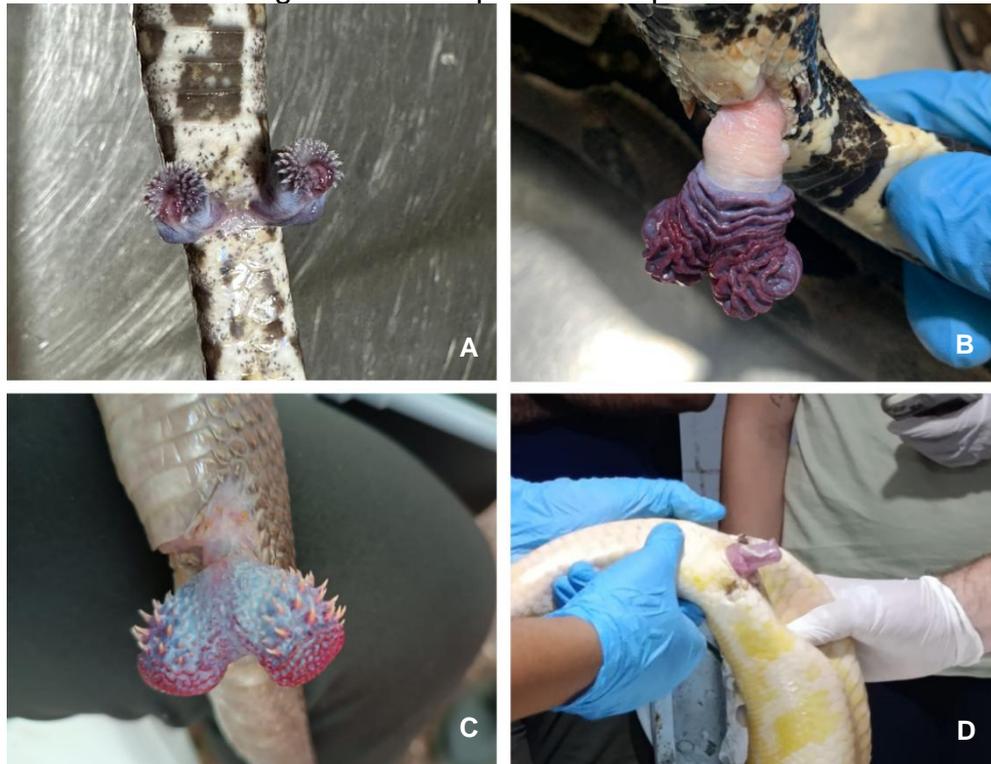
como receptores de calor, que por sua vez, auxiliam esses animais a encontrar a localização de suas presas e capturarem (Bernade, 2012).

As serpentes apresentam diferentes tipos de dentição e formas de capturarem e abaterem suas presas, sendo encontradas quatro tipos de dentições que se diferenciam em tamanho e na presença ou ausência de sulcos por onde a peçonha escorre, sendo elas, a dentição Solenóglifa, encontradas nas serpentes da família Viperidae, nesse tipo dentição a presa inoculadora de peçonha se localiza na região anterior da boca, é grande, oca e móvel e possui sulco por onde a peçonha escorre, na dentição proteróglifa, as serpentes apresentam presas inoculadores de peçonhas na região anterior da boca, sendo essas presas pequenas, ocas e imóveis, esse tipo de dentição encontrada em algumas serpentes da família Colubridae, o outro tipo de dentição é a opistóglifa, onde as presas se localizam na região posterior da boca, apresenta tamanho pequeno, também apresenta sulco e é imóvel, por fim, encontra-se a dentição do tipo áglifa, onde os dentes são maciços e ausência de sulcos para escorrer peçonha, comumente encontrada em serpentes da família Boidae e Phytionidae, que por sua vez matam suas presas por constrição, e por esses motivos estes animais apresentam uma maior densidade muscular, quando comparada com as outras famílias (Albuquerque, 2022).

### **2.3 Sistema reprodutor de serpentes**

Devido a morfologia alongada apresentada pelas serpentes, os seus corpos apresentam adaptações, com órgãos pares podendo apresentar assimetrias morfológicas, e órgãos direitos mais craniais que os esquerdos. O sistema reprodutor dos machos encontra-se na cavidade celomática entre a vesícula biliar e os rins, e é composto por dois testículos recobertos tecido conjuntivo, partindo dos testículos tem-se o epidídimo e a seguir os ductos deferentes se ligam a papila genital, que pode ser avistada na região da cloaca, próximo a região do sulco espermático. O órgão copulatório das serpentes é denominado como hemipênis, possui número par, formato variado de acordo com a espécie (Figura 1) e mantem-se invaginado na região da cauda. Trata-se de um órgão retrátil, que é externalizado antes do coito, e que quando exposto apresenta espículas que são utilizadas para a fixação e estímulo da fêmea durante a cópula (Zacariotti *et al.*, 2007; Silva, 2012; Grego *et al.*, 2014).

Figura 1 – Hemipênis de serpentes.



Legenda: A: Hemipênis de Corn snake (*P. guttatus*), B: Hemipênis de Jibóia (*B. constrictor*), C: Hemipênis de Cascavel (*C. durissus*), D: Hemipênis de Píton Birmanesa (*P. morulus bivittatus*).  
Fotos: Gabriel Barreto Pinto (2024).

As fêmeas também possuem adaptações do seu sistema reprodutivo, possuindo duas vaginas ligadas a ovidutos alongados, paralelos, mas assimétricos, com o direito sendo mais longo que o esquerdo. Essas estruturas levam aos ovários, que são difusos e assim como os testículos, encontram-se entre a vesícula biliar e os rins. O útero das serpentes é o local onde os embriões se desenvolvem, possuindo câmaras onde os ovos são produzidos ou, no caso das espécies vivíparas, os embriões permanecem durante a gestação (Pizzatto *et al.*, 2006; Zacariotti *et al.*, 2007; Silva, 2012; Grego *et al.*, 2014).

Em algumas espécies, há uma região denominada útero posterior, que se localiza na porção uterina anterior à vagina, em formato alongado e não pregueado, e que se contrai após a cópula e dilata-se durante a prenhez. É devido a esta contração que as fêmeas conseguem reter e estocar espermatozoides (Pizzatto *et al.*, 2006). Eles são armazenados neste espaço até serem liberados para fertilizar os ovos internamente. Esse método de reprodução separa a transferência de esperma da fertilização propriamente dita, permitindo que os gametas masculinos fertilizem em um momento e local favoráveis ao desenvolvimento dos embriões. A assincronia que ocorre entre a vitelogênese e a fertilização promove esse tipo de estocagem de

esperma em viperídeos, a exemplo das serpentes do gênero *Crotalus* e *Bothrops* (Almeida-Santos, 2005).

## 2.4 Reprodução das serpentes

As serpentes são animais de hábitos solitários, e se encontram unicamente durante o período reprodutivo, onde os machos buscam as fêmeas dispersas no ambiente através de feromônios exalados por elas (Zacariotti *et al.*, 2010; Grego *et al.*, 2014). Os indivíduos não apresentam dimorfismo sexual aparente, uma vez que seus órgãos reprodutivos se encontram na cavidade celomática. Apesar disso, algumas serpentes apresentam diferenças sutis entre os sexos, a exemplo de diferentes tamanhos corporais, discretas variações na coloração e no tamanho da cauda (Pizzatto *et al.*, 2007). Em relação aos filhotes, há a possibilidade de se desenvolverem por oviparidade ou viviparidade. No primeiro caso, os filhotes se desenvolvem externamente ao corpo da mãe, por meio da deposição dos ovos no meio ambiente. Já no segundo método, os filhotes se desenvolvem internamente ao corpo da fêmea (Pizzatto *et al.*, 2007; Silva, 2012; Grego *et al.*, 2014; Reis, 2016).

As serpentes apresentam sazonalidade reprodutiva, sendo esse um processo fisiológico adaptativo que restringe a reprodução a um período específico do ano e que garante que a cópula e o nascimento ocorram em condições favoráveis à sobrevivência dos filhotes (Toazza, 2018). A sazonalidade reprodutiva das serpentes está associada a diversos fatores ambientais, os quais variam entre as espécies, como temperatura, umidade relativa, fotoperíodo e disponibilidade de alimento, (Lima *et al.*, 2019). A reprodução se inicia com o aumento da alimentação e aquisição de energia, sendo o custo energético da reprodução mais acentuado para as fêmeas, uma vez que elas necessitam mobilizar suas reservas de gordura para a vitelogênese (Quadro 1). A vitelogênese pode ser dividida em dois tipos: Primária – caracterizada por folículos em tamanho reduzido e transparente; e a Secundária – que se distingue em folículos aumentados e com coloração esbranquiçada ou amarelada.

Quadro 1 - Fases da vitelogenese.

Fase 1	Fase inicial, onde os estrógenos estimulam o fígado a converter as reservas lipídicas na proteína vitelogenina (Lima <i>et al.</i> , 2019).
Fase 2	Transporte da vitelogenina para os ovários (Lima <i>et al.</i> , 2019).
Fase 3	Incorporação da vitelogenina aos óvulos em desenvolvimento, em seguida transformará em vitelo e iniciará seu crescimento e acumular nutrientes (Pizzatto <i>et al.</i> , 2006)
Fase 4	Após o acúmulo de vitelo, o óvulo aumenta de tamanho, ficando pronto para receber a fertilização e em seguida iniciar o desenvolvimento do embrião (Pizzatto <i>et al.</i> , 2006)

Quanto a espermatogênese das serpentes, pode ser classificada como contínua quando o animal mantém a produção espermática o ano inteiro, ou descontínua (sazonal), onde o animal produz espermatozoides de forma restrita a determinadas épocas do ano (Pizzatto *et al.*, 2006). Nas serpentes cuja espermatogênese apresenta sazonalidade, a mesma pode ser classificada como pré-nupcial, onde os espermatozoides são produzidos anteriormente a época de acasalamento, ou pode ser pós-nupcial, quando a produção dos gametas masculinos é realizada posteriormente a época de cópula e os machos necessitam estocar os gametas até o acasalamento (Saint-Girons, 1982; Seigel & Ford, 1987 *apud* Pizzatto *et al.*, 2006).

Para as espécies assíncronas, há o armazenamento de espermatozoides tanto pelos machos, quanto pelas fêmeas, sendo esta tática comumente observadas em *viperidae*. Apesar disso, este mecanismo evoluiu de forma convergente para os mais diversos grupos de serpentes, constituindo uma tática biológica eficaz, e que garante que os machos consigam copular após longos períodos. Esse é uma estratégia mais evidente e importante em serpentes que habitam regiões temperadas, uma vez que elas tendem a passar por períodos de hibernação (Carvalho *et al.*, 2024).

Durante o período reprodutivo, os machos são atraídos pelas trilhas de feromônios liberados pelas fêmeas no ambiente. Eles são produzidos durante a vitelogenese, sendo esses feromônios derivados de substâncias associadas à vitelogenina (Zacariotti, 2010; Grego *et al.*, 2014). Nessa fase, em algumas espécies de serpentes, observa-se frequentemente o comportamento de "dança combate" entre machos, que disputam pela oportunidade de copular com a fêmea. O macho vencedor inicia o comportamento de corte, que varia entre as espécies, estimulando a fêmea

com toques para verificar sua receptividade. Em bóieos e pitonídeos, os machos utilizam esporões para intensificar os estímulos táteis nas fêmeas para realizar a cópula (Figura 2). Se a fêmea estiver receptiva, a cópula ocorre, com duração variável de acordo com a espécie.

Outro aspecto importante é a ocorrência de cruzamentos poliândricos em algumas espécies, resultando em ninhadas com filhotes de diferentes pais, o que contribui para a diversidade genética dentro da população. (Pizzatto *et al.*, 2006; Zacariotti *et al.*, 2010; Fraga, 2013; Grego *et al.*, 2014). Após a cópula, a fecundação geralmente ocorre algumas horas depois. Em certas espécies, as fêmeas podem armazenar espermatozoides por anos no útero posterior, mantendo o material seminal viável para futuras reproduções. De acordo com Fraga (2013) e Lima *et al.* (2019), essa estrutura anatômica, anteriormente mencionada no texto, é denominada espermoteca.

Figura 2 – Esporão de macho da espécie Píton Birmanesa (*Python morulus bivittatus*)



Fonte: Arquivo pessoal (2022).

De acordo com Lima *et al.*, (2019) o tempo médio de gestação e nascimento dos filhotes e postura dos ovos também é variável (4 a 6 meses) de acordo com as espécies. Nas espécies vivíparas, os filhotes podem ser expelidos em pequenos grupos ou de forma individual, podendo estar envoltos ou não pelo saco amniótico. Durante o parto, os folículos não fecundados também são expelidos, e em alguns casos, como nos boídeos, as fêmeas podem se alimentar deles (Lima *et al.*, 2019). Após o nascimento ou eclosão dos ovos, os filhotes estão prontos para a vida livre, uma vez que as serpentes não apresentam cuidados parentais (Lima *et al.*, 2019).

## **2.5 Desafios da aplicação de biotecnologias da reprodução em animais silvestres**

As aplicações de biotecnologias de reprodução, amplamente observadas na criação de animais domésticos, ainda não estão plenamente desenvolvidas no contexto da manutenção de animais silvestres (Pizzatto *et al.* 2021). Apesar disso, representam uma ferramenta extremamente útil, pois auxiliam na preservação da diversidade genética, tanto de animais mantidos sob cuidados humanos quanto de animais em vida livre.

A aplicação dessas técnicas ainda enfrenta desafios que limitam sua implementação. Entre estes destaca-se a diversidade de espécies animais, já que cada uma possui particularidades anatômicas, fisiológicas e comportamentais. Essas especificidades dificultam a escolha e o sucesso das biotécnicas, impedindo muitas vezes a padronização de protocolos. Como apontado por Pizzutto *et al.* (2021), ainda há uma grande carência de informações sobre essas particularidades, que resultaram de adaptações evolutivas necessárias para a sobrevivência em diferentes ambientes. Muitas dessas adaptações estão diretamente relacionadas à influência seletiva do meio ambiente, sendo observadas tanto em animais de vida livre quanto em cativeiro.

O uso de biotécnicas representa uma ferramenta eficaz para a conservação e perpetuação das espécies, tanto em condições *in situ* quanto *ex situ*. No entanto, o desenvolvimento e a aplicação dessas técnicas enfrentam desafios devido à complexidade dos processos reprodutivos, que incluem o entendimento em separado da processos como a gametogênese, fertilização, desenvolvimento embrionário, além de fatores endócrinos e comportamentais. Essas informações são fundamentais para o avanço e a criação de novas biotécnicas reprodutivas (Comizzoli *et al.*, 2019). Para

muitas espécies, ainda há poucos estudos acerca da eficiência do uso de determinadas técnicas, além de um baixo investimento nesse ramo da ciência. O que se têm é material genético de pouquíssimas espécies armazenadas em bancos de germoplasma, e apesar de ser uma maneira eficaz de proteger a vastidão da diversidade animal, ainda se mostra insuficiente (Pizzutto *et al.*, 2021).

## 2.6 Métodos de coleta seminal em serpentes

O uso de biotecnologias em serpentes ainda é pouco documentado, o que acaba dificultando seu desenvolvimento. No entanto, estudos acerca da biologia reprodutiva desses animais, vem trazendo à tona métodos que auxiliem na coleta de material gamético, para que por sua vez seja utilizado em biotécnicas que auxiliem na conservação desses animais.

Diversos são métodos de coleta seminais, sendo mais comumente utilizado o método desenvolvido por Mengden *et al.* (1980), que consiste na massagem interdigital do terço médio-final na região ventral do animal, afim de propiciar o relaxamento da musculatura do animal e a região cloacal para coleta seminal. Entretanto, a técnica em si não é tão eficiente para serpentes com densidade muscular. Zacariotti *et al.*, (2007), adaptaram a técnica desenvolvida por Mengden *et al.* (1980), onde os mesmos associaram as massagens interdigitais na região ventral do animal, com a aplicação de Lidocaína (15mg/kg) ao redor da cloaca, com a finalidade de aumentar o relaxamento da região cloacal, sendo este método eficaz para serpentes com menor densidade muscular, como os viperidae. Quanto aos animais cuja musculatura é mais desenvolvida, a exemplo das jiboias, este método costuma resultar na liberação de conteúdo fecal (Tourmente *et al.*, 2007; Silva, 2022).

Tourmente *et al.*, (2007), descreveram outro método de coleta seminal para serpentes. Este consistiu na fricção da base do hemipênis do animal com uma sonda de plástico de 1,5mm de diâmetro inserida na abertura cloacal em movimentos para frente e para trás. Desta forma, obtiveram a eversão do hemipênis e em seguida a ejaculação. Os autores apontaram que com este método as amostras tiveram sua contaminação reduzida, uma vez que não há estímulo das glândulas anais, que por sua vez reduz as chances de liberação de excretas.

O uso do eletroejaculador também é descrito na literatura, e consiste no uso de um aparelho que emite pulsos elétricos na região cloacal. Esta técnica já foi utilizada por Quinn *et al.*, (1989) em uma serpente da espécie *Thamnophis marcianus*, onde

foi utilizado o eletroejaculador, e em seguida realizaram a massagem interdigital no terço final do animal com a finalidade de expelir o sêmen. Apesar de terem obtido sucesso na coleta, o material acabou sendo contaminado por urato, o que inviabilizou o uso das amostras.

Outro método utilizado é o descrito por Tavares-Bastos *et al.*, (2024) e Carvalho *et al.*, (2024), onde foi realizada a coleta pós-morte após a eutanásia dos indivíduos e coleta de material diretamente dos epidídimos.

Assim como a coleta seminal, a utilização e disponibilidades de meios de diluição seminal específicos para serpentes são escassos. Entretanto, é possível encontrar na literatura meios que podem ser facilmente encontrados e utilizados para serpentes, como os meios de cultivo celular M199 e Ham's F-10 indicados por Zacariotti (2008), bem como solução salina tamponada com fosfato (PBS) utilizada por Tourmente e colaboradores (2007).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estabelecer um método eficiente para a coleta e caracterização seminal em serpentes de diferentes espécies mantidas em zoológicos da Paraíba.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Viabilizar um método de coleta seminal eficaz para diversas espécies de serpentes;
- Determinar características seminais físicas e químicas dos ejaculados obtidos, tais quais coloração, aspecto e pH;
- Determinar características microscópicas motilidade, vigor, concentração e as patologias espermáticas.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Local e animais**

Os plantéis utilizados no estudo eram compostos por indivíduos mantidos em cativeiro em dois zoológicos do estado da Paraíba. O primeiro, o Zoológico Museu Vivo dos Répteis da Caatinga, está situado na Zona Rural do município de Puxinanã e se dedica à conservação e ao estudo da herpetofauna, especialmente de espécies nativas da Caatinga. O segundo, o Parque Zoobotânico Arruda Câmara (BICA),

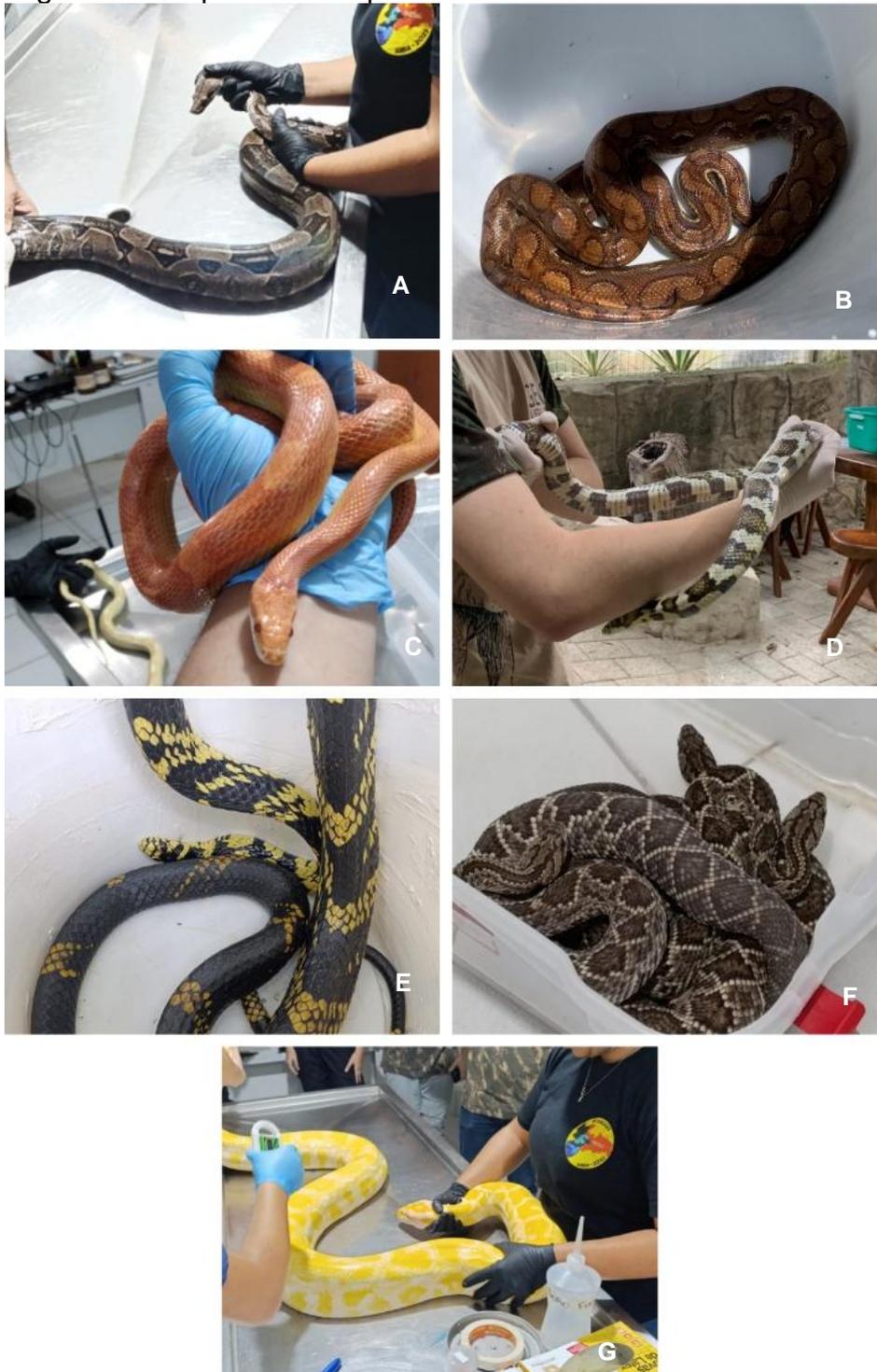
localizado em João Pessoa, capital do estado, é uma unidade de conservação que abriga diversas espécies da fauna silvestre, além de desenvolver atividades de pesquisa e educação ambiental. As avaliações de concentração e morfologia foram realizadas no Laboratório de Estudos de Conservação de Animais Selvagens (LECAS) da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, no Centro de Ciências Agrárias em Areia, Paraíba.

Foram utilizados 15 machos de serpentes disponíveis em cativeiro de zoológicos da Paraíba, pertencentes a quatro famílias distintas, sendo elas Boidae de espécies como Jibóia (*Boa constrictor constrictor* Linnaeus, 1758) (2 indivíduos), Jibóia arco-íris da caatinga (*Epicrates assisi* Machado, 1945) (1 indivíduo), Colubridae, de espécies como Cobra-do-milho (*Pantherophis guttatus* (Linnaeus, 1766)) (6 indivíduos), King-snake (*Lampropeltis* spp.) (2 indivíduos), Caninana (*Spilotes pullatus pullatus* (Linnaeus, 1758)) (1 indivíduo), Viperidae como a Cascavel (*Crotalus durissus cascavella* Wagler in Spix, 1824) (2 indivíduos) e Pythonidae como a Píton birmanesa (*Python molurus bivittatus* (Kuhl, 1820)) (1 indivíduo) conforme mostrado na figura 1. Na tabela 1 encontram-se dados referentes as espécies utilizadas, como denteição, status de conservação e interesse comercial.

Tabela 1 – Informações sobre as espécies utilizadas

<b>Espécie</b>	<b>Nativa ou Exótica</b>	<b>Dentição</b>	<b>Status de conservação</b>	<b>Interesse comercial</b>
<b>Corn snake</b>	Exótica	Áglifa	Pouco preocupante (IUCN, 2015)	Não, venda proibida no Brasil
<b>King snake</b>	Exótica	Áglifa	Pouco preocupante (IUCN, 2016)	Sim
<b>Jibóia</b>	Nativa	Áglifa	Pouco preocupante (IUCN, 2014)	Sim
<b>Cascavel</b>	Nativa	Solenóglifa	Pouco preocupante (IUCN, 2015)	Sim (Medicina)
<b>Jibóia arco-iris da Caatinga</b>	Nativa	Áglifa	Pouco preocupante (IUCN, 2012)	Sim
<b>Caninana</b>	Nativa	Áglifa	Pouco preocupante (IUCN, 2015)	Sim
<b>Pítton Birmanesa</b>	Exótica	Áglifa	Vulnerável (IUCN, 2011)	Sim

Figura 3 – Serpentes nas quais foram realizadas as coletas de material.



Legenda: A: *B. constrictor*, B: *E. assisi*, C: *P. guttatus*, D: *Lampropeltis sp.*, E: *S. pullatus*, F: *C. durissus*, G: *P. morulus bivittatus*.

Fotos: Arquivo pessoal & Gabriel Barreto Pinto (2024).

#### 4.2 Coleta Seminal

As coletas seminais foram realizadas durante exames de rotinas dos animais, tendo acompanhamento dos veterinários e técnicos responsáveis pelos animais.

A coleta seminal seguiu o método descrito por Mengden et al. (1980) e adaptado por Zacariotti et al. (2007). Inicialmente, os animais foram pesados para garantir a dosagem correta da lidocaína a 1% (15 mg/kg) (Tabela 2). Em seguida, foram contidos em tubos de acrílico (Figura 4) para facilitar o manejo durante o procedimento.

Posteriormente, a região cloacal foi higienizada com álcool 70% para remover impurezas, garantindo a assepsia do local. A anestesia local foi administrada por meio da aplicação subcutânea de lidocaína a 1% em quatro pontos ao redor da cloaca, utilizando seringa e agulha hipodérmica. Essa técnica teve como objetivo promover o relaxamento da musculatura e facilitar a obtenção da amostra.

Após um período de espera de 15 minutos para permitir a ação completa do anestésico, os animais foram novamente contidos, e uma massagem foi aplicada no terço final do corpo (Figura 4). Durante a massagem, um tubo do tipo Eppendorf® foi posicionado lateralmente à cloaca para realizar a coleta do sêmen, que foi então armazenado para análises subsequentes. No entanto, após a realização de testes piloto, identificaram-se algumas dificuldades no método de coleta seminal, o que levou à necessidade de adaptações para garantir o sucesso do procedimento. As modificações realizadas estão detalhadas na seção de discussão deste trabalho.

Figura 4 – Contenção, massagem e coleta seminal.



Legenda: A: Animal contido em tubo de acrílico; B: Massagem para coleta seminal, setas indicam a direção que a massagem deve ser realizada; C: Inserção de capilar para coleta seminal

Foto: Arquivo pessoal & Gabriel Barreto Pinto & Joyce Kamilly (2024)

Após a colheita, os animais foram mantidos em observação, uma vez que alguns indivíduos apresentaram exposição do hemipênis durante o procedimento. Nesses casos, os animais foram colocados em caixas plásticas com água fria até que o hemipênis retornasse à sua posição anatômica interna.

Tabela 2 - Dados dos animais (Local, tamanho peso e dose de lidocaína utilizada).

<b>Animal</b>	<b>Local</b>	<b>Tamanho (cm)</b>	<b>Peso (Kg)*</b>	<b>Dose Lidocaína (mL)*</b>
<b>Corn Snake 01</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	PZAC	110 cm	0,28	0,2
<b>Corn Snake 02</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	PZAC	125 cm	0,4	0,3
<b>Corn Snake 03</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	PZAC	100 cm	0,25	0,2
<b>Corn Snake 04</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	PZAC	98 cm	0,25	0,1
<b>Corn Snake 05</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	PZAC	112 cm	0,30	0,2
<b>Corn Snake 06</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	PZAC	112 cm	0,29	0,2
<b>King Snake Albina</b> <i>Lampropeltis getula</i>	PZAC	110 cm	0,45	0,3
<b>King Snake Híbrida</b> <i>Lampropeltis sp.</i>	MVRC	137 cm	0,70	0,5
<b>Jibóia BICA</b> <i>Boa constrictor</i>	PZAC	162 cm	2,6	2,2
<b>Jibóia Répteis da Caatinga</b> <i>Boa constrictor</i>	MVRC	160 cm	1,9	1,4
<b>Cascavel BICA</b> <i>Crotalus durissus</i>	PZAC	160 cm	9,4	0,7
<b>Cascavel Répteis da Caatinga</b> <i>Crotalus durissus</i>	MVRC	138 cm	3,0	2,2
<b>Caninana</b> <i>Spilotes pullatus</i>	MVRC	210 cm	2,5	1,8
<b>Jibóia Arco-íris da Caatinga</b> <i>Epicrates chenchria assisi</i>	MVRC	102 cm	0,47	0,3
<b>Pítón Birmanesa</b> <i>Python morulus bivittatus</i>	PZAC	312 cm	17,0	12,7

PZAC - Parque Zoobotânico Arruda Câmara (BICA); MVRC - Museu Vivo dos Répteis da Caatinga; \* Peso e doses com valores arredondados em duas e uma casa decimal respectivamente

### 4.3 Análise seminal

A metodologia empregada para a análise das características físicas e microscópicas do sêmen seguiu as diretrizes estabelecidas no *Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen Animal*, publicado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

#### **4.3.1 Avaliação das características físicas do ejaculado**

I - Cor: Foi realizada de forma subjetiva por observação direta, e classificada entre esbranquiçado (coloração mais clara), branco, marfim, acinzentado até amarelado (coloração mais escura).

II - Aspecto: Foi realizada de forma subjetiva por observação direta, sendo classificada dentro dos parâmetros de aquosa, leitosa, cremosa, gelatinosa ou serosa.

#### **4.3.2 Avaliação das características químicas do ejaculado**

O pH foi avaliado imediatamente após a coleta com auxílio de fita de aferição de pH (Figura 7), seguindo as recomendações do fabricante, onde amostras do ejaculado puro foram inseridas nas marcações coloridas das fitas, sendo elas classificadas com pH de 1 a 14.

Figura 5. Teste de pH.



Foto: Arquivo pessoal (2023)

#### **4.3.3 Avaliação das características microscópicas do ejaculado**

I - Motilidade: Foi avaliada por meio de uma alíquota de 10 $\mu$ L de sêmen pré-diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (1:200). Em seguida, 10 $\mu$ L dessa diluição foram depositados entre lâmina e lamínula, para ser observada em microscópio óptico de luz em aumento de 400x. A avaliação foi realizada por meio da observação subjetiva direta da porcentagem de espermatozoides com movimentos em relação ao total de espermatozoides presentes no campo óptico, onde foram avaliados cinco campos por amostra.

II - Vigor: Foi avaliado na mesma lâmina onde a motilidade foi avaliada, sendo classificado em uma escala de 0 a 5, sendo 0 a ausência de movimento e 5 o movimento vigoroso e veloz dos espermatozoides, sendo também avaliados cinco campos por amostra.

III - Concentração: Foi utilizada uma alíquota de 10µL de sêmen in natura fixado em 2 mL de formol salina (1:200). Essa solução foi inserida na câmara de Neubauer, e após o preenchimento dos dois lados da câmara, ela foi deixada em repouso horizontal por 5 minutos para que houvesse a decantação das células. Os espermatozoides foram contados com auxílio de microscópio óptico de luz, em aumento de 400X, onde foram contados cinco quadrados em cada um dos lados da câmara e foi realizada a soma dos valores obtidos em cada lado. Quando foi observado uma diferença maior do que 10% para os valores de cada um dos lados, novo preenchimento da câmara e uma nova contagem foi realizada, uma vez que essa diferença pode indicar uma homogeneização da amostra ou preenchimento inadequado da câmara. Para realizar o cálculo da concentração por mL de ejaculado (sptz/mL), foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Concentração} = \frac{A}{\frac{1}{b} \times \frac{n}{25} \times \frac{1}{10}} \times 10^3$$

Onde 'A' representa o número de espermatozoides contados, 'B' representa o fator de diluição, 'n' o número de quadrados contados e 1/10 um parâmetro fixo que representa a altura da câmara.

IV - Morfologia: A morfologia dos espermatozoides foi acessada por meio da técnica de esfregaço corado com panótico rápido (Laborclin®). Para isso, uma alíquota de 10 µL do sêmen diluído em formol salina (1:200) foi depositada sobre uma lâmina de vidro sendo o esfregaço realizado com outra lâmina em ângulo de 45°, formando um filme fino e homogêneo. Após a secagem ao ar, as lâminas foram coradas com o kit de coloração panótico rápido. O protocolo foi seguido conforme as orientações do fabricante, as lâminas foram lavadas com água destilada, secas ao ar e analisadas em microscópio óptico com aumento de 1000x, utilizando óleo de imersão. Foram avaliados 200 células por lâmina, considerando a presença de alterações morfológicas na cabeça, peça intermediárias e cauda. A morfologia foi classificada em porcentagem de células normais, defeito maiores e menores (Bloom, 1973).

#### 4.4 Análise estatística

Os dados obtidos das colheitas de sêmen de serpentes mantidas em cativeiro foram submetidos à análise descritiva, com o objetivo de caracterizar as variáveis analisadas: coloração, aspecto, pH, concentração espermática, morfologia (proporção

de células normais e defeitos espermáticos). Os resultados foram representados por gráficos e tabelas, permitindo uma visualização clara dos padrões e das variações observadas entre as espécies analisadas. Esses elementos foram utilizados para facilitar a comparação e a interpretação dos dados coletados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coletas seminais foram realizadas ao longo do período reprodutivo da maioria das espécies estudadas, abrangendo as estações do inverno ao verão. Esse aspecto é especialmente relevante para as espécies nativas, uma vez que coincide com seu ciclo natural de reprodução. No entanto, para algumas espécies exóticas, como a píton, as coletas ocorreram fora de seu período reprodutivo. Esse fator pode influenciar as características do material coletado e será discutido em detalhes posteriormente.

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que a metodologia adaptada por Zacariotti *et al.*, (2007), amplamente utilizada para a coleta seminal de serpentes, apresenta eficácia em espécies com musculatura menos densa, como as pertencentes à família Viperidae. Nesses casos, a associação da massagem digital no terço final do corpo com a aplicação de lidocaína contribuiu significativamente para uma coleta seminal eficaz, menos invasiva e com maior taxa de sucesso em serpentes com menor musculatura. No entanto, em espécies com maior densidade muscular, como aquelas das famílias Boidae e Pythonidae, observou-se uma resistência ao método, similar à relatada em coletas anteriores realizadas nos mesmos indivíduos (Silva, 2022). Durante este estudo, testes piloto evidenciaram essa dificuldade em serpentes constritoras, demandando adaptações na técnica.

Entre as adaptações realizadas, destacam-se a massagem para estimular a descarga cloacal antes da aplicação de lidocaína e a inserção do capilar durante a massagem para a coleta do sêmen. Essas modificações permitiram a obtenção de material seminal de todos os quinze indivíduos submetidos ao procedimento, incluindo espécies com musculatura mais densa, como a píton-birmanesa (*Python bivittatus*) e as jiboias (*Boa constrictor* e *Epicrates assisi*).

Inicialmente, foi realizada uma massagem na região ventral para estimular a descarga cloacal, o que ajudou a minimizar a eliminação de resíduos durante a coleta. Em seguida, a região cloacal foi higienizada com álcool 70% para garantir a assepsia do local antes da aplicação da lidocaína, que foi administrada subcutaneamente. A

coleta do sêmen foi realizada pela inserção de um capilar de vidro na região da papila genital, localizada no sulco espermático, o que possibilitou a aspiração do material seminal.

O sucesso da coleta foi alcançado com a inserção do capilar na papila genital, especialmente em espécies de musculatura densa, como as serpentes de maior porte. O tempo necessário para a coleta variou entre os indivíduos (Tabela 3), sendo geralmente menor em serpentes de musculatura menos densa, e maior em serpentes maiores, devido à resistência muscular. O tempo de coleta foi cronometrado e o procedimento foi interrompido assim que não houve mais material seminal no capilar, sinalizando o esgotamento do ejaculado, sendo neste momento que o cronometro era desligado.

Tabela 3 – Tempo da massagem até obtenção do ejaculado.

<b>Animal</b>	<b>Tempo da Massagem (Minutos)</b>
<b>Corn Snake 01</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	3 minutos
<b>Corn Snake 02</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	4 minutos
<b>Corn Snake 03</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	3 minutos
<b>Corn Snake 04</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	5 minutos
<b>Corn Snake 05</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	4 minutos
<b>Corn Snake 06</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	4 minutos
<b>King Snake Albina</b> <i>Lampropeltis getula</i>	3 minutos
<b>King Snake Híbrida</b> <i>Lampropeltis sp.</i>	2 minutos
<b>Jibóia BICA</b> <i>Boa constrictor</i>	10 minutos
<b>Jibóia Répteis da Caatinga</b> <i>Boa constrictor</i>	8 minutos
<b>Cascavel BICA</b> <i>Crotalus durissus</i>	7 minutos
<b>Cascavel Répteis da Caatinga</b> <i>Crotalus durissus</i>	10 minutos
<b>Caninana</b> <i>Spilotes pullatus</i>	5 minutos
<b>Jibóia Arco-íris da Caatinga</b> <i>Epicrates chenchria assisi</i>	6 minutos
<b>Pítton Birmanesa</b> <i>Python morulus bivittatus</i>	16 minutos

Os parâmetros físicos dos ejaculados obtidos apresentaram variação entre as espécies e/ou indivíduos estudados, especialmente quanto à coloração, refletindo suas diferenças fisiológicas individuais. A coloração do ejaculado variou entre branco (Figura 6), marfim e amarelado (Tabela 4), sendo que 60% dos ejaculados eram brancos, 20% tinham coloração marfim e 20% amarelada (Figura 7). Essas variações também ocorreram dentro da mesma espécie, a exemplo do que pode ser visto nas Corn Snakes (*P. guttatus*).

Além das diferenças fisiológicas, as alterações de cor podem estar associadas à presença de urina ou impurezas (CBRA, 2013). Os animais que apresentaram sêmen amarelado (corn snake 03 e 04, e a píton birmanesa) haviam realizado uma descarga cloacal anteriormente as coletas, um mecanismo de defesa das serpentes, que consiste na eliminação de urina e fezes para afastar predadores (Pacheco, 2018). Uma possibilidade é que a descarga tenha sido um fator contaminante para o material, uma vez que a mesma acrescenta sujidades e microorganismos ao ejaculado e apresenta coloração amarelada. Ainda, dentro dos padrões de normalidade do sêmen, amostras de coloração mais escura podem ter correlação com maiores concentrações espermáticas ou com o líquido seminal que acompanha as células espermáticas do ejaculado.

Quanto ao aspecto seminal, o material coletado apresentou uma consistência cremosa em todas as espécies. Esse fator se deve ao fato de o sêmen ser extremamente concentrado e apresentar alta viscosidade, o que dificulta a manipulação e diluição seminal, seja por capilaridade ou por pipetagem. Esse fator é importante de ser mencionado, uma vez que essa característica impede a aferição de alguns parâmetros com o sêmen *in natura*, a exemplo do volume (Silva, 2022).

Tabela 4 - Características físicas dos ejaculados obtidos

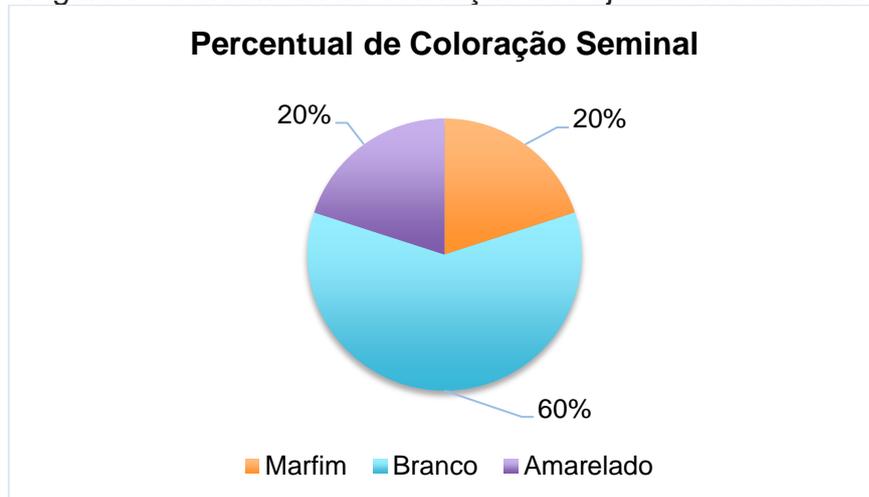
<b>Animal</b>	<b>Coloração</b>	<b>Aspecto</b>
<b>Corn Snake 01</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	Marfim	Cremoso
<b>Corn Snake 02</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	Branco	Cremoso
<b>Corn Snake 03</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	Amarelado	Cremoso
<b>Corn Snake 04</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	Amarelado	Cremoso
<b>Corn Snake 05</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	Branco	Cremoso
<b>Corn Snake 06</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	Branco	Cremoso
<b>King Snake Albina</b> <i>Lampropeltis getula</i>	Branco	Cremoso
<b>King Snake Híbrida</b> <i>Lampropeltis sp.</i>	Marfim	Cremoso
<b>Jibóia BICA</b> <i>Boa constrictor</i>	Branco	Cremoso
<b>Jibóia Répteis da Caatinga</b> <i>Boa constrictor</i>	Branco	Cremoso
<b>Cascavel BICA</b> <i>Crotalus durissus</i>	Branco	Cremoso
<b>Cascavel Répteis da Caatinga</b> <i>Crotalus durissus</i>	Marfim	Cremoso
<b>Caninana</b> <i>Spilotes pullatus</i>	Branco	Cremoso
<b>Jibóia Arco-íris da Caatinga</b> <i>Epicrates chenchria assisi</i>	Branco	Cremoso
<b>Pítton Birmanesa</b> <i>Python morulus bivittatus</i>	Amarelado	Cremoso

Figura 6 – Amostra de sêmen colhido em capilar.



Foto: Joyce Kamilly (2024).

Figura 7 - Percentual de coloração dos ejaculados obtidos.



O pH seminal apresentou-se como uma das únicas características que não variou entre as espécies, uma vez que todos os animais apresentaram um ejaculado ácido ( $\text{pH} = 6$ ). Ainda existem poucos estudos relacionados ao pH seminal das serpentes, no entanto, os valores obtidos coincidem com o valor exposto no trabalho de Oliveira (2024), que descreveu que o sêmen pertencente a um macho de Cascavel (*C. durissus*) apresentou o mesmo valor do pH. Esse é um fator importante para a manutenção e desenvolvimento de meios de diluição seminal que auxiliem na

integridade e sobrevivência dos espermatozoides em ambiente externo ao corpo do animal.

Os parâmetros microscópicos como o vigor e motilidade do presente estudo, apresentaram variações entre os indivíduos (Figura 9 e 10). O vigor exibiu valores entre 2 e 5, com espermatozoides apresentando movimento vigoroso e rápido, o que indicou uma boa qualidade seminal. Quanto a motilidade espermática, todos os animais, exceto a Corn Snake 03, apresentaram uma alta porcentagem de motilidade total dos espermatozoides, tendo a maioria dos animais uma motilidade igual ou superior a 70%. A única amostra com baixo vigor e baixa motilidade foi obtida da serpente Corn Snake 03. Essa baixa motilidade pode ter ocorrido devido à contaminação da amostra por uma descarga cloacal realizada durante a coleta, o que comprometeu a qualidade dos espermatozoides. Apesar disso, os parâmetros de vigor e motilidade encontrados são semelhantes aos já descritos por Silva (2022) e Oliveira (2024).

Figura 8 – Vigor espermático dos ejaculados obtidos

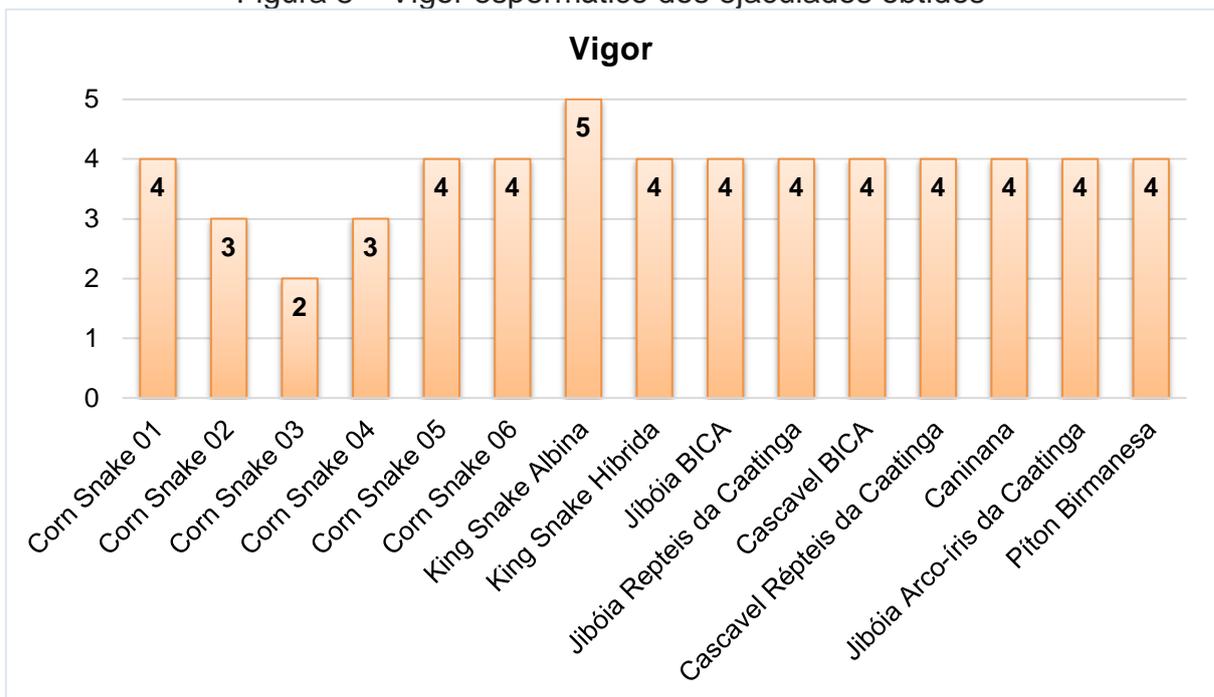
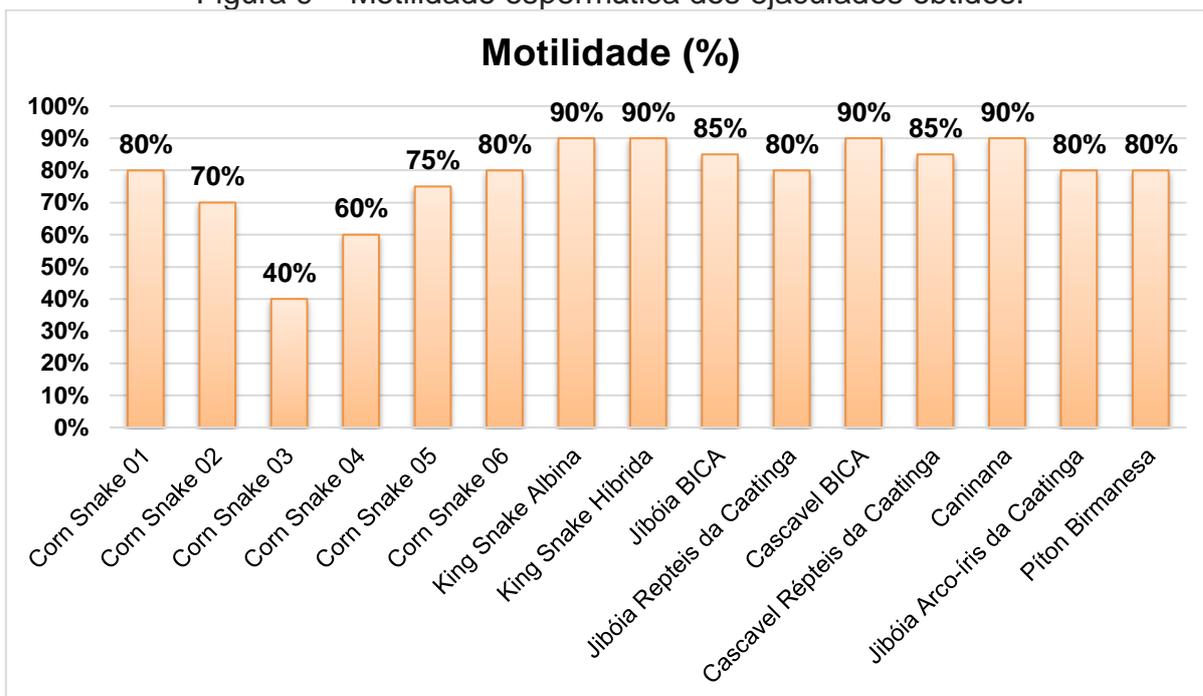


Figura 9 – Motilidade espermática dos ejaculados obtidos.



A elevada motilidade e vigor observados nos espécimes estudados reforçam o potencial reprodutivo desses animais, evidenciando o excelente estado de saúde dos indivíduos mantidos em cativeiro nos zoológicos da Paraíba. Esse estado de saúde está diretamente relacionado aos princípios do bem-estar animal, com destaque para o domínio comportamental, que prioriza a oferta de um ambiente que favoreça o comportamento instintivo das espécies. A reprodução, como um dos principais indicadores de bem-estar, é significativamente influenciada por fatores externos, incluindo manejo nutricional, ambiental e sanitário.

Nos zoológicos analisados, os animais são acompanhados por profissionais especializados que asseguram uma alimentação balanceada, um ambiente enriquecido e devidamente equilibrado (com controle de luminosidade, umidade e temperatura), além de cuidados médicos constantes. Essas práticas contribuem para a manutenção do bem-estar animal e exercem impacto direto na capacidade reprodutiva dos indivíduos.

A concentração espermática apresentou diferenças significativas entre as espécies (Tabela 5), onde pode-se observar que a King snake apresentou a maior concentração ( $1.690 \times 10^6$  spz/mL), enquanto a Píton birmanesa apresentou a maior ( $210 \times 10^6$  spz/mL). Essas diferenças podem estar associadas ao ciclo reprodutivo das espécies, que é espécie-específico. Estes achados estão de acordo com Lima *et al.*, (2019), que destacaram a influência da sazonalidade e do ambiente na reprodução

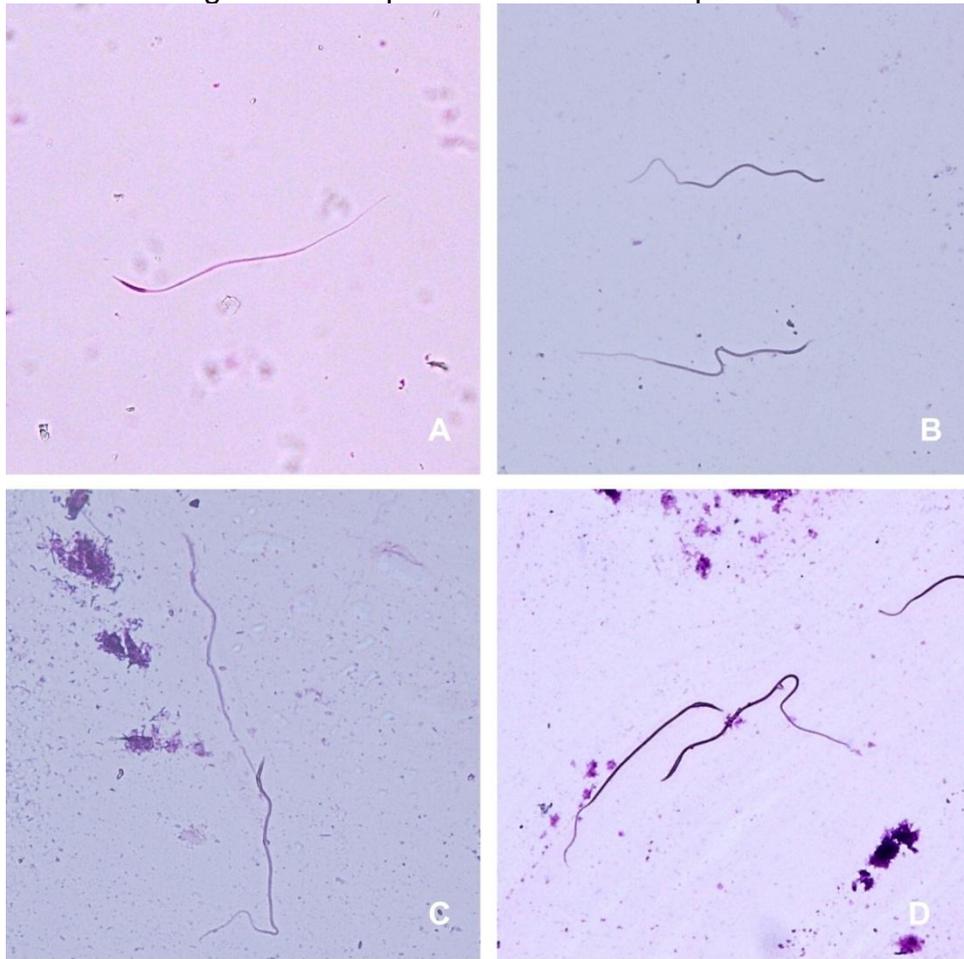
das serpentes. Outro fator relevante acerca da baixa concentração espermática da Píton birmanesa, pode estar relacionado com o fato de o animal apresentar agenesia testicular. A condição morfológica atípica foi descoberta durante um exame ultrassonográfico, que constatou a presença de apenas um testículo. A agenesia testicular consiste na falha completa do desenvolvimento do testículo (Macedo *et al.*, 2011), que pode ser unilateral ou bilateral, e no caso do indivíduo em questão, a anomalia morfológica era unilateral direita.

Tabela 5 – Concentração espermática das serpentes mantidas em cativeiro no estado da Paraíba.

<b>Animal</b>	<b>Concentração (Sptz/mL)</b>
<b>Corn Snake 01</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	565 x 10 <sup>6</sup>
<b>Corn Snake 02</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	500 x 10 <sup>6</sup>
<b>Corn Snake 03</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	515 x 10 <sup>6</sup>
<b>Corn Snake 04</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	540 x 10 <sup>6</sup>
<b>Corn Snake 05</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	630 x 10 <sup>6</sup>
<b>Corn Snake 06</b> <i>Pantherophis guttatus</i>	635 x 10 <sup>6</sup>
<b>King Snake Albina</b> <i>Lampropeltis getula</i>	610 x 10 <sup>6</sup>
<b>King Snake Híbrida</b> <i>Lampropeltis sp.</i>	1.690 x 10 <sup>6</sup>
<b>Jibóia BICA</b> <i>Boa constrictor</i>	415 x 10 <sup>6</sup>
<b>Jibóia Répteis da Caatinga</b> <i>Boa constrictor</i>	295 x 10 <sup>6</sup>
<b>Cascavel BICA</b> <i>Crotalus durissus</i>	590 x 10 <sup>6</sup>
<b>Cascavel Répteis da Caatinga</b> <i>Crotalus durissus</i>	350 x 10 <sup>6</sup>
<b>Caninana</b> <i>Spilotes pullatus</i>	475 x 10 <sup>6</sup>
<b>Jibóia Arco-íris da Caatinga</b> <i>Epicrates chenchria assisi</i>	530 x 10 <sup>6</sup>
<b>Píton Birmanesa</b> <i>Python morulus bivittatus</i>	213 x 10 <sup>6</sup>

Quanto a morfologia espermática, estes apresentaram-se como uma estrutura filiforme para todas as espécies (Figura 11), com cabeça, peça intermediária e cauda bem definidas, assim como descrito por Silva (2014) e Silva (2022). No que se refere a relação de células normais e células com alterações morfológicas (Figura 12), a porcentagem de células normais foi superior ao número de células que apresentavam algum tipo de alteração em sua estrutura. Em sua maioria, os defeitos mais observados foram encontrados na cauda (Figura 13), quando se apresentavam levemente dobradas. Já os defeitos de cabeça foram os menos encontrados, quando se apresentavam com macrocefalia, assim como ocorreu no trabalho de Silva (2022). Alterações morfológicas são facilmente encontradas no ejaculado das mais diversas espécies, e estão relacionadas com os mais diversos fatores, como choques osmóticos e térmicos. As anormalidades podem, por fim, alterar a motilidade dos espermatozoides e reduzir a taxa de fertilização (Gracia, 2011; Mies Filho (1987) *apud*. Silva 2014; De Arruda et al. 2015). As anomalias identificadas podem comprometer significativamente a fecundação, diminuindo ou até mesmo impedindo a reprodução dos indivíduos. Alterações na cabeça dos espermatozoides podem afetar a integridade do material genético e dificultar a penetração no óvulo. Já as anomalias na peça intermediária e na cauda prejudicam a motilidade espermática, aceleram sua capacidade de deslocamento e, conseqüentemente, a eficiência da fecundação.

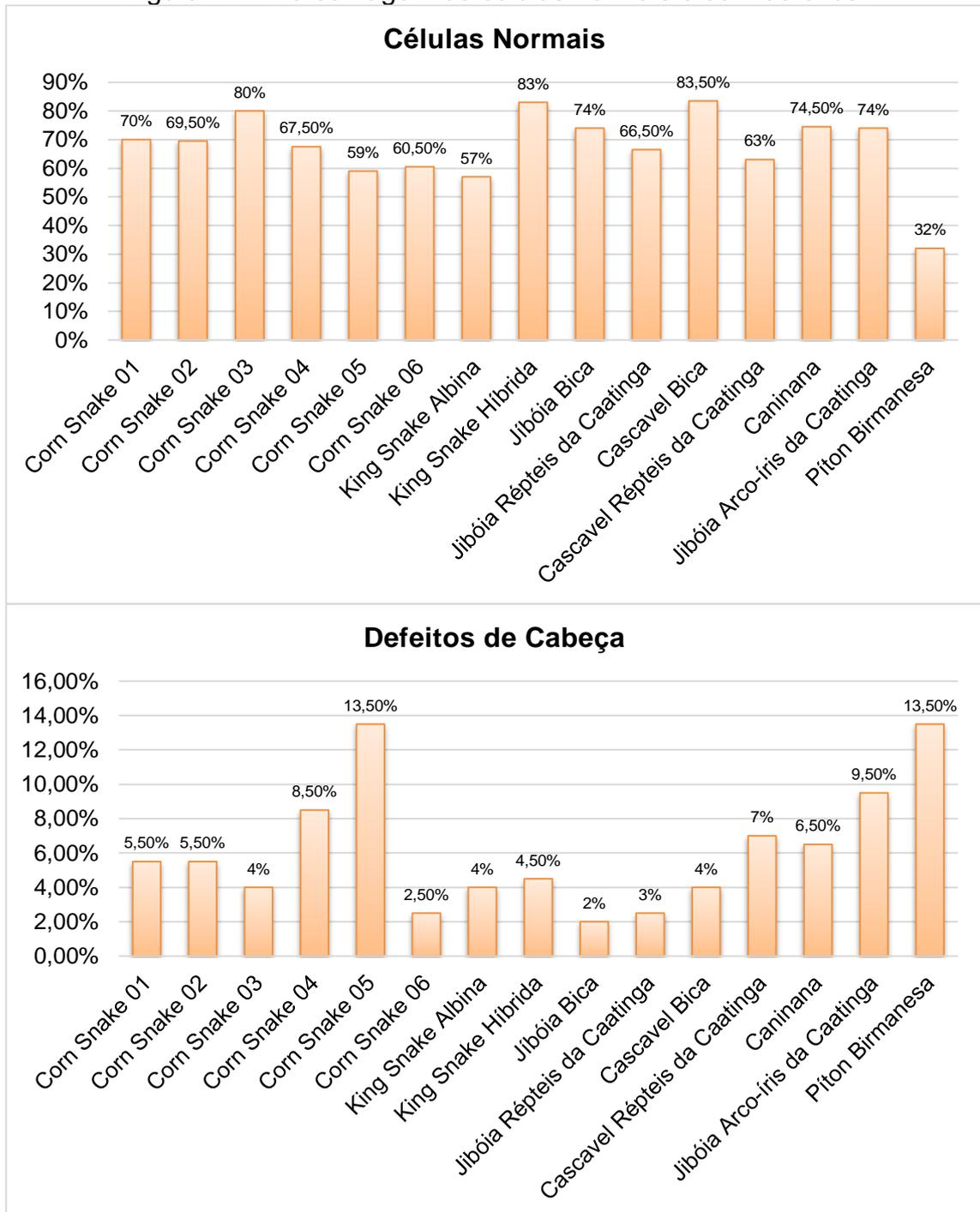
Figura 10 – Espermatozoides de serpentes.



Legenda: A: Espermatozoides de Corn Snake (*P. guttatus*); B: Espermatozoides de Jibóia arco-íris da Caatinga (*E. assisi*); C: Espermatozoide de King Snake (*L. getula*); D: Espermatozoides de Jibóia (*B. constrictor*).

Fotos: Arquivo pessoal (2025).

Figura 11 – Porcentagem de células normais e com defeitos.



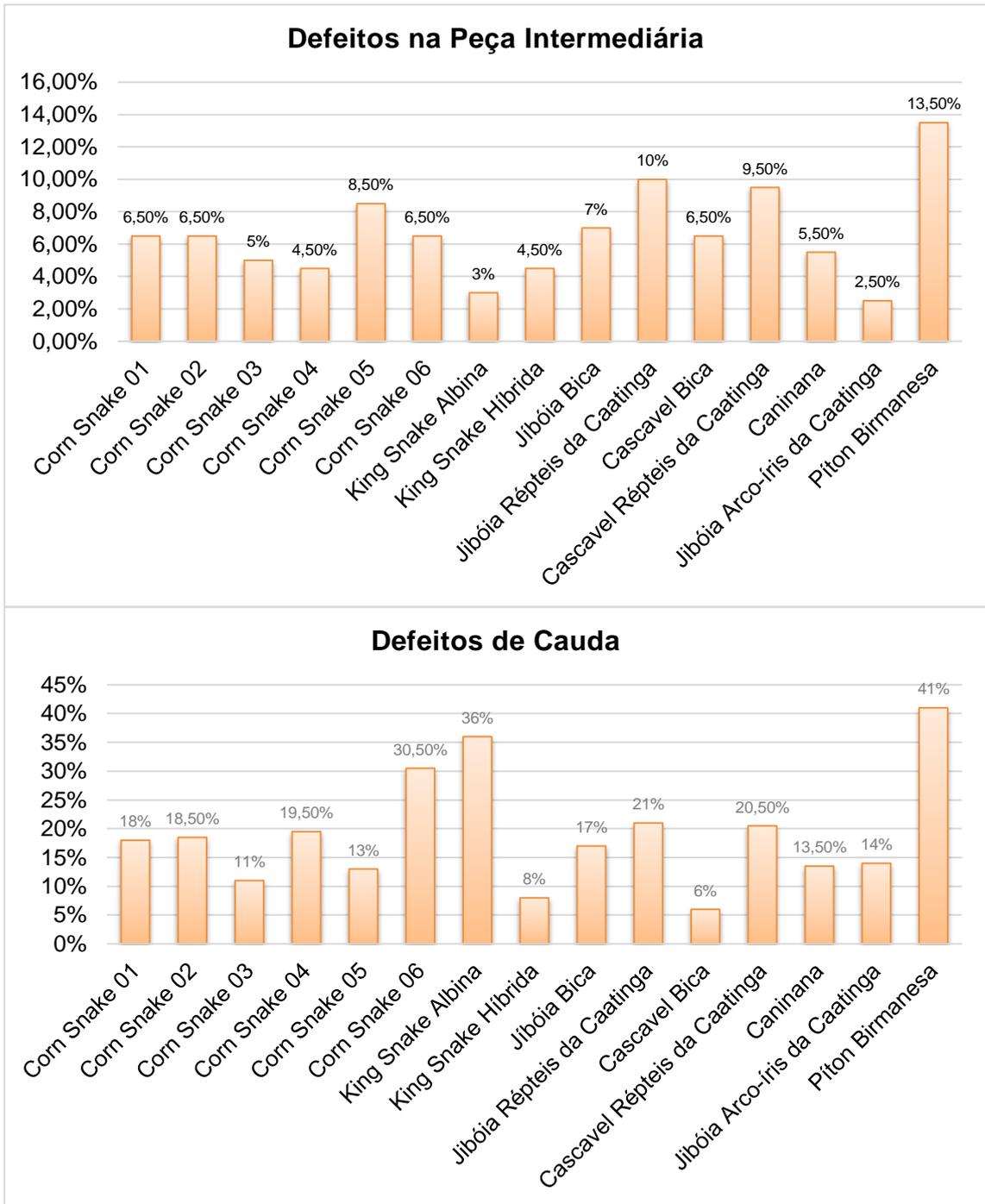


Figura 12 – Defeitos espermáticos



Legenda: A: Cauda dobrada; B: Cauda fortemente dobrada; C: Gota citoplasmática proximal; D: Cauda dobrada.

Fotos: Arquivo pessoal (2025).

Os resultados obtidos reforçam que, apesar da presença de defeitos em algumas células, a maioria dos indivíduos analisados apresentou grande parte dos espermatozoides com boa integridade estrutural. Contudo, a baixa motilidade e o vigor reduzido observados em uma situação específica (Corn snake 03) ressaltam a necessidade de aprimorar os protocolos de manejo e coleta, a fim de minimizar o impacto de fatores adversos.

Estes resultados reforçam a importância da adaptação de biotécnicas para o manejo reprodutivo de serpentes em cativeiro, destacando a aptabilidade e a boa condição reprodutiva dos animais mantidos nos Zoológicos da Paraíba. A eficácia dos métodos aplicados e a alta qualidade do material seminal coletado evidenciaram a viabilidade da técnica empregada e ampliam o conhecimento sobre a biologia reprodutiva de serpentes para que seja possível o desenvolvimento de estratégias

eficientes direcionadas à conservação de espécies selvagens, tanto *in situ* quanto *ex situ*.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo demonstrou que as técnicas de coleta e análise seminal adaptadas para serpentes mantidas em cativeiro são eficazes e seguras, inclusive em espécies com musculatura mais densa. A alta qualidade espermática e a viabilidade celular observadas confirmam a eficiência das técnicas aplicadas e refletem o manejo cuidadoso realizado pelos zoológicos participantes. Os dados obtidos representam uma contribuição significativa para o entendimento da biologia reprodutiva dessas espécies, estabelecendo uma base científica sólida para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas avançadas e protocolos eficazes para a conservação de germoplasma. Ao expandir o conhecimento sobre as características reprodutivas das serpentes, este trabalho reforça o papel das biotecnologias como ferramentas essenciais nas estratégias de conservação, tanto em cativeiro quanto em habitats naturais, promovendo a preservação da biodiversidade e mitigando os impactos das atividades humanas sobre a fauna silvestre.

## REFERÊNCIAS

ABRANTES, Marcela Ramos *et al.* Vertebrados silvestres atropelados na rodovia BR-230, Paraíba, Brasil. **PUBVET**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2018. DOI <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n1a5.1-7>. Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/1200>. Acesso em: 17 nov. 2024.

ALBUQUERQUE, Nelson Rufino. **Manual de identificação das serpentes peçonhentas de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: UFMS, 2022. 56 p. ISBN 978-65-89995-26-5. Disponível em: [https://repositorio.ufms.br/bitstream/123456789/5116/1/MANUAL\\_DE\\_IDENTIFICA%C3%87%C3%83O\\_DAS\\_SERPENTES.pdf](https://repositorio.ufms.br/bitstream/123456789/5116/1/MANUAL_DE_IDENTIFICA%C3%87%C3%83O_DAS_SERPENTES.pdf). Acesso em: 3 fev. 2025.

ALMEIDA-SANTOS, Selma Maria de. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em Crotalus durissus e Bothrops jararaca (Serpentes: Viperidae)**. 2005. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. doi:10.11606/T.10.2005.tde-28062006-143529. Acesso em: 2025-01-15.

BENTO, H. J. *et al.* Aspectos da biologia reprodutiva de Boa constrictor constrictor: um estudo histológico dos testículos nos períodos reprodutivos de quiescência e máxima atividade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 71, ed. 2, p. 1551-1557, 2019. DOI <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11016>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/mbTvHSWjyRKjz9hgFj7mWKG/?lang=pt>. Acesso em: 24 nov. 2024.

BERNARDE, Paulo Sérgio. **Anfíbios e répteis: introdução ao estudo da herpetofauna brasileira**. Curitiba: Anolisbooks, 2012. 318 p. ISBN 97885656224004. Acesso em: 03 fev. 2025.

BLOM, E. Ultrastrukturen af nogle karakteristiske sperimedefekter og forslag til et nyt klassificerings-system for tyrens spermiogram [The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram (author's transl)]. **Nordisk Veterinärmedicin**, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.

CARVALHO, Leonardo; AVELAR, Gleide Fernandes de; RESENDE, Flávia Cappuccio de. *Sperm storage in males of the Neotropical rattlesnake Crotalus durissus (Squamata: Viperidae): Structure and seasonal variation of the distal ductus deferens*. **Theriogenology Wild**, v. 5, p. 100114, 2024. DOI: [10.1016/j.therwi.2024.100114](https://doi.org/10.1016/j.therwi.2024.100114). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2773093X2400045X>. Acesso em: 3 fev. 2025.

CEBALLOS, Gerardo *et al.* Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. **Science Advances**, [s. l.], v. 1, ed. 5, 2015. DOI

<https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253>. Disponível em:  
<https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.1400253>. Acesso em: 11 nov. 2024.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.  
COMIZZOLI, P., BROWN, J.L., HOLT, W.V. (2019). Reproductive Science as an Essential Component of Conservation Biology: New Edition. In: Comizzoli, P., Brown, J., Holt, W. (eds) Reproductive Sciences in Animal Conservation. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1200. Springer, Cham.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-23633-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23633-5_1). Acesso em: 10 Jan. 2025

COSTA, Henrique C. *et al.* **Herpetologia Brasileira**. Brasil: [s. n.], 2021. 171 p. v. 10. ISBN 2316-4670. DOI 10.5281/zenodo.5838950. Disponível em:  
<https://zenodo.org/records/5838950>. Acesso em: 9 jan. 2025.

DE ARRUDA, Rubens Paes *et al.* Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. 2015. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, jan./mar 2015. Acesso em: 14 jan. 2025.

DINIZ, Maria Helena. Defaunação: a atual crise da biodiversidade. **Revista Brasileira de Direito Animal**, Salvador, v. 12, n. 1, 2017. Disponível em:  
<https://periodicos.ufba.br/index.php/RBDA/article/download/22017/14173>. Acesso em: 17 nov. 2024.

DUARTE, Daniela Ferreira *et al.* Tráfico de animais silvestres e seus impactos no meio. **PUBVET**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 1-5, 2021. DOI  
<https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n11a975.1-5>. Disponível em:  
<https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/152>. Acesso em: 17 nov. 2024.

FRAGA, Rafael *et al.* **Guia de Cobras da Região de Manaus Amazônia Central**. Manaus: INPA, 2013. 303 p. ISBN 978-85-211-0122-2. Disponível em:  
<https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/36306/1/guia-cobras.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2024.

GRACIA, Luís Fernando Guerrero. **Alterações morfológicas dos espermatozoides de peixes**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em:  
<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/38725>. Acesso em: 14 jan. 2025.

GREGO, Kathleen Fernandes *et al.* **Squamata (Serpentes)**. In: CUBAS, Zalmir Silvino; SILVA, Jean Carlos R; CATÃO-DIAS, José L. **Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária**. Brasil: Roca, 2014. v. 2, cap. 15, p. 186-218. ISBN 978-85-277-2649-8. Disponível em:  
<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-277-2649-8/>. Acesso em: 13 out. 2024.

ICMBio, 2025. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade – SALVE. Disponível em: <https://salve.icmbio.gov.br/>. Acesso em: 11 Jan. 2025.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **A cada segundo, 15 animais silvestres morrem atropelados no Brasil.** 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/noticias/destaque/a-cada-segundo-15-animais-silvestres-morrem-atropelados-no-brasil>. Acesso em: 17 nov. 2024.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2024. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 11 nov. 2024.

LIMA, Tiago de Oliveira *et al.* Manejo reprodutivo de jiboias e outros bóideos criados em cativeiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], n. 2, ed. 43, p. 276-283, 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/vti-21840>. Acesso em: 24 nov. 2024.

MACEDO, Juliana TSA *et al.* Defeitos congênitos em bovinos da Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 31, p. 297-303, 2011. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000400005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/ZSg93zzYJZrsrpPDNXvjpLH/?lang=pt>. Acesso em: 13 jan. 2025.

MEGA, Orestes Jayme. A catastrófica ecologia do Antropoceno: uma abordagem arqueológica da Sexta Extinção em Massa. **Revista Arqueologia Pública**, Campinas, SP, v. 19, n. 00, p. e24004, 2024. DOI: 10.20396/rap.v19i00.8674456. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/rap/article/view/8674456>. Acesso em: 11 nov. 2024.

MENDES, Bianca Morais. Estudo da percepção ambiental de estudantes: ferramenta para a conservação de serpentes. **Revista Presença Geográfica**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 36-49, 2018. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/bc8c/e1c8398f42a289e8418b6cda8cd07871a38f.pdf>. Acesso em: 13 out. 2024.

MITTERMEIER, Russel A *et al.* Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, [s. l.], v. 1, ed. 1, p. 14-21, 2005. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4616303/mod\\_resource/content/0/Mittermeier%20et%20al.%2C%202005%20-20Breve\\_historia\\_da\\_conservacao\\_no\\_Brasil.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4616303/mod_resource/content/0/Mittermeier%20et%20al.%2C%202005%20-20Breve_historia_da_conservacao_no_Brasil.pdf). Acesso em: 11 nov. 2024.

NASSARO, Adilson Luís Franco. O tráfico de animais silvestres no Brasil. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 1-10, 2010. Disponível em: <https://www.academia.edu/download/107804316/66.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2024.

OLIVEIRA, Amanda Gabriele Albuquerque *et al.* **Coleta seminal de cascavel (*Crotallus durissus cascavella* Wagner in spix, 1824) mantida em cativeiro.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2024. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/31777>. Acesso em: 14 jan. 2025.

PACHECO, Renan Santana. **Efeitos da temperatura no comportamento defensivo de *Oxyrhopus guibei* (Serpentes, Dipsadidae)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/D.41.2019.tde-11012019-151744. Acesso em: 14 jan. 2025.

PIZZATTO, L. *et al.* Biologia reprodutiva de serpentes brasileiras. **Herpetologia no Brasil**, [s. l.], v. 2, p. 201-221, 2006. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/316190993\\_Biologia\\_reprodutiva\\_de\\_serpenes\\_brasileiras](https://www.researchgate.net/publication/316190993_Biologia_reprodutiva_de_serpenes_brasileiras). Acesso em: 24 nov. 2024.

PIZZUTTO, Cristiane Schilbach *et al.* Uma visão integrada das biotecnologias reprodutivas com o conceito de One Conservation. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, MG, v. 45, n. 4, p. 241-245, 2021. DOI DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2021.031. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v45/n4/p.241-245.pdf>. Acesso em: 16 nov. 202.

QUINN, H *et al.* Successful artificial insemination in the checkered garter snake *Thamnophis marcianus*. **International Zoo Yearbook**, [s. l.], v. 28, ed. 1, p. 177-183, 1989. Disponível em: [https://refocus.dk/Thamnophis\\_bibliography.html](https://refocus.dk/Thamnophis_bibliography.html). Acesso em: 3 fev. 2025.

REIS, Paulo Maurício Almeida Guimarães. **Biologia reprodutiva de *Bothrops erythromelas* Amaral, 1923 (serpentes, Viperidae), espécie endêmica do semiárido brasileiro**. 2016. 54 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2016. Disponível em: [http://www.cemafauna.univasf.edu.br/arquivos/files/tcc\\_Paulo.pdf](http://www.cemafauna.univasf.edu.br/arquivos/files/tcc_Paulo.pdf). Acesso em: 24 nov. 2024.

SILVA, Diego Ferreira Muniz da. **Ciclo reprodutivo da caninana, *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2012. doi:10.11606/D.10.2012.tde-08102012-145835. Acesso em: 17 nov. 2024.

SILVA, Kalena Barros da. **Avaliação do espermograma da jararaca-ilhoa, *Bothrops insularis*, (Serpentes: Viperidae) mantidas em cativeiro**. 2014. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-25072014-134042/en.php>. Acesso em: 28 out. 2024.

SILVA, Matheus Henrique Andrade da. **Estudo preliminar para colheita e avaliação seminal de serpentes mantidas em cativeiro**. 2022. 42 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/25636>. Acesso em: 4 dez. 2023.

TAVARES-BASTOS, L.; CUNHA, L. D.; FRANÇA, F. G. R.; DIELE-VIEGAS, L. M.; VIEIRA, G. H. C.; SANTOS, M. G.; VAQUEIRO, A. C.; GOWER, D. J.; COLLI, G. R.;

BÁO, S. N. Comparative electron microscopy study of spermatozoa in snakes (*Lepidosauria, Squamata*). **Micron**, v. 182, p. 103637, 2024. DOI: 10.1016/j.micron.2024.103637. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432824000544>. Acesso em: 3 fev. 2025.

TOAZZA, Rafael. **Influência da sazonalidade nas características reprodutivas de carneiros de raças leiteiras**. 2018. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 2018. Disponível em: [https://www.udesc.br/arquivos/cav/id\\_cpmenu/1289/rafael\\_\\_toazza\\_15671793792394\\_1289.pdf](https://www.udesc.br/arquivos/cav/id_cpmenu/1289/rafael__toazza_15671793792394_1289.pdf). Acesso em: 25 nov. 2024.

TOURMENTE, M.; CARDOZO, G. A.; GUIDOBALDI, H. A.; GIOJALAS, L. C.; BERTONA, M.; CHIARAVIGLIO, M. Sperm motility parameters to evaluate the seminal quality of *Boa constrictor occidentalis*, a threatened snake species. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 1, p. 93-98, 2007. DOI: 10.1016/j.rvsc.2006.06.001. Acesso em: 01 fev. 2024.

ZACARIOTTI, Rogério Loesch e GUIMARÃES, Marcelo Alcino de Barros Vaz. Aplicações da biotecnologia na reprodução de serpentes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 98-104, 2010. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n2/p98-104.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2024.

ZACARIOTTI, Rogério Loesch et al. Semen collection and evaluation in free-ranging Brazilian rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). **Zoo Biology**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 155-160, 2007. DOI: 10.1002/zoo.20126. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19360568/>. Acesso em: 19 nov. 2024.

ZACARIOTTI, Rogério Loesch. **Avaliação reprodutiva e congelamento de sêmen em serpentes**. 2008. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. doi:10.11606/T.10.2008.tde-16012009-144425. Acesso em: 24 nov. 2024.