

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA,
MORFOFISIOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE MACHOS
E FÊMEAS DE *Crotalus durissus terrificus*

PRISCILLA MITIE MATAYOSHI

BOTUCATU – SP
Dezembro 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA,
MORFOFISIOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE MACHOS
E FÊMEAS DE *Crotalus durissus terrificus*

PRISCILLA MITIE MATAYOSHI

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Adj. Nereu Carlos Prestes

BOTUCATU - SP
Dezembro 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Matayoshi, Priscilla Mitie.

Caracterização ultrassonográfica, morfofisiológica do sistema reprodutor de machos e fêmeas de *Crotalus durissus terrificus* / Priscilla Mitie Matayoshi. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Capes: 50504002

1. Cobra venenosa - Reprodução. 2. Ultra-sonografia veterinária.

Palavras-chave: Cascavel; Ciclo Reprodutivo; Progesterona; Testosterona; Ultrassonografia.

Nome do autor: Priscilla Mitie Matayoshi

Título: CARACTERIZAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA, MORFOFISIOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE MACHOS E FÊMEAS DE *Crotalus durissus terrificus*.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Nereu Carlos Prestes
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior
Membro
Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP)
FM – UNESP - Botucatu

Prof^a. Titular Eunice Oba
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 19 de dezembro de 2011.

Dedicatória

*Aos meus pais, Paulo e Regina, pelo
grande apoio e incentivo.*

*À minha irmã Carla pelo carinho e
amizade.*

*Ao Marcelo pelo seu amor, incentivo
constante, paciência e companheirismo.*

*E ao meu filho Pedro que chegou neste
período para trazer uma alegria
imensa na minha vida.*

Agradecimientos

Ao orientador Prof. Nereu Carlos Prestes pela orientação, por acreditar na minha capacidade e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, pela co-orientação e pelas sugestões na realização deste estudo.

Ao Prof. Carlos Roberto Teixeira pela ajuda e incentivo desde o início da pós-graduação e pela participação na banca de qualificação.

À Prof^a Eunice Oba, pela disponibilização do Laboratório de Dosagens Hormonais, pelos ensinamentos durante a análise e interpretação das dosagens e pelas importantes sugestões na banca de qualificação.

Ao Setor de Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Unesp de Botucatu por disponibilizar o aparelho de ultrassom no início do experimento.

À Priscilla Macedo de Souza pela ajuda na realização e interpretação dos exames ultrassonográficos e principalmente pela amizade, companheirismo e apoio durante o projeto de pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), Camila, Guta, Leda, Renata, Bruna, Rodrigo (Ruffles) e Carlos Renato, pela companhia e amizade.

Aos funcionários, pós-graduandos e aprimorandos do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Natália, Isabel, Vivian, Renato, Denis, Priscila, Roberta, Thiago, Daniela, Gustavo, Michelle, Eduardo e Luciana, pelo auxílio na execução do projeto.

Ao Vinicius Peron de Oliveira Gasparotto, pela amizade, boa vontade, paciência e principalmente pelos conhecimentos transmitidos.

Às amigas de pós-graduação Mariana, Maísa e Elisângela, pela companhia e amizade.

Às amigas de São Paulo, Carolina, Tatianna, Natália, Maíra, Priscilla e Bonye, pelo apoio constante e amizade mesmo distantes.

Ao Prof. João Carlos Pinheiro Ferreira pela atenção e auxílio nas dosagens hormonais.

À Prof^a Maria do Carmo pelos estudos anatômicos em serpentes.

À Prof^a Miriam Harumi Tsunemi e Juliana Gadum de Lalla pelas análises estatísticas e importantes sugestões para este estudo.

À bibliotecária Meire pelas correções realizadas na bibliografia.

Ao funcionário da pós-graduação José Roberto pela boa vontade e auxílio durante o período.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou.

À minha sogra Rosa por ter sido tão prestativa, atenciosa e por ter cuidado de tudo enquanto eu escrevia a dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no primeiro ano de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo n^o 2010/04658-2).

A todos que contribuíram com a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Testículos de cascavel (<i>Crotalus durissus terrificus</i>) localizados entre a vesícula biliar e rins.....	10
Figura 2	Períodos de avaliação ultrassonográfica e coleta de sangue...	20
Figura 3	Serpentes em caixas plásticas de polipropileno.....	21
Figura 4	Caixas de polipropileno guarnecidas com potes plásticos de água.....	21
Figura 5	Contenção física com tubo plástico transparente.....	22
Figura 6	Coleta de sangue através da punção da veia coccigeana.....	23
Figura 7	Animal em decúbito dorsal com transdutor acoplado à superfície ventral em corte longitudinal.....	24
Figura 8	Animal em decúbito dorsal com transdutor acoplado à superfície ventral em corte transversal.....	25
Figura 9	A) Testículo de cascavel identificado entre os calipers no modo-B e grandes vasos visibilizados como estrutura tubular com conteúdo anecóico (B) Grandes vasos identificados com o Doppler colorido.....	29
Figura 10	Visibilização parcial do testículo de cascavel devido à presença de conteúdo gasoso em alça intestinal produzindo o artefato de reverberação.....	30
Figura 11	Testículo esquerdo (TE) de cascavel.....	31
Figura 12	Perfil da concentração média de testosterona sérica de 14 machos de cascavéis durante os diferentes meses de avaliação.....	33
Figura 13	Sonograma com folículos vitelogênicos.....	35
Figura 14	Folículos vitelogênicos de cascavel.....	36
Figura 15	Sonograma com folículos vitelogênicos de cascavel agrupados em “cachos”	36
Figura 16	Presença de discreta quantidade de líquido ao redor dos folículos vitelogênicos de cascavel.....	36
Figura 17	Folículos vitelogênicos de cascavel dispostos em cadeia.....	36

Figura 18	(A) Ovócito ou ovo em ovidutos; (B) Presença de líquido em oviduto; (C) Conteúdo líquido entremeado ao vitelo; (D) Embrião localizado em periferia.....	38
Figura 19	Imagens sugestivas de folículos de cascavel em regressão (atrésicos).....	39
Figura 20	Embrião de cascavel em início de calcificação, com diminuição da quantidade de vitelo.....	39
Figura 21	Ovo atrésico de cascavel.....	40
Figura 22	Sonograma de ovo atrésico de cascavel.....	40
Figura 23	Sonograma demonstrando desenvolvimento fetal acentuado, calcificação da coluna vertebral e ausência de vitelo.....	41
Figura 24	Sonograma demonstrando folículo circular e anecóico em período pós-parto.....	41
Figura 25	Folículos pré-vitelogênicos (seta) em ovário de cascavel.....	42
Figura 26	Folículos pré-vitelogênicos de cascavel.....	42
Figura 27	Correlação linear simples do número de filhotes de cascavel nascidos e o número de filhotes estimado através do ultrassom.....	43
Figura 28	Níveis de progesterona sérica (ng/ml) durante a vitelogênese primária (V1), vitelogênese secundária (V2), ovulação (OV), gestação estágio 1 (G1), gestação estágio 2 (G2) e pós parto (PP) em cascavéis.....	45
Figura 29	Folículos pré-vitelogênicos de cascavel.....	48
Figura 30	Folículo de cascavel em regressão (atrésico).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Medianas, erros-padrão e valores mínimos e máximos dos parâmetros avaliados no experimento.....	28
Tabela 2	Comparação entre a média do comprimento do testículo esquerdo (CTE) e direito (CTD) com seus respectivos desvio padrão.....	32
Tabela 3	Médias do comprimento (cm) do testículo esquerdo (CTE) e do testículo direito (CTD) nos diferentes meses de avaliação.....	32
Tabela 4	Valores médios da testosterona sérica (ng/dL) com seus respectivos erros-padrão dos valores médios referentes aos meses de avaliação.....	33
Tabela 5	Medianas, erros-padrão e valores mínimos e máximos dos parâmetros avaliados no experimento.....	34
Tabela 6	Mediana dos valores de progesterona sérica (ng/ml) durante a vitelogênese primária (V1), vitelogênese secundária (V2), ovulação (OV), gestação estágio 1 (G1), gestação estágio 2 (G2) e pós parto (PP) em cascavéis.....	45

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1. ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DE SERPENTES.....	9
2.2. BIOLOGIA REPRODUTIVA DA CASCAVEL.....	11
2.2.1. Ciclo reprodutivo machos.....	11
2.3.1. Ciclo reprodutivo fêmeas.....	12
2.3.2. Hormônios sexuais.....	12
2.3. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE SERPENTES.....	14
3 OBJETIVOS.....	16
3.1. OBJETIVO GERAL.....	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. LOCAL.....	19
4.2. ANIMAIS.....	19
4.3. PERÍODO DE AVALIAÇÃO.....	20
4.3. INSTALAÇÕES.....	20
4.5. ALIMENTAÇÃO.....	22
4.6. CONTENÇÃO FÍSICA PESAGEM E MENSURAÇÃO DO COMPRIMENTO TOTAL DAS SERPENTES.....	22
4.7. COLETA DE SANGUE E DOSAGEM HORMONAL.....	23
4.8. EXAME ULTRASSONOGRÁFICO.....	24
4.8.1. Fêmeas.....	25
4.8.2. Machos.....	25
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1. MACHOS.....	28
5.1.1. Resultados Gerais.....	28
5.1.2. Avaliação Ultrassonográfica.....	28

5.1.3. Dosagem Sérica de Testosterona.....	32
5.1.4. Comprimento Total das Serpentes.....	34
5.2. FÊMEAS.....	34
5.2.1. Resultados Gerais.....	34
5.2.2. Gestantes.....	35
5.2.3. Não Gestantes.....	46
6 CONCLUSÕES.....	49
6.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
7 REFERÊNCIAS.....	53
8 TRABALHO CIENTÍFICO.....	64
Anexos.....	86

RESUMO

MATAYOSHI, P.M. Caracterização ultrassonográfica, morfofisiológica do sistema reprodutor de machos e fêmeas de *Crotalus durissus terrificus*. Botucatu, 2011, 93p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Objetivou-se caracterizar o ciclo reprodutivo sazonal de 28 cascavéis adultas *Crotalus durissus terrificus* (14 machos e 14 fêmeas), recém chegadas da natureza, provenientes da região de Botucatu - SP. Para tanto, foram realizadas avaliações ultrassonográficas do sistema reprodutor e dosagens séricas de progesterona e testosterona. As coletas e os exames foram realizados em diferentes meses do ano (abril, julho, outubro e janeiro), representando as quatro estações climáticas. As fêmeas que apresentaram crescimento folicular também foram avaliadas nos meses de setembro e dezembro de 2010, e abril de 2011 para melhor acompanhamento da dinâmica folicular e evolução gestacional. Foi possível identificar e caracterizar ultrassonograficamente estruturas reprodutivas como testículos, folículos pré-vitelogênicos e vitelogênicos, embriões e ovos atrésicos. Os testículos apresentaram maior comprimento em janeiro. Os maiores níveis séricos de testosterona foram observados em janeiro e abril, pico da espermatogênese e fase de cópula, respectivamente. Os folículos vitelogênicos em crescimento foram visibilizados nas avaliações de abril e julho. As ovulações e as gestações iniciaram em setembro e outubro, onde foi observado um aumento nos níveis séricos de progesterona que se mantiveram altos durante toda a gestação, decaindo após o parto. As gestações duraram aproximadamente quatro meses e os nascimentos ocorreram entre dezembro e janeiro. As fêmeas em período não reprodutivo apresentaram folículos pré-vitelogênicos e níveis baixos de progesterona em todas as avaliações.

Palavras-chave: Cascavel, Ciclo Reprodutivo, Progesterona, Testosterona, Ultrassonografia.

ABSTRACT

MATAYOSHI, P.M. Ultrasonographic, morphophysiological characterization of the reproductive system of male and female *Crotalus durissus terrificus*. Botucatu, 2011, 93p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP.

This study aimed to characterize the seasonal reproductive cycle of 28 adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes (14 males and 14 females) newly arrived from the wild in the region of Botucatu, SP. For this purpose, we performed sonographic evaluations of their reproductive system and measurement of progesterone and testosterone from serum samples. Blood collections and examinations were conducted in different months of the year (April, July, October and January), which represented the four seasons. Females that had follicular growth were also evaluated in September and December of 2010 and April 2011 for better monitoring of the follicular dynamics and pregnancy evolution. It was possible to identify and characterize by ultrasound reproductive structures like testes, previtellogenic and vitellogenic follicles, atretic eggs and embryos. The testes showed greater length in January. The higher serum levels of testosterone were observed in January and April, which represented the peak phase of spermatogenesis and mating, respectively. Vitellogenic growing follicles were seen in evaluations in April and July. Ovulations and pregnancies started in September and October, when serum progesterone levels increased, and then remained high throughout pregnancy, decreasing after birth. The pregnancies lasted about four months and births occurred between December and January. Females in non-reproductive period had previtellogenic follicles and low levels of progesterone in all evaluations.

Keywords: Rattlesnake, Reproductive Cycle, Progesterone, Testosterone, Ultrasound.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os répteis estão inclusos no Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Classe Reptilia, que subdivide-se na Ordem Chelonia (tartarugas), Ordem Crocodylia (crocodilos e jacarés) e Ordem Squamata (anfisbenas, lagartos e serpentes) (POUGH et al., 1999). As serpentes pertencem à subordem Serpentes, a qual é atualmente composta por 3.315 espécies (UETZ, 2011), divididas em 465 gêneros e 20 famílias (FRANCO, 2003), que são distribuídas por todo o globo terrestre, exceto nas calotas polares e regiões de grande altitude (GREENE, 1997). O Brasil possui uma ofidiofauna rica, com 371 espécies divididas em 76 gêneros e 10 famílias (BÉRNILS, 2010). Apesar dos esforços de tradicionais instituições e especialistas no assunto, muitas espécies dessa fauna são ainda pouco estudadas (MELGAREJO, 2003).

As cascavéis pertencem a Subordem Serpentes, Família Viperidae, Subfamília Crotalinae, Gênero *Crotalus*. Além desse gênero, com 30 espécies, existem mais 15 gêneros e 118 espécies, todas peçonhentas. Dentre as espécies desse gênero, apenas a *Crotalus durissus* ocorre na maior parte da América do Sul. Todas as demais espécies são encontradas no extremo norte da América do Sul, América Central e Estados Unidos. No Brasil, há cinco espécies das quais três são mais conhecidas: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collineatus*. A *Crotalus durissus terrificus* habita os campos, áreas de Mata Atlântica, matas da região sul, sudeste e centro oeste (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

A cascavel e as outras serpentes têm grande importância nos campos médico, farmacológico e toxicológico (ZACARIOTTI, 2004). Entre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de acidentes ofídicos por ano. Somente no ano de 2005 foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 97.244 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais as serpentes contribuíram com 28.702 casos (29,52%) (LE MOS et al., 2009).

Em 2008 no Brasil foram notificados 26.905 acidentes, sendo o grupo *Bothrops* responsável por 73,5% das notificações, seguido do gênero *Crotalus* (7,5%), *Lachesis* (3%) e *Micrurus* (0,7%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Com o crescimento desordenado das cidades e fragmentação das áreas naturais, ocorre o aumento da densidade populacional desses animais em áreas urbanas, resultando no aumento de acidentes (ARAÚJO et al., 2003; BASTOS et al., 2005). Nesse sentido, a criação de serpentes peçonhentas em cativeiro com a finalidade de produção de soro antiofídico é de grande importância para a saúde pública (SILVA et al., 2010). As peçonhas ofídicas também têm sido utilizadas para a elucidação de processos biológicos complexos, na elaboração de novas ferramentas de uso terapêutico, produção de novos fármacos e imunobiológicos (JUAN et al., 1995; WEN, 2003).

Além disso, as serpentes desempenham um papel fundamental no equilíbrio e na manutenção da biodiversidade. Estudos de aspectos reprodutivos em serpentes são fundamentais, especialmente com o intuito de otimizar a reprodução destes animais em cativeiro, seja para sua conservação ou com o propósito de pesquisas farmacológicas a partir de seu veneno (ZACARIOTTI, 2004). Frequentemente, as populações de espécies em cativeiro não são auto-sustentáveis devido ao seu baixo índice de sucesso reprodutivo (HILDEBRANDT et al, 2000). Diante disso, técnicas alternativas como a ultrassonografia podem ser utilizadas como ferramenta no estudo das condições reprodutivas (HILDEBRANDT; GÖRITZ, 1998), determinando a melhor época para a realização de reprodução assistida.

A ultrassonografia na medicina veterinária tem se mostrado um excelente método diagnóstico não invasivo (AUGUSTO, 2001). Suas aplicações incluem monitoramento da função reprodutiva, diagnóstico de afecções por meio da análise das alterações anatômicas e topográficas dos órgãos, e auxílio a outras técnicas diagnósticas, como a biópsia guiada por ultrassom (SAINSBURY; GILLI, 1991).

Em animais silvestres essa técnica oferece novas oportunidades relacionadas com o manejo dos animais em cativeiro (zoológicos e criadouros), principalmente na área reprodutiva, pois, em conjunto com outras técnicas de diagnóstico, pode promover um avanço nos programas de reprodução de espécies ameaçadas. A avaliação ultrassonográfica ginecológica, bem como andrológica, é essencial na medicina destes animais, visto que, frequentemente apresentam irregularidade na atividade reprodutiva (AUGUSTO, 2007).

O sucesso da aplicação do exame ultrassonográfico depende da habilidade e experiência do operador, incluindo o conhecimento da anatomia normal das espécies examinadas (SCHUMACHER; TOAL, 2001). O ultrassonografista deve estar familiarizado com a topografia e morfologia dos órgãos em estudo para reconhecer e diferenciar variações fisiológicas de alterações causadas por doenças (AUGUSTO, 2007). Existem poucos estudos sobre a aparência ultrassonográfica dos diferentes órgãos de um grande número de espécies de animais silvestres, sendo raros aqueles realizados em serpentes. Estes répteis possuem o corpo alongado e apresentam todos seus órgãos internos delgados e também alongados, o que os difere dos outros animais na sua forma e apresentação (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

Isaza et al. (1993) avaliaram ultrassonograficamente as estruturas da cavidade celomática de *Boa constrictor*, porém não foram identificados os intestinos, baço, adrenais e órgãos do sistema reprodutor.

Através do ultrassom, Chiaraviglio et al. (1998) avaliaram os folículos ovarianos, ovidutos, testículos e ductos deferentes de *Boa constrictor occidentalis* e compararam as medições ultrassonográficas desses órgãos após a dissecação desses animais. A diferença entre as medições foram insignificantes, demonstrando que a ultrassonografia é uma técnica útil na estimativa do estado reprodutivo desses animais, com a vantagem de evitar o sacrifício dos mesmos.

Descrições sobre a aparência ultrassonográfica do fígado, aparelho renal e reprodutivo de jibóias (*Boa constrictor*) foram feitas por Neto et al. (2009). Estes concluíram que a ultrassonografia é uma técnica capaz de identificar a morfologia e sintopia de fígado e rins. No entanto, a influência da maturidade sexual determinou uma pobre visibilização das estruturas reprodutivas nos machos, enquanto o acesso aos órgãos reprodutivos das fêmeas foi dependente do seu estado reprodutivo.

Betkowski (2006) estudou os níveis de progesterona e estradiol séricos e avaliou ultrassonograficamente os ovários e ovidutos de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*), com o intuito de caracterizar as fases do ciclo ovariano.

De acordo com Hildebrandt e Gritz (1998), as alterações do trato genital devido à influência dos hormônios liberados durante as diferentes fases do

ciclo reprodutivo podem ser avaliadas ultrassonograficamente, fornecendo informações sobre os mecanismos fisiológicos da reprodução. Análises endócrinas podem fornecer dados complementares valiosos para os achados ultrassonográficos e vice e versa.

Assim, este trabalho teve por objetivo estudar o ciclo reprodutivo de machos e fêmeas da espécie *Crotalus durissus terrificus*, correlacionando as alterações séricas dos hormônios sexuais com a aparência ultrassonográfica das estruturas reprodutivas, fornecendo mais uma ferramenta no estudo da biologia reprodutiva em serpentes.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ANATOMIA DO APARELHO REPRODUTOR DE SERPENTES

Os órgãos reprodutivos em serpentes dispõem-se assimetricamente, sendo os do lado direito mais craniais em relação aos do lado esquerdo (FUNK, 2006). O aparelho reprodutor feminino apresenta dois ovários e dois ovidutos que se abrem na cloaca e se unem parcialmente nas adjacências da vagina bilobada (ALMEIDA SANTOS; ORSI, 2002; ALMEIDA SANTOS, 2005).

Em fêmeas maduras, os ovários apresentam folículos transparentes ou esbranquiçados, sem deposição de vitelo (vitelogênese primária) e/ou amarelos com deposição de vitelo (vitelogênese secundária). Nas fêmeas imaturas apenas folículos em vitelogênese primária são encontrados. Os ovidutos localizam-se paralelos aos ovários e são divididos em infundíbulo, útero (anterior e posterior) e vagina (ALMEIDA SANTOS; SALOMÃO, 1997, 2002).

O infundíbulo, porção mais cranial do oviduto, é uma estrutura fina em forma de funil com várias dobras e recebe os folículos durante a ovulação. O útero anterior é responsável pelo desenvolvimento embrionário e possui diversas câmaras onde permanece cada embrião. O útero posterior é uma região longa e sem pregas, responsável pela estocagem dos espermatozoides após a cópula (ALMEIDA SANTOS, 2005).

Assim como nas fêmeas, o posicionamento do aparelho reprodutor dos machos é assimétrico, sendo o testículo direito cranial em relação ao esquerdo (ALMEIDA SANTOS, 2005). Em serpentes, os testículos são intra-abdominais, situados entre a tríade pancreática (vesícula biliar, baço e pâncreas) e os rins (KOLESNIKOVAS; GREGO; ALBUQUERQUE, 2007) (Figura 1). Os machos de *Crotalus durissus* apresentam dois testículos alongados, que se comunicam com a cloaca através dos ductos deferentes (ALMEIDA SANTOS, 2005). Estes ductos podem ser enovelados em espécies sexualmente maduras ou lisos em imaturas, e que terminam nas papilas genitais (VOLSØE, 1944) próximo à base do pênis, onde localiza-se um sulco espermático (VASSE, 1994). Alguns autores descreveram a presença de epidídimo em serpentes (LANGLADA;

SANTOS; FERREIRA, 1994; SAINT-GIRONS, 1994), porém, segundo DeNardo (2006), esta estrutura não foi observada.

A porção mais distal dos ductos deferentes é denominada ampola e tem função relacionada com o armazenamento de espermatozóide nos machos (SEVER, 2004). Na cloaca, a papila genital é o fim de uma via comum aos tratores genital (ductos deferentes) e urinário (rins) (OLIVEIRA et al., 2004 *apud* ZACARIOTTI, 2008). Os órgãos copulatórios nos machos (um par) são denominados de hemipênis e ficam localizados no interior da cauda quando o macho não está em cópula (DENARDO, 2006).

Apesar da ausência de órgãos sexuais acessórios, os machos das serpentes apresentam uma região dos rins chamada de segmento sexual, que tem o papel de excretar substâncias como glicogênio, mucopolissacarídeos, mucoproteínas, lipídeos e fosfatase ácida, que são essenciais na ativação e sobrevivência dos espermatozoides durante a cópula (KUHNEL; KRISCH, 1974; SAINT-GIRONS, 1994).

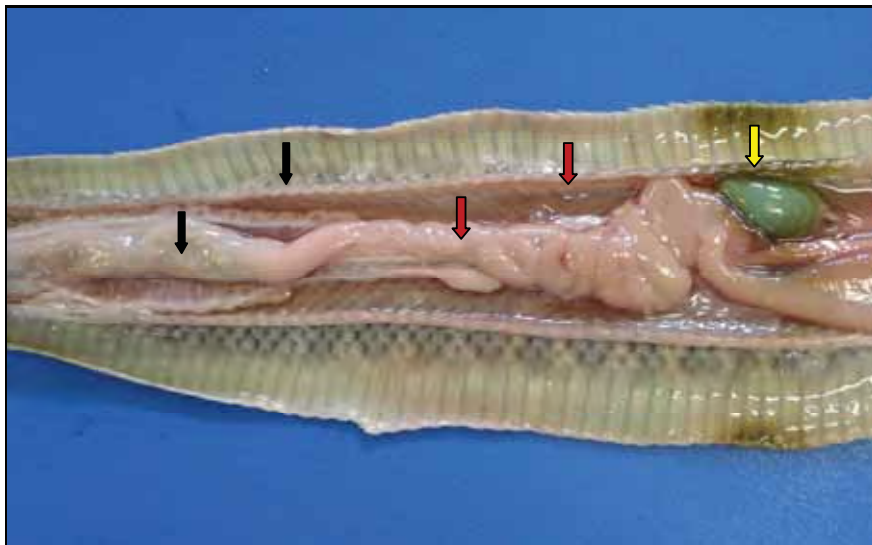


FIGURA 1: Testículos (setas vermelhas) localizados entre a vesícula biliar (seta amarela) e rins (setas pretas) de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

2.2. BIOLOGIA REPRODUTIVA

2.2.1. Ciclo reprodutivo machos

Existe a hipótese de que os machos de cascavéis (*C.d.t.*) têm a capacidade de reproduzir continuamente por apresentarem espermatozóides nos ductos deferentes o ano todo (SALOMÃO et al., 1995; SALOMÃO; ALMEIDA SANTOS, 2002). Porém, de acordo com Zacariotti (2004), essa informação pode ser dúbia, visto que apenas a presença de espermatozóides não demonstra totalmente a capacidade reprodutiva do animal. Já as fêmeas podem apresentar ciclos bienais, trienais e até em menor frequência (LANGLADA, 1972).

Os ciclos reprodutivos sazonais dos machos de serpentes podem ser classificados como pré-nupcial (ou associado), em que a produção de gametas coincide ou precede a época de acasalamento, e pós-nupcial (ou dissociado), em que a produção de gametas é posterior à época de cópula e os machos têm, necessariamente, que estocar esperma nos ductos deferentes até a época de cópula (SAINT-GIRONS, 1982; SHUETT, 1992; ALMEIDA SANTOS, 2005).

Os machos de cascavéis possuem um ciclo reprodutivo sazonal pós-nupcial, com variação do tamanho testicular ao longo do ano. A estação reprodutiva inicia com a espermatogênese e estocagem do esperma nos ductos deferentes na primavera, período em que o comprimento testicular é maior. O pico de espermiogênese ocorre no verão, onde é observado início da diminuição do comprimento testicular, decaindo significativamente no inverno. Os acasalamentos ocorrem no final do verão e início do outono, quando o tamanho testicular é menor, entretanto, os ductos deferentes apresentam diâmetros relativamente grandes nesse período (ALMEIDA SANTOS, 2005).

Portanto, o aumento das dimensões e massa dos testículos reflete a espermatogênese (VOLSØE, 1944) e o aumento no diâmetro dos ductos deferentes reflete a estocagem de esperma (ALMEIDA SANTOS, 2005).

2.2.2. Ciclo reprodutivo fêmeas

A cascavel (*C.d.t.*) tem um ciclo reprodutivo sazonal, apresentando uma fase ativa de crescimento folicular, acasalamento e gestação em um ano e uma fase de parturição seguida de quiescência folicular em outro ano, caracterizando um ciclo bienal (ALMEIDA SANTOS; ORSI, 2002).

A transformação dos oócitos em folículos recebe o nome de vitelogênese, a qual pode ser classificada em primária e secundária. A vitelogênese primária geralmente é muito lenta e produz os folículos quiescentes a partir dos oócitos (ALDRIDGE, 1979).

Durante a vitelogênese secundária há um rápido depósito de vitelo sobre os folículos quiescentes, os quais sofrem grande aumento de seu volume. É esse vitelo que irá garantir o desenvolvimento do embrião até a formação e o nascimento do filhote (PIZZATO, ALMEIDA SANTOS, MARQUES, 2006).

A cópula ocorre durante o outono, sendo que os espermatozóides são estocados durante todo o inverno até a primavera na porção posterior do útero, por meio de contorção do mesmo. O desenvolvimento embrionário se dá no útero em câmaras separadas através de uma constrição, a qual funciona como uma implantação. A gestação é em torno de 4 a 5 meses e os filhotes nascem no verão (ALMEIDA SANTOS; ORSI, 2002). O modo de reprodução da cascavel é conhecido como vivíparo, ou seja, desenvolvimento fetal completo no ambiente uterino, permitindo que após o parto, o neonato seja capaz de movimentar e alimentar de forma independente (SHINE, 1985 *apud* ZACARIOTTI, 2008).

2.2.3. Hormônios sexuais

A atividade reprodutiva em répteis é controlada pelo sistema neuroendócrino, assim como em outros vertebrados. O GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) é produzido pelo hipotálamo em resposta aos estímulos ambientais, tais como fotoperíodo e temperatura. Ele é responsável pela liberação das gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante), produzidos pela glândula pituitária. Todos os répteis

estudados parecem possuir estes dois hormônios, com exceção das serpentes e dos lagartos que possuem uma única gonadotrofina, o “FSH-like”. As gonadotrofinas pituitárias estimulam a espermatogênese e desenvolvimento do oócito em várias espécies de répteis (ISHII, 1991).

As relações entre níveis de testosterona, espermatogênese e comportamento reprodutivo não são claras nas serpentes e foram pouco estudadas em espécies brasileiras (PIZZATO, ALMEIDA SANTOS, MARQUES, 2006).

Na cascavel, basófilos precursores de gonadotrofina são encontrados na hipófise anterior durante o ciclo espermatogênico, sugerindo que os níveis de testosterona aumentem nessa época (SALOMÃO; ALMEIDA SANTOS, 2002).

No estudo realizado por Zacariotti (2008), os maiores níveis de testosterona foram observados no verão e outono, pico de atividade de espermatogênese e acasalamento, respectivamente. No inverno, fase de inatividade e até regressão testicular, foram verificados os menores níveis.

O ciclo reprodutivo das cascavéis fêmeas está sob influência dos hormônios estrógeno e progesterona. Nas serpentes em vitelogênese primária, os níveis de estrógeno e progesterona apresentam-se baixos. Na vitelogênese secundária, os níveis de estrógeno são altos quando comparados a outros estágios e os níveis de progesterona também aumentam em relação à fase anterior (ALMEIDA SANTOS, 2005). De acordo com Bonnet et al. (1994, 2001), o estradiol é secretado pelos ovários durante a vitelogênese, é responsável pelo preparo do oviduto para a gestação e tem sido descrito como um promotor de mobilização de reservas maternas na vitelogênese.

Durante a ovulação, há uma queda nos níveis de estrógeno e um aumento de progesterona, a qual se mantém alta até o final da gestação (ALMEIDA SANTOS, 2005). O hormônio progesterona é secretado primariamente pelo corpo lúteo, está relacionada a manutenção da gestação (GIRLING, 2002) e tem sido descrito como antagonista do estradiol, inibindo a vitelogênese via “feedback” negativo (BONNET et al., 2001).

2.3. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE SERPENTES

A biologia reprodutiva das serpentes é o foco de inúmeros estudos que visam otimizar a reprodução em cativeiro, seja para conservação, pesquisas farmacológicas ou produção de soro antiofídico a partir do seu veneno. No entanto, a eutanásia é um procedimento comum empregado na realização desses estudos (ZACARIOTTI, 2008).

A ultrassonografia é um excelente método diagnóstico não invasivo (AUGUSTO, 2001), que permite repetidas avaliações do mesmo indivíduo, sendo uma ferramenta importante no estudo dos ciclos reprodutivos desses animais, evitando a eutanásia (MARTÍNEZ-TORRES et al., 2006; ZACARIOTTI, 2008).

Em geral, são utilizados transdutores lineares e a frequência é escolhida de acordo com o tamanho do paciente. As frequências mais usadas em répteis, de acordo com Raiti (2004), são de 5,0 e 7,5MHz, as quais penetram tecidos a uma profundidade de 10 e 5 cm, respectivamente. Redrobe e Wilkinson (2002) recomendam a utilização de transdutores lineares de 7,5 a 10 MHz.

Freqüentemente, o exame em serpentes é realizado somente com contenção física, sem necessidade de sedação, com exceção de animais muito ativos ou agressivos (SILVERMAN, 2006). Alguns autores realizaram o exame ultrassonográfico em serpentes somente com a contenção física e obtiveram resultados satisfatórios (CHIARAVIGLIO et al., 1998; BETKOWSKI, 2006; GNUDI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010; MATAYOSHI et al., 2010a; MATAYOSHI et al., 2010b.).

Os animais podem ser posicionados em decúbito ventral ou esternal (JACOBSON, 1993). A janela acústica pode ser obtida através da parede lateral ou da superfície ventral da cavidade celomática (RAITI, 2004). Isaza et al. (1993) relataram que o acesso ultrassonográfico através da parede lateral da cavidade celomática resultou em uma pobre visibilização das estruturas internas devido aos artefatos de imagem causados pelas costelas.

O gel acústico pode ser aplicado 5 minutos antes do início do exame (RAITI, 2004) ou até 30 minutos (STETTER, 2006) para penetrar entre as escamas, diminuindo a interface de ar. A técnica de imersão em água também

pode ser utilizada. O animal fica parcialmente submerso em água morna com o transdutor posicionado sob a água a uma distância apropriada para a obtenção das imagens (SCHUMACHER; TOAL, 2001; REDROBE; WILKINSON, 2002). A vesícula biliar localizada em terço médio da cavidade celomática pode ser utilizada como ponto de referência anatômica para identificação das estruturas reprodutivas (ALMEIDA et al., 2010), as quais se localizam caudalmente a ela.

O exame ultrassonográfico em serpentes machos é muito importante para avaliar as condições reprodutivas. Fornece informações sobre o tamanho e desenvolvimento dos testículos, sendo estes, dificilmente observados ao exame ultrassonográfico quando inativos. Em atividade, o parênquima testicular é granular e de média ecogenicidade (AUGUSTO, 2007).

Os ovários são difíceis de serem visibilizados ultrassonograficamente em fêmeas fora do ciclo reprodutivo. No entanto, os ovários podem ocupar uma grande extensão da cavidade celomática nas fêmeas em fase reprodutiva. Os folículos aparecem como estruturas esféricas, sendo os pré vitelogênicos hipoecóicos e os folículos vitelogênicos hiperecóicos (REDROBE; WILKINSON, 2002).

A ultrassonografia ginecológica pode ser utilizada para a avaliação das condições reprodutivas, acompanhamento da foliculogênese, diagnóstico de gestação, previsão da data de parturição, identificação das condições pré-natais (JACOBSON, 1993; SCHUMACHER; TOAL, 2001), sexagem e identificação da viabilidade fetal em serpentes vivíparas (STETTER, 2006).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo monitorar o ciclo reprodutivo de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) machos e fêmeas, por meio da avaliação das alterações ultrassonográficas do sistema reprodutor e dosagem hormonal, verificando as possíveis correlações entre as variáveis estudadas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a avaliação reprodutiva de cascavéis machos por meio do exame ultrassonográfico do sistema reprodutor e dosagem de testosterona sérica.
- ✓ Realizar avaliação reprodutiva de cascavéis fêmeas por meio do exame ultrassonográfico do sistema reprodutor e dosagem de progesterona sérica.
- ✓ Definir um padrão anátomo-ultrassonográfico dos órgãos que compõem o sistema reprodutor desses animais nas diferentes fases do ciclo reprodutivo.
- ✓ Verificar a acurácia exame ultrassonográfico na avaliação dos órgãos reprodutores de cascavéis machos e fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho”, Campus de Botucatu/SP, sob protocolo nº 51/2010-CEUA, estando, portanto, de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

4.1. LOCAL

O experimento foi realizado no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP da UNESP, Campus Botucatu e no Laboratório de Dosagem Hormonal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ da UNESP, Campus Botucatu.

4.2. ANIMAIS

Para o presente trabalho foram utilizadas 28 serpentes adultas *Crotalus durissus terrificus* recém chegadas da natureza, sendo 14 machos e 14 fêmeas. Todos os animais foram vermifugados com Ivomec® (Ivermectina) na dose de 2mg/kg por via subcutânea com reaplicação 14 dias após a 1ª dose.

Os animais foram mantidos no serpentário do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP da UNESP / Campus Botucatu, registrado no IBAMA como Criadouro Científico da Fauna Silvestre - 1/35/92/0044-1, cujo número do processo é 02001.005670/90-77. A escolha desta espécie foi baseada no número e regularidade do aporte de indivíduos ao serpentário.

4.3. PERÍODOS DE AVALIAÇÃO

A avaliação ultrassonográfica e as coletas de sangue foram realizadas em diferentes meses do ano, devido ao ciclo reprodutivo sazonal desses animais. Os machos e as fêmeas em quiescência folicular foram avaliados nos meses de abril, julho, outubro de 2010 e janeiro de 2011. As fêmeas na fase folicular ativa foram avaliadas nos meses de abril, julho, setembro, outubro, dezembro de 2010 e em janeiro e abril de 2011 (Figura 2).

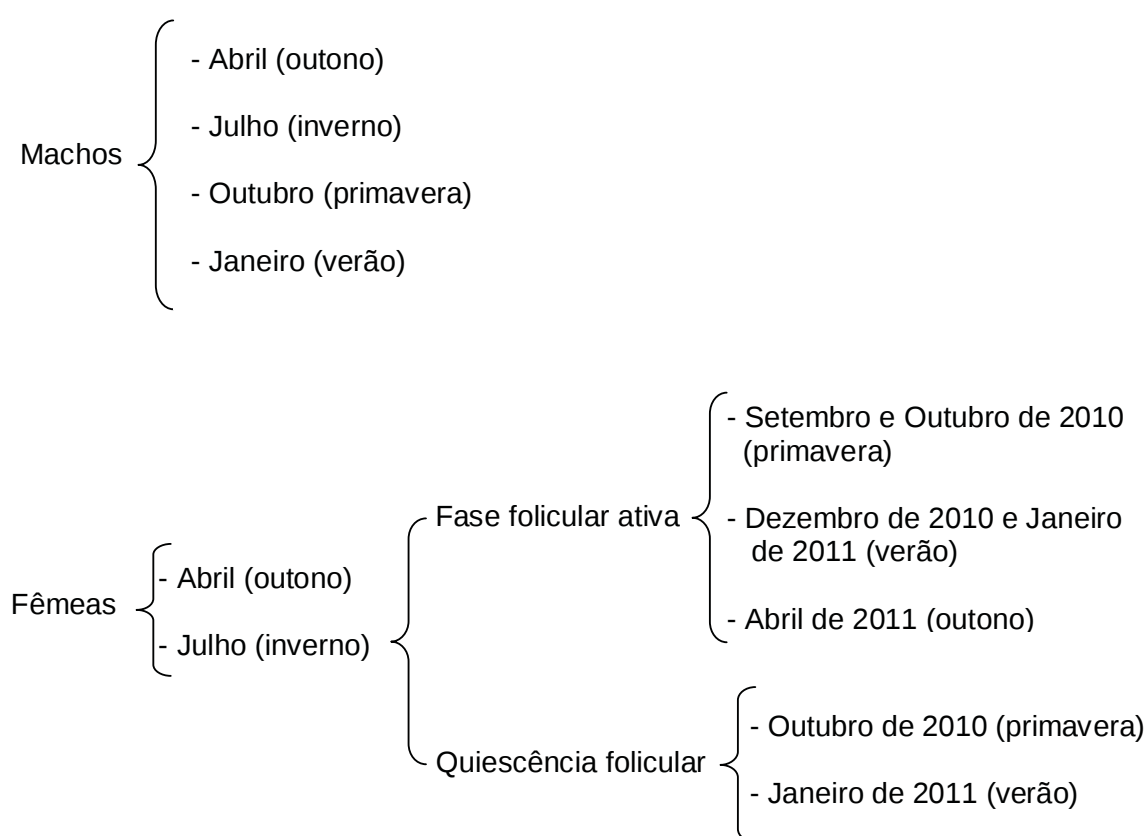


FIGURA 2: Períodos de avaliação ultrassonográfica e coleta de sangue.

4.4. INSTALAÇÕES

Os animais foram mantidos em ambiente interno, individualizados em caixas de polipropileno guarnecidas com água *ad libitum* (Figura 3 e 4). As

salas onde foram mantidos os animais são climatizadas, com temperatura entre 25°C e 27°C, umidade relativa em torno de 60 a 80% e fotoperíodo controlado em 09 horas de luz e 15 de escuridão.



FIGURA 3: Serpentes individualizadas em caixas plásticas de polipropileno (Foto: Vivian Scalon – CEVAP, 2011).



FIGURA 4: Caixas de polipropileno guarnecidas com potes plásticos de água (Foto: Vivian Scalon – CEVAP, 2011).

4.5. ALIMENTAÇÃO

A alimentação foi oferecida mensalmente e constituída de 1 a 2 exemplares de camundongo (*Mus musculus*), fornecidos vivos ou abatidos previamente, de tamanho compatível com o porte da serpente.

4.6. CONTENÇÃO FÍSICA, PESAGEM E MENSURAÇÃO DO COMPRIMENTO TOTAL DAS SERPENTES

Os animais foram contidos fisicamente com auxílio de gancho e introduzidos em um tubo plástico para a realização das coletas de sangue e do exame ultrassonográfico (Figura 5). Os tubos transparentes tinham diâmetro compatível com a largura do corpo da serpente, impedindo que o animal pudesse ferir-se ou ainda alcançar o operador. Foi realizada a pesagem e a mensuração do comprimento total do corpo dos animais, sendo os dados registrados em fichas.



FIGURA 5: CONTENÇÃO física com tubo plástico transparente.

4.7. COLETA DE SANGUE E DOSAGEM HORMONAL

As coletas de sangue foram efetuadas através da punção da veia coccigeana (Figura 6), com agulhas 20 x 0,55 mm e seringas de 3 ml descartáveis e estéreis, sem adição de anticoagulante. Foram coletados 2 ml de sangue de cada animal, sempre no período da manhã. As amostras sanguíneas foram centrifugadas para a obtenção do soro, sendo este armazenado em microtubos plásticos do tipo Ependorf® e mantidos em *freezer* a -20° para posterior mensuração hormonal por meio da técnica de Radioimunoensaio (RIE). Para a dosagem de progesterona sérica foi utilizado o conjunto diagnóstico comercial de fase sólida SIEMENS® (COAT-A-COUNT, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA - EUA), validado por Betkowski (2006). Para a dosagem de testosterona sérica foi utilizada a técnica de Radioimunoensaio (RIE) em fase sólida por meio de conjunto diagnóstico comercial SIEMENS® (COAT-A-COUNT, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA - EUA); previamente validado para uso em serpentes por Grego (2006).



FIGURA 6: Coleta de sangue através da punção da veia coccigeana (Foto: Vinícius Gasparotto – CEVAP, 2011).

4.8. EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

As avaliações ultrassonográficas foram efetuadas em abril, julho e outubro de 2010 e janeiro de 2011. Foram realizados exames adicionais nas fêmeas gestantes em setembro e dezembro de 2010 e abril de 2011. Cada animal foi colocado em decúbito dorsal após a sua contenção, para a realização do exame ultrassonográfico. Para executar o exame, foi utilizado um equipamento modo-B (Mindray® DP-3300Vet) com transdutor linear multifrequencial de 6 a 10MHz. O transdutor com a frequência adequada foi escolhido de acordo com o tamanho da serpente e acoplado à superfície ventral do animal com o auxílio do gel acústico. As imagens foram obtidas nos planos longitudinais e transversais (Figura 7 e 8) para avaliação da localização, topografia, número, forma, contorno, tamanho, ecogenicidade e ecotextura dos testículos, folículos e embriões em desenvolvimento. Para documentação do trabalho, as imagens foram gravadas no aparelho de ultrassom e posteriormente armazenadas em disco compacto.



FIGURA 7: Cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) em decúbito dorsal com transdutor acoplado à superfície ventral em corte longitudinal.



FIGURA 8: Cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) em decúbito dorsal com transdutor acoplado à superfície ventral em corte transversal.

4.8.1. Fêmeas

A vesícula biliar encontra-se no terço caudal do corpo da serpente e foi utilizada como referência para a identificação dos ovários e folículos, os quais localizam-se imediatamente caudais, sendo o ovário esquerdo mais caudal em relação ao direito (DENARDO, 2006). Foram registradas informações sobre a aparência ultrassonográfica e o diâmetro do folículo, sendo os menores que 1cm considerados pré-vitelogênicos (vitelogênese primária) e os maiores que 1cm como vitelogênicos (vitelogênese secundária), conforme o estudo de Almeida Santos e Orsi (2002). Foi realizado o monitoramento gestacional das fêmeas prenhes até o momento do parto através das avaliações ultrassonográficas realizadas em setembro, outubro, dezembro e janeiro, como descrito anteriormente.

4.8.2. Machos

Nos machos, foram registradas informações sobre o comprimento e aparência ultrassonográfica dos testículos durante as fases reprodutivas.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa Sigma Stat® versão 3.5. para Windows. Para os machos, foi realizada análise de variância para medidas repetidas (One Way Repeated Measures ANOVA) e para comparação das médias foi realizado o Teste de Tukey ($P < 0,05$). Foram realizadas também análises de Correlações de Pearson entre comprimento do animal e testosterona, comprimento do animal e comprimento dos testículos esquerdo e direito.

Para as fêmeas, foram efetuadas análises de Correlações de Pearson entre comprimento do animal e número de filhotes nascidos e análises estatísticas descritivas do nível de progesterona e os meses de avaliação.

Foi realizado também o Teste de Kruskal-Wallis para verificar a diferença dos níveis de progesterona durante o ciclo reprodutivo e, posteriormente, o teste de Dunn's para comparação das medianas.

Para avaliar a associação entre a contagem dos fetos através do ultrassom e o número de filhotes nascidos foi utilizada a análise da correlação linear simples.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MACHOS

5.1.1. Resultados Gerais

Na tabela abaixo estão descritos os resultados referentes aos parâmetros avaliados nos machos deste experimento.

TABELA 1: Medianas, erros-padrão e valores mínimos e máximos dos parâmetros avaliados nas cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) do experimento:

	MEDIANA $\pm$ EP	MÍNIMO-MÁXIMO
Testosterona Sérica (ng/dL)	35,15 $\pm$ 5,14	2,94 – 151,56
Comprimento testículo esquerdo (cm)	2,23 $\pm$ 0,429	1,52 – 3,54
Comprimento testículo direito (cm)	2,32 $\pm$ 0,428	1,40 - 3,44
Comprimento do animal (cm)	105 $\pm$ 3,69	89 - 131

5.1.2. Avaliação Ultrassonográfica

Ultrassonograficamente, foram visibilizados dois testículos posicionados em região ventrolateral aos grandes vasos, identificados no exame bidimensional e no Doppler colorido (Figura 9). Os testículos estão dispostos assimetricamente, sendo o direito mais cranial em relação ao esquerdo e localizados em terço médio a final da cavidade celomática, em região cranial aos rins, conforme observado por Chiaraviglio et al. (1998), Redrobe e Wilkinson (2002), Neto et al. (2009) e confirmado em nosso estudo. Não foi possível visibilizar os ductos deferentes nos animais avaliados. De acordo com Redrobe e Wilkinson (2002), os ductos deferentes são caracterizados como linhas paralelas hiperecóticas que se originam dos testículos e são observados em serpentes de tamanho maior.

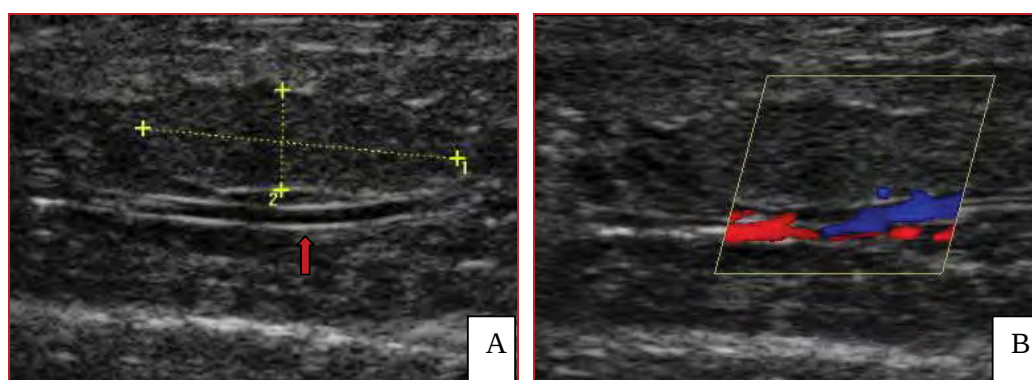


FIGURA 9: (A) Testículo de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) identificado entre os calipers no modo-B e grandes vasos visibilizados como estrutura tubular com conteúdo anecóico (seta). (B) Grandes vasos de cascavel identificados com o Doppler colorido.

No presente trabalho, foi possível visibilizar ambos os testículos em 43 dos 56 exames ultrassonográficos realizados nos machos de cascavéis. O testículo direito não foi visibilizado em 10 exames (18%) e o esquerdo em três (5%). A ultrassonografia foi eficaz na identificação dos testículos de cascavéis em aproximadamente 77% dos exames realizados.

Alguns fatores podem ter prejudicado a visibilização dos testículos, tais como: acúmulo de ar entre as escamas durante a ecdise e presença de conteúdo gasoso e fecal em alças intestinais, produzindo artefatos de reverberação (Figura 10). As serpentes avaliadas em até duas semanas após a alimentação apresentaram menor quantidade de conteúdo em alças intestinais e conseqüentemente, permitiram melhor visibilização dos testículos em relação às serpentes avaliadas um mês após a alimentação. No estudo realizado por Betkowski (2006) com ultrassonografia em cascavéis, a contenção física foi feita, pelo menos, três semanas após a alimentação para evitar regurgitações decorrentes do estresse da captura.

Em alguns animais, o tecido gorduroso presente na cavidade celomática também dificultou a localização dos testículos devido à semelhança de ecogenicidade. Corroborando com este achado, Neto et al. (2009) relataram a dificuldade na identificação ultrassonográfica de estruturas da cavidade celomática de jibóias adjacentes à esse tecido gorduroso, cujo tamanho era dependente do estado reprodutivo ou nutricional do animal. Isaza et al (1993) e Raiti (2000) também relataram que a gordura em cavidade celomática e o

conteúdo gasoso das alças intestinais resultaram em imagens ultrassonográficas testiculares de baixa qualidade.

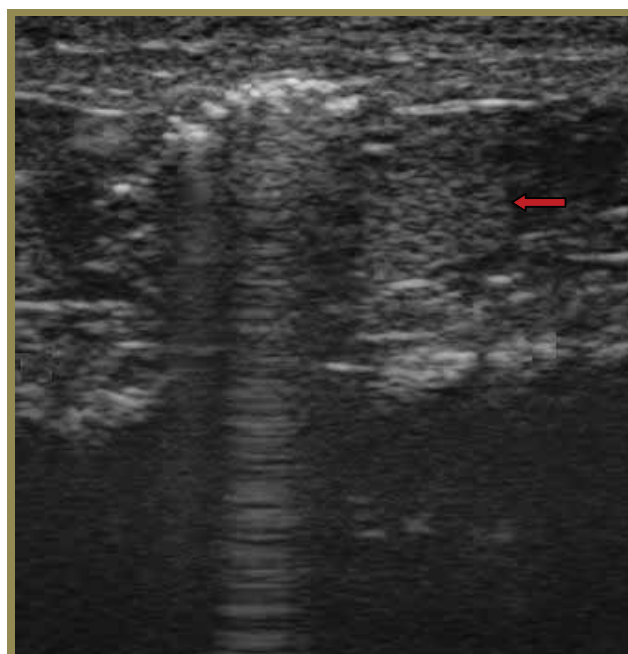


FIGURA 10: Visibilização parcial do testículo (seta) de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) devido à presença de conteúdo gasoso em alça intestinal produzindo o artefato de reverberação.

Os testículos foram caracterizados ultrassonograficamente como estrutura de formato alongado ou fusiforme, de contornos regulares e definidos, ecotextura homogênea, hipoecóicos em relação às estruturas adjacentes, envolvidos por uma cápsula hiperecólica (Figura 11). Os achados são semelhantes aos descritos por Chiaraviglio et al. (1998), Redrobe e Wilkinson (2002), Raiti (2004), Stahl (2007) e Neto et al. (2009). Essas características ultrassonográficas se mantiveram semelhantes durante os diferentes meses de avaliação. Segundo Augusto (2007), os testículos de répteis são dificilmente observados, mas quando em atividade, apresentam parênquima de média ecogenicidade.

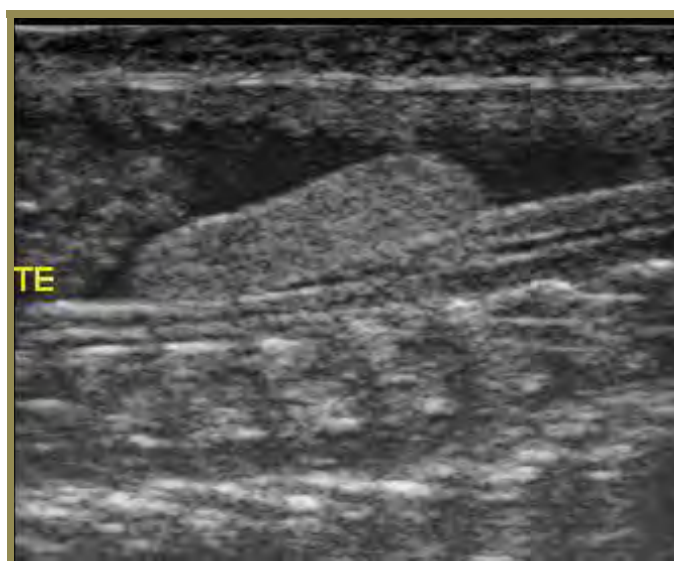


FIGURA 11: Testículo esquerdo (TE) de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

Os machos de cascavéis apresentam ciclo reprodutivo anual. A estação reprodutiva começa com o início da espermatogênese na primavera e a espermiogênese apresenta um pico no verão. A atividade testicular é detectada pela alteração no comprimento do testículo durante as estações do ano (ALMEIDA SANTOS, 2005).

Salomão e Almeida Santos (2002) acompanharam a espermatogênese em cascavéis através da histologia testicular e observaram atividade espermatogênica entre setembro a março, com maior atividade em janeiro e regressão testicular no inverno.

Mello e Belluomini (1965) realizaram acompanhamento da atividade testicular de cascavéis adultos através do peso mensal médio dos testículos. Nos meses de maio a setembro (outono e inverno, respectivamente) foram observados os menores pesos, sendo que o aumento iniciou-se em outubro (primavera), atingindo o máximo em janeiro (verão).

Em nosso estudo, o comprimento testicular foi mensurado através do exame ultrassonográfico durante os meses correspondentes às estações climáticas: abril (outono), julho (inverno), outubro (primavera) e janeiro (verão).

Os valores obtidos durante os diferentes meses de avaliação variaram entre 1,40 a 3,54 cm. Foi realizada a comparação entre o comprimento dos testículos esquerdo e direito, porém não foi encontrada diferença significativa

(Tabela 2). Para comprimento do testículo esquerdo, bem como no comprimento do testículo direito, observou-se diferença estatística significativa ($P < 0,05$) na avaliação feita em janeiro em relação aos outros meses de avaliação, provavelmente devido à maior atividade espermatogênica nesse período, corroborando com os autores acima citados. No entanto, as medidas realizadas nos demais meses de avaliação não diferiram entre si (Tabela 3). O ultrassom pode não ter sido sensível o suficiente para detectar discretas alterações de tamanho nas avaliações de abril, julho e outubro.

TABELA 2: Comparação entre a média do comprimento (cm) do testículo esquerdo e direito de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) com seus respectivos desvios padrão:

	$\bar{x} \pm s^2$
Comprimento Testículo Esquerdo	2,287 $\pm$ 0,429
Comprimento Testículo Direito	2,329 $\pm$ 0,428

P = 0,602

TABELA 3: Médias do comprimento (cm) do testículo esquerdo (CTE) e do testículo direito (CTD) de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) nos diferentes meses de avaliação com seus respectivos desvios padrão:

MÊS	CTE	CTD
ABRIL	2,14 $\pm$ 0,26b	2,25 $\pm$ 0,32b
JULHO	2,19 $\pm$ 0,31b	2,09 $\pm$ 0,30b
OUTUBRO	2,06 $\pm$ 0,35b	2,15 $\pm$ 0,36b
JANEIRO	2,75 $\pm$ 0,42a	2,82 $\pm$ 0,30a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

5.1.3. Dosagem Sérica de Testosterona

As descrições de Salomão e Almeida Santos (2002) e Zacariotti (2004) para os níveis séricos de testosterona de cascavéis machos estão de acordo com os resultados encontrados no nosso trabalho. Os maiores níveis séricos de testosterona observados foram em janeiro (verão) e abril (outono), pico da

espermatogênese e fase de cópula, respectivamente. No inverno, fase de inatividade e até regressão testicular, foram verificados os menores níveis (Tabela 4 e Figura 12).

TABELA 4: Valores médios da testosterona sérica (ng/dL) de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) com seus respectivos erros-padrão dos valores médios referentes aos meses de avaliação:

MÊS	TESTOSTERONA
ABRIL	67,26±11,76a
JULHO	25,86±3,90b
OUTUBRO	39,62±7,93ab
JANEIRO	54,22±12,46ab

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$)

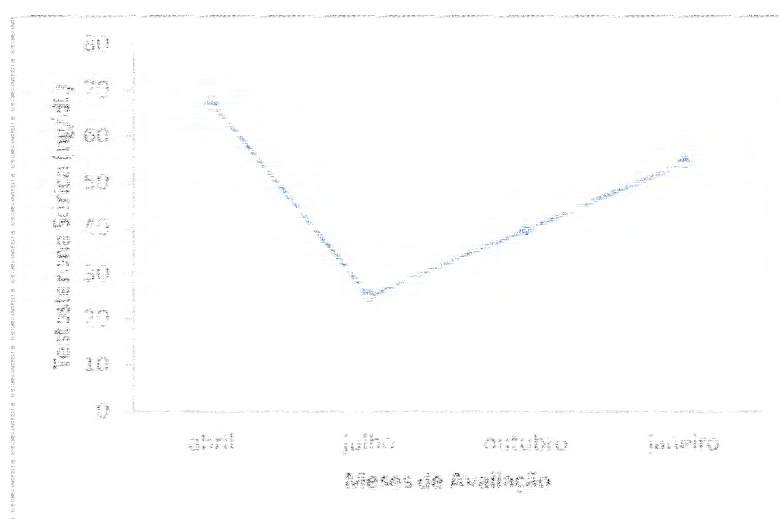


FIGURA 12: Perfil da concentração média de testosterona sérica de 14 machos de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) durante os diferentes meses de avaliação.

Zacariotti (2004) utilizou soro sanguíneo para dosagem hormonal de testosterona em *Crotalus durissus terrificus* recém-chegados da natureza e os valores obtidos foram mais baixos do que os nossos, que variaram de 52,60 ng/ml no verão a 8,89 ng/ml no inverno.

Mesmo entre os animais da mesma espécie encontramos relatos científicos com diferentes médias de concentrações de testosterona. Isto pode ocorrer devido às diferentes condições em que as amostras de sangue foram colhidas nos estudos, como a estação do ano, localização geográfica e o tempo decorrido da captura do animal até a colheita da amostra sanguínea, assim como quanto aos métodos de análises (GREGO, 2006).

5.1.4. Comprimento Total das Serpentes

Não foram encontradas correlações significantes entre os níveis séricos de testosterona e o comprimento total das serpentes ($r = -0,0007$ e $P = 0,996$) para todos meses de avaliação ($P > 0,05$).

Não houve correlação entre o comprimento total das serpentes e comprimento dos testículos, tanto esquerdo ($r = 0,218$ e $P = 0,107$) como direito ($r = 0,169$ e $P = 0,213$) ($P > 0,05$).

5.2. FÊMEAS

5.2.1. Resultados Gerais

Na tabela 5 estão descritos os resultados referentes aos parâmetros avaliados nas fêmeas de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) deste experimento.

TABELA 5: Medianas, erros-padrão e valores mínimos e máximos dos parâmetros avaliados no experimento:

	MÉDIA ± EP	MÍNIMO-MÁXIMO
Duração da gestação (dias)	123 ± 4,11	96 - 137
Nº de filhotes nascidos	5,5 ± 1,49	1 - 14
Progesterona sérica (ng/ml)	3,5 ± 1,19	0,28 – 59,11
Comprimento do animal (cm)	89,5 ± 3,32	61 - 99

5.2.2. Gestantes

Em nosso experimento, foi possível realizar o acompanhamento ultrassonográfico gestacional de 10 cascavéis até a parturição. Foi realizada a dosagem da progesterona sérica a cada avaliação ultrassonográfica (Anexo 1).

Na avaliação do mês de abril de 2010, período correspondente ao outono, foram observados folículos a partir de 10 mm de diâmetro, sendo estes considerados vitelogênicos ou em fase de vitelogênese secundária, segundo Bertona e Chiaraviglio (2003), Almeida Santos (2005), Betkowski (2006).

Ultrassonograficamente, estes apresentaram formato circular ou oval, com margens hiperecóticas e centro hipoecótico, ecotextura homogênea ou discretamente heterogênea, dispostos em cadeia, localizados em região média da cavidade celomática, caudais à vesícula biliar e entremeados ao tecido gorduroso (Figura 13). As fêmeas de 1 a 10 (gestantes) apresentaram imagens ultrassonográficas semelhantes neste mês de avaliação.

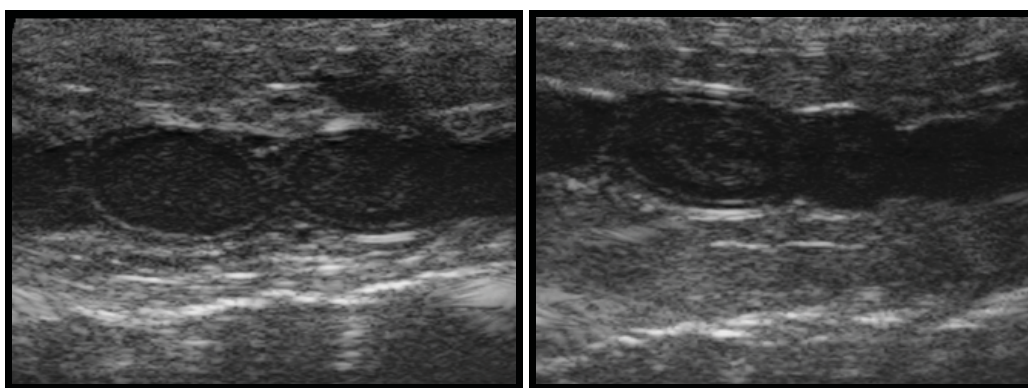


FIGURA 13: Sonograma com folículos vitelogênicos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) visibilizados no mês de abril de 2010.

A mediana dos valores da progesterona sérica das fêmeas gestantes obtida no mês de abril foi 1,705 ng/ml, valor semelhante ao que foi obtido no estudo realizado por Almeida Santos (2005), onde a mediana 1,7 ng/ml caracterizou a fase de vitelogênese secundária do ciclo reprodutivo de cascavéis. Neste mesmo trabalho, foi observado um aumento da progesterona em relação à fase de vitelogênese primária, que poderia estar relacionado ao

crescimento do epitélio ovidutal (GIRLING, 2002 *apud* ALMEIDA SANTOS, 2005).

Na avaliação do mês de julho, período correspondente ao inverno, foi observado aumento do diâmetro dos folículos vitelogênicos (Figura 12) em relação ao exame anterior. Estes apresentaram formato circular a oval, medindo 18 a 26 mm de diâmetro, dispostos em cadeia ou agrupados em “cachos”, ecotextura homogênea com presença de área hipoeecóica em seu centro. Foi visibilizada discreta quantidade de conteúdo líquido em redor dos folículos (Figuras 14 a 17). Bertona e Chiaraviglio (2003) descrevem os folículos vitelogênicos como massas hipereecóicas com duas zonas exteriores (isoecóica e hipoeecóica), que medem entre 10 a 28 mm de diâmetro.



FIGURA 14: Folículos vitelogênicos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) (Foto: Vinícius Gasparotto – CEVAP, 2011).

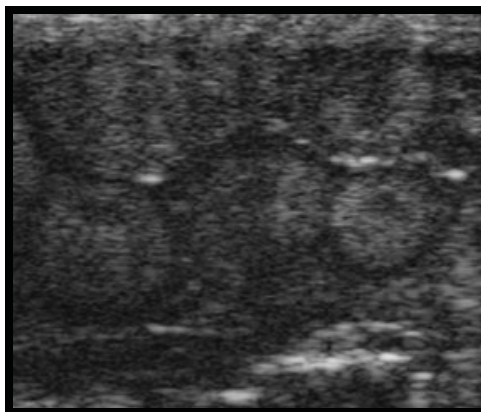


FIGURA 15: Sonograma com folículos vitelogênicos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) agrupados em “cachos”.

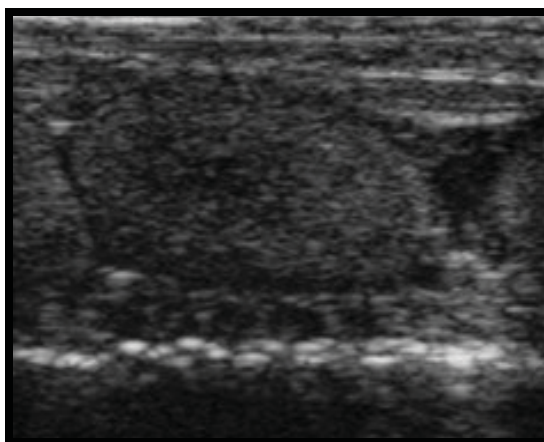


FIGURA 16: Presença de discreta quantidade de líquido ao redor dos folículos vitelogênicos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

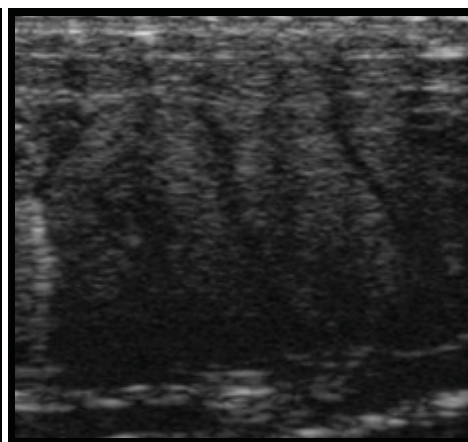


FIGURA 17: Folículos vitelogênicos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) dispostos em cadeia.

Todas as fêmeas encontravam-se em fase de vitelogênese secundária no mês de julho. A mediana dos valores da progesterona sérica obtida foi de 1,884 ng/ml, semelhante ao que foi observado no mês de abril.

Foram realizadas duas a três avaliações ultrassonográficas em cada animal no mês de setembro (primavera), dependendo da data em que foi oferecida a alimentação. Foi observado acentuado aumento no diâmetro dos folículos em relação ao exame anterior. Em alguns animais, estes se apresentaram hipoecóicos com ecotextura homogênea, características sugestivas de folículos vitelogênicos pré-ovulatórios (STAHL, 2007) os quais chegam a 30 mm durante a ovulação (YAMANOUYE et al., 2004). Nesta fase, a contagem dos folículos para determinar o tamanho da ninhada pode levar a um valor errôneo e superestimado, visto que os folículos podem ser reabsorvidos e não ocorrer a ovulação (TAYLOR; DENARDO, 2005).

Segundo Denardo e Autumn (2001), após a ovulação é possível observar massas circulares ou oblongas alinhadas, maiores que 30 mm, ocupando a maior parte distal da cavidade celomática. Em nosso experimento, foram visibilizadas estruturas oblongas, achatadas, hipoecóicas, com ecotextura homogênea e de grandes dimensões, sendo que o maior diâmetro registrado foi de 44 mm (Figura 18 A). Foi observado também, um aumento na quantidade de conteúdo líquido adjacente (Figura 18 B). Provavelmente, essas características ultrassonográficas correspondem ao ovócito ou ovo (zigoto) em oviduto, assim como descrito por Betkowski (2006).

Em nosso experimento, as fêmeas foram consideradas gestantes a partir do momento em que as características ultrassonográficas acima descritas foram visibilizadas junto a um aumento na dosagem da progesterona sérica. A mediana obtida na fase ovulatória e de provável fertilização foi de 15,2 ng/ml.

No estudo realizado por Almeida Santos (2005) com cascavéis, essa elevação significativa nos níveis séricos de progesterona após a fase de vitelogênese secundária também foi observada, apresentando um valor mediano de 19,2 ng/ml durante a fase ovulatória.

Nos exames seguintes, foi observado conteúdo líquido no interior destas estruturas (Figura 18 C) e após uma a duas semanas, o embrião foi identificado na periferia com batimentos cardíacos evidentes (Figura 18 D). Em algumas fêmeas, notou-se o aparecimento de massas hipoecóicas, com superfície

irregular e margens hiperecóicas, características ultrassonográficas sugestivas de folículos em regressão (atrésicos), segundo Stahl (2007) (Figura 19).

Pizzatto (2006) definiu o desenvolvimento embrionário de serpentes da família Boidae em três estágios: 1 – logo após a ovulação (e provavelmente fecundação) quando somente o vitelo é visível; 2 – o vitelo ainda é abundante, mas um pequeno embrião já é visível e 3 – o embrião já está totalmente formado e não há mais vitelo.

De acordo com esta classificação, no mês de setembro (primavera), foi possível observar os estágios 1 e 2 do desenvolvimento embrionário.

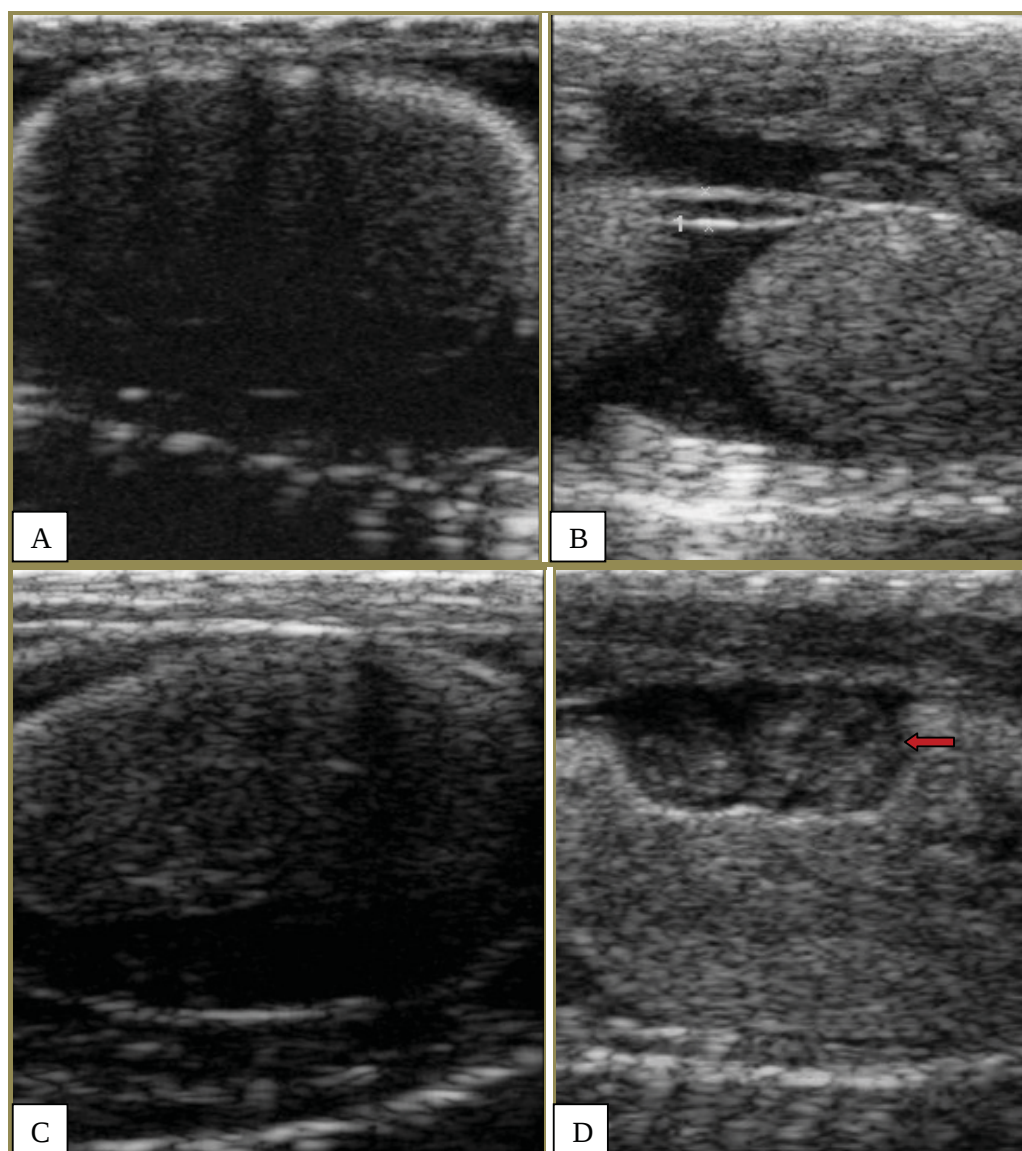


FIGURA 18: (A) Ovócito ou ovo em ovidutos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). (B) Presença de líquido em oviduto de cascave (*Crotalus durissus terrificus*). (C) Conteúdo líquido entremeado ao vitelo. (D) Embrião de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) localizado em periferia (seta).

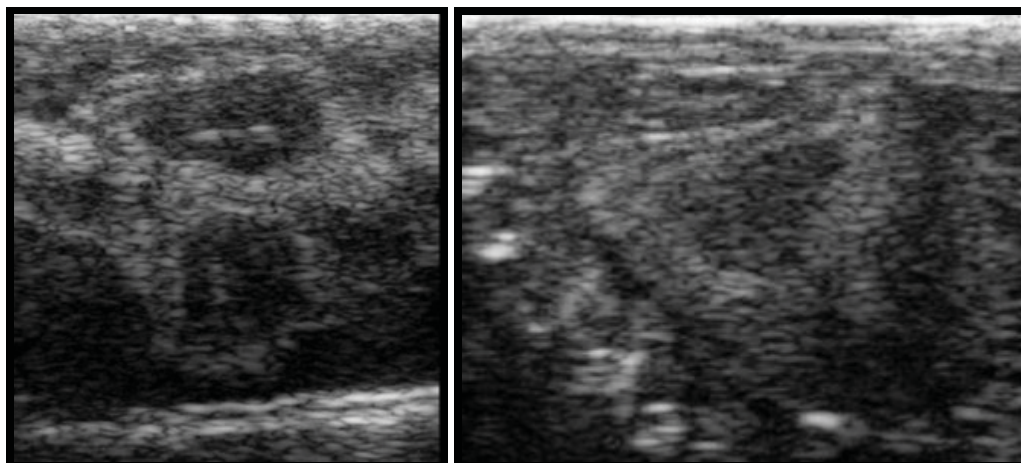


FIGURA 19: Imagens sugestivas de folículos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) em regressão (atrésicos).

Foram realizadas duas avaliações ultrassonográficas em cada animal no mês de outubro, período correspondente à primavera. Neste período foi possível observar a progressão do desenvolvimento embrionário em relação à avaliação anterior, com início de calcificação e batimentos cardíacos presentes.

Foi visibilizada também a diminuição da quantidade de vitelo em relação ao exame anterior (Figura 20).

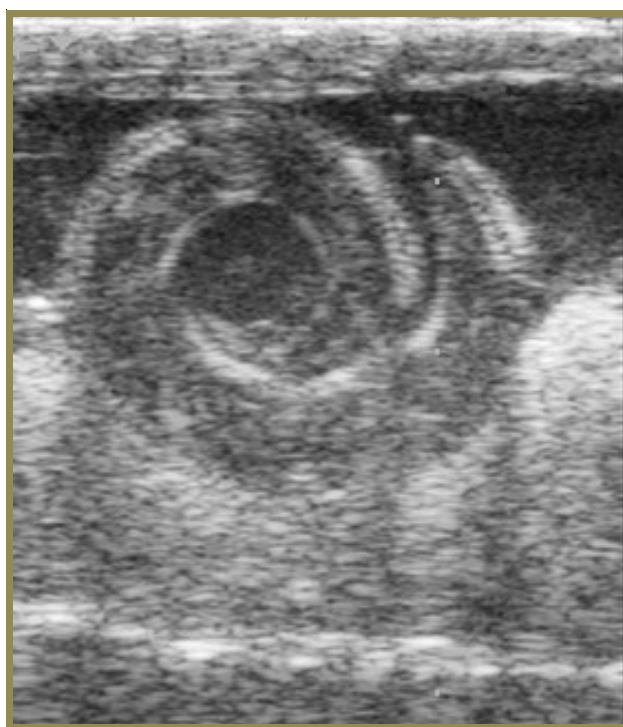


FIGURA 20: Embrião de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) em início de calcificação, com diminuição da quantidade de vitelo.

Algumas fêmeas apresentaram ovos atrésicos (Figura 21). Ultrassonograficamente, são descritos como estruturas ovais, achatadas, formadoras de sombra acústica posterior (Figura 22).



FIGURA 21: Ovo atrésico de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

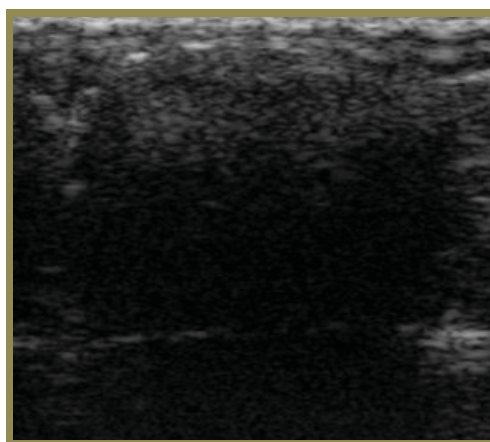


FIGURA 22: Sonograma de ovo atrésico de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

Na avaliação realizada em dezembro, período correspondente ao verão, as fêmeas encontravam-se em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário. Foi possível observar calcificação da coluna vertebral dos fetos, com formação de sombra acústica posterior. Notou-se discretos movimentos fetais e ausência do vitelo (Figura 23). De acordo com Taylor e Denardo (2005), a ausência de vitelo indica o período periparto.

Nesta fase, a contagem do número de filhotes é dificultada devido ao desenvolvimento fetal acentuado. Estas características correspondem ao estágio 3, segundo a classificação de Pizzatto (2006). As fêmeas 2 e 5 pariram neste mês de avaliação e apresentaram folículos pequenos, circulares, anecóicos, em pequena quantidade. De acordo com Almeida Santos (2005), os folículos do período pós-parto assemelham-se aos observados na vitelogênese primária (Figura 24).

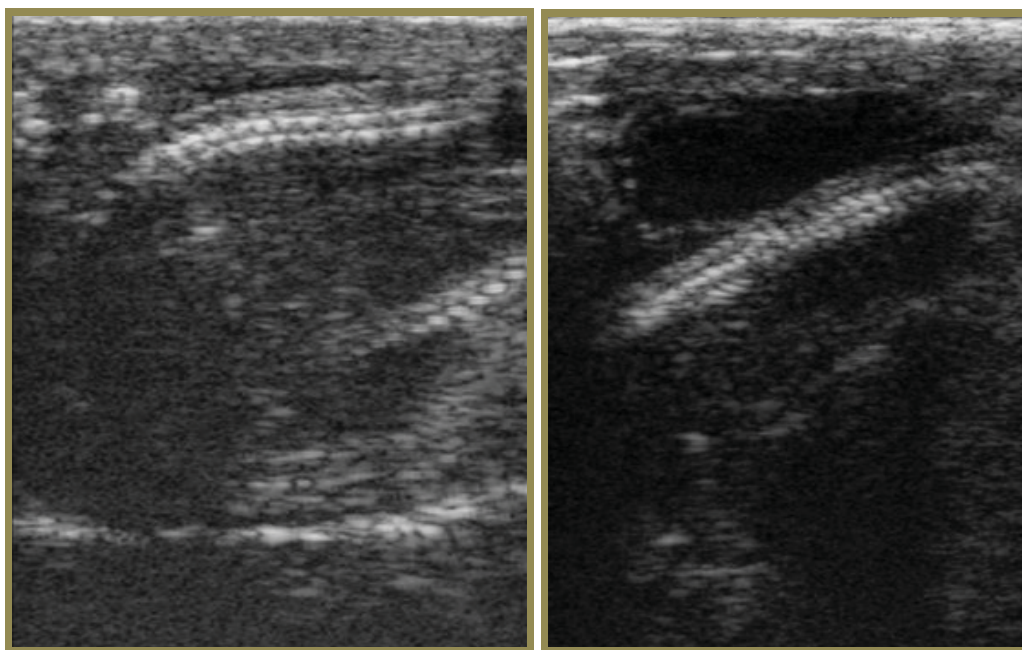


FIGURA 23: Sonograma demonstrando desenvolvimento acentuado e feto de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) com calcificação da coluna vertebral e ausência de vitelo.

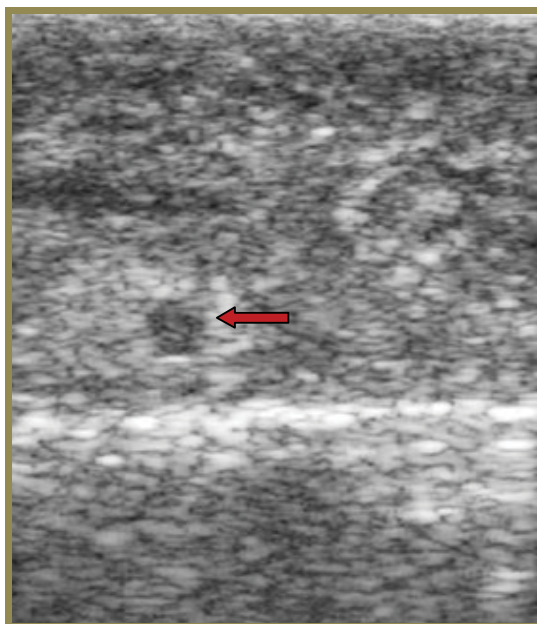


FIGURA 24: Folículo circular e anecóico de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) em período pós-parto (seta).

No mês de janeiro, período correspondente ao verão foram observadas gestações em fase final e folículos menores que 10 mm, sendo então, considerados pré-vitelogênicos (Figura 25), segundo Almeida Santos e Orsi (2002) e Almeida Santos (2005). Ultrassonograficamente, os folículos apresentaram-se circulares e anecóicos, dispostos em cadeia, semelhante a um “colar de pérolas” (Figura 26).

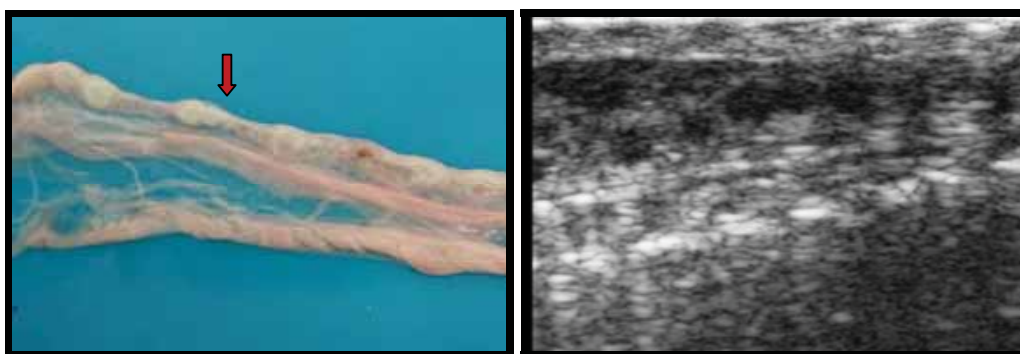


FIGURA 25: Folículos pré-vitelogênicos (seta) em ovário de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). FIGURA 26: Folículos pré-vitelogênicos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

Todas as fêmeas gestantes (com exceção das fêmeas 2 e 5) pariram no mês de janeiro. No total, foi registrado o nascimento de 69 filhotes durante o experimento, com média de aproximada de 7 filhotes/fêmea. Este valor se aproxima da média conhecida para viperídeos (2 a 16 filhotes por fêmea) (SEIGEL; FORD, 1987).

A relação entre o tamanho da ninhada e o tamanho do corpo da fêmea tem sido documentada em uma ampla variedade de répteis, mostrando uma correlação significativa entre elas na maioria das espécies (FITCH, 1963; BAUMAN; METTER, 1977; KING, 2000; JANEIRO-CINQUINI, 2004; ALMEIDA SANTOS 2005), porém, em nosso experimento essa correlação não foi observada ($r = 0,511$ e $P = 0,131$), assim como no estudo realizado por Pizzatto (2006) no qual o número de folículos vitelogênicos ou embriões não estava relacionado ao tamanho da fêmea nas espécies *Epicrates cenchria assisi*, *Epicrates c. cenchria* e *Epicrates c. crassus*.

Observações sobre o tamanho da ninhada são as mais abundantes fontes de informação a respeito da reprodução em serpentes (TURNER, 1977).

Farr e Gregory (1991) demonstraram que algumas estimativas do tamanho da prole podem ser afetadas em vários graus pela inclusão ou exclusão de filhotes mortos ou ovos não desenvolvidos.

No estudo realizado por Janeiro-Cinquini (2004) com *B. jararaca*, foi observada uma correlação positiva significativa entre o comprimento da mãe e o tamanho da ninhada. A intensidade dessa correlação foi afetada pela inclusão ou não de ovos atresícos. Rosen e Goldberg (2002) demonstraram em seu trabalho correlação positiva entre o tamanho das fêmeas de *Crotalus atrox* quando a amostra foi baseada na contagem de folículos vitelogênicos, porém quando a contagem de embriões e fetos nascidos foi considerada, essa correlação não foi observada. Segundo Farr e Gregory (1991) alguns dados para determinação da ninhada são baseados na contagem através da palpação de fêmeas grávidas ou da dissecação de serpentes no início da gestação.

Embora a ultrassonografia não seja considerada uma técnica totalmente segura para quantificar o número de fetos, como descrito em pequenos animais (ROOT; SPAULDING, 1994), em nosso experimento foi verificada correlação linear ($n = 10$, $r^2 = 0,969$, $P < 0,0001$) entre a contagem de fetos através do exame ultrassonográfico e o número de filhotes nascidos (Figura 27).

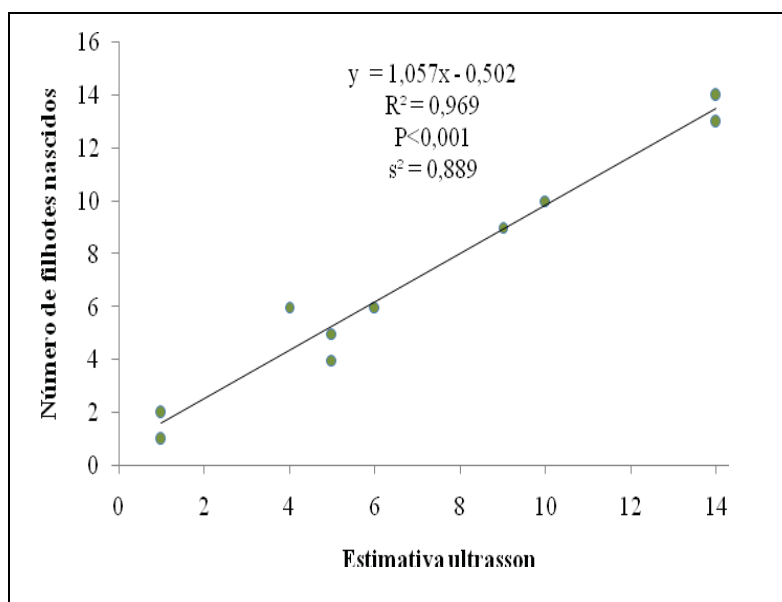


FIGURA 27: Correlação linear simples do número de filhotes de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) nascidos e o número de filhotes estimado através do ultrassom.

Na avaliação do mês de abril de 2011, todas as fêmeas apresentaram folículos pré-vitelogênicos pequenos e anecóicos. A mediana dos valores da progesterona sérica das fêmeas obtida neste mês foi 1,2 ng/ml, valor um pouco mais elevado do que o encontrado por Almeida Santos (2005), onde a mediana 0,8 ng/ml caracterizou a fase de vitelogênese primária do ciclo reprodutivo de cascavéis.

No presente trabalho, foi observado um discreto aumento de progesterona secretada na fase de vitelogênese secundária (abril e julho) em relação à fase anterior (V1). Segundo Girling (2002), este aumento pode estar relacionado ao crescimento do epitélio ovidutal.

Na fase ovulatória, foi observado um aumento significativo de progesterona, que se manteve alta durante todas as fases da gestação.

As fêmeas prenhes apresentaram os maiores níveis de progesterona quando comparados às fêmeas em vitelogênese primária, secundária ou no período pós-parto, fato também observado por Almeida Santos et al. (2004) e Almeida Santos (2005). Assim como em mamíferos, este hormônio em répteis se mantém alto durante todas as fases da gestação, desempenhando um papel importante na manutenção da mesma (ALMEIDA SANTOS et al., 2004; LIND, 2009). Callard e Hirsch (1976) relataram que a progesterona foi responsável pela diminuição da atividade miometrial em tartarugas-pintadas (*Chrysemys picta*), resultando na retenção de seus ovos. No entanto, estudos realizados com serpentes vivíparas revelaram que a administração exógena deste hormônio não influenciou na duração das gestações, sugerindo que o feto seja responsável pelo estímulo inicial da parturição (Bonnet et al., 2001).

Os níveis de progesterona decaem drasticamente em serpentes pós-parto (ALMEIDA SANTOS, 2005), fato também observado em nosso estudo.

Foram observadas diferenças significativas nos níveis de progesterona nos diferentes estágios do ciclo reprodutivo de cascavéis fêmeas. Os resultados estão representados a seguir (Figura 28 e Tabela 6).

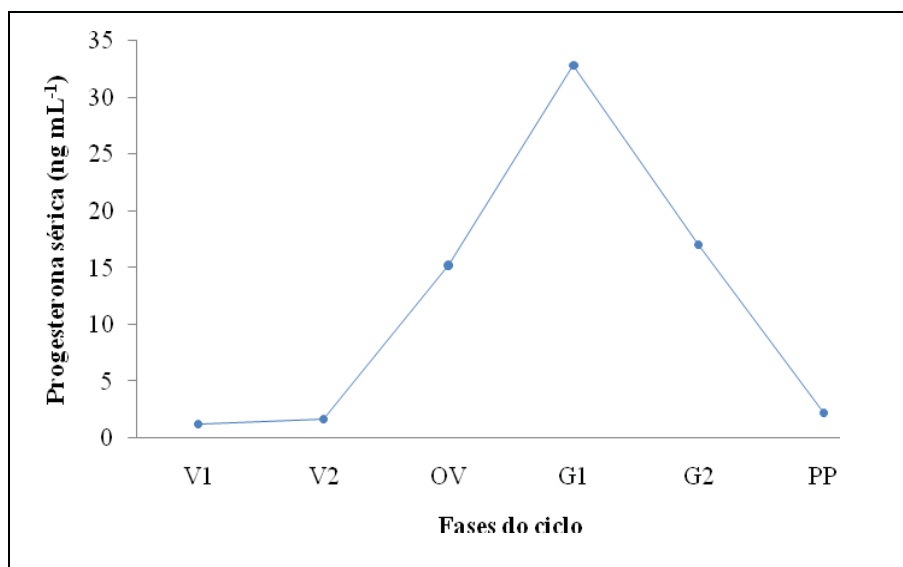


FIGURA 28: Níveis de progesterona sérica (ng/ml) durante a vitelogênese primária (V1), vitelogênese secundária (V2), ovulação (OV), gestação estágio 1 (G1), gestação estágio 2 (G2) e pós parto (PP) em cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*).

TABELA 6: Mediana dos valores de progesterona sérica (ng/ml) durante a vitelogênese primária (V1), vitelogênese secundária (V2), ovulação (OV), gestação estágio 1 (G1), gestação estágio 2 (G2) e pós parto (PP) em cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*).

	Mediana	25%	75%
V1	1,27 c	0,92	2,01
V2	1,70 c	1,14	2,28
OV	15,24 ab	13,18	19,35
G1	32,81 a	28,16	36,61
G2	17,07 ab	15,39	24,03
PP	2,24 bc	1,61	2,91

*Medianas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Dunn's ($P > 0,005$).

De acordo com Almeida Santos e Orsi (2002), fêmeas após o parto entrarão em fase quiescente (vitelogênese primária) e estarão em fase ativa (vitelogênese secundária) somente na estação seguinte caracterizando a bienalidade do ciclo.

Este lapso de tempo observado durante o ciclo está relacionado, aparentemente, à capacidade de armazenar gordura na cavidade celomática, visando à reprodução (BLEM, 1982).

Segundo Kuchling (1989), o exame ultrassonográfico é a alternativa mais vantajosa no estudo da atividade ovariana e padrões reprodutivos quando se quer evitar a eutanásia.

Neste estudo, o ultrassom se mostrou eficiente na identificação de folículos vitelogênicos e ovos atrésicos, bem como no acompanhamento do desenvolvimento embrionário e viabilidade fetal, podendo assim, fornecer informações sobre o tamanho da ninhada através das diferentes estruturas reprodutivas.

5.2.3. Não Gestantes

As fêmeas 11 e 12 apresentaram folículos pequenos, em pouca quantidade, circulares e anecóicos durante todos os meses de avaliação (abril, julho, outubro de 2010 e janeiro de 2011) (Figura 29). A mediana dos valores de progesterona sérica de ambas as fêmeas foram 0,7ng/ml (fêmea 11) e 1,14 ng/ml (fêmea 12) (Anexo 2). Nós sugerimos algumas explicações prováveis para o comportamento dos folículos e da progesterona sérica nestes animais.

As fêmeas poderiam estar no ano não reprodutivo, em fase de quiescência folicular (vitelogênese primária), já que os resultados obtidos se assemelharam aos encontrados no mês de abril de 2011 nas fêmeas recém paridas. Como os animais são de vida livre, não é possível saber se houve cópula ou gestações antes da chegada ao cativeiro. No estudo realizado por Almeida Santos et al. (2004) as cascavéis em período não reprodutivo apresentaram níveis baixos de progesterona em todas as estações climáticas, resultado semelhante ao obtido em nosso experimento.

Outra explicação é que as fêmeas poderiam não estar sexualmente maduras e a vitelogênese não foi iniciada. Denardo e Autumn (2001) observaram que a presença do macho desempenha um papel importante na progressão do ciclo reprodutivo das fêmeas de *Python curtus*. Nesse estudo, foi realizado um acompanhamento do crescimento folicular de fêmeas nulíparas nascidas em cativeiro através do exame ultrassonográfico. Somente as fêmeas alojadas com machos durante o período de cópula iniciaram a vitelogênese secundária, diferentemente das fêmeas isoladas, que apresentaram folículos em vitelogênese primária os quais sofreram regressão três meses depois.

Segundo Greene (1997), as fêmeas investem uma energia substancial durante o ciclo reprodutivo, atribuindo cerca de 30% ou mais de sua massa corpórea na ninhada. A exigência da presença do macho visando uma possível cópula para iniciar a vitelogênese secundária evita investimento energético desnecessário.

O estresse é outro fator que pode ter interferido na vitelogênese. Em um estudo com lagarto *Mabuya caninmata*, ocorreu um decréscimo significativo no número de oogônias, oócitos, níveis séricos de estradiol, além da ausência de folículos quando esses animais foram tratados com corticosterona exógena (NIJAGAL, YARJURVEDI, 1999 *apud* GREGO, 2006).

As fêmeas 13 e 14 iniciaram a vitelogênese secundária, porém não evoluíram para ovulação. O crescimento dos folículos foi observado em abril e julho, chegando a atingir o tamanho pré-ovulatório, porém, em seguida, estes regrediram a partir da avaliação de setembro. Em janeiro, os folículos se apresentaram pequenos, circulares e anecóicos (Figura 30).

De acordo com Casares et al. (1997), a regressão dos folículos (atresia folicular) pode acontecer em qualquer fase da foliculogênese. Estes autores monitoraram o crescimento folicular de tartarugas *Geochelone ssp.* através do ultrassom e observaram que, freqüentemente, os folículos pré-ovulatórios não ovulavam ou não chegavam ao tamanho pré-ovulatório. Foi sugerido que os folículos podem ter se tornado atrésicos dependendo da adequada disponibilidade de alimento. A diminuição da temperatura e mudanças no manejo pode ter diminuído a ingestão de alimentos, ocasionado a atresia folicular.

Ultrassonograficamente, folículos vitelogênicos em regressão apresentam um padrão heterogêneo e superfície irregular, com área hipoeecóica central (STAHL, 2007).

A mediana dos valores de progesterona sérica de ambas as fêmeas foram 1,56 ng/ml (fêmea 13) e 2,068 ng/ml (fêmea 14) (Anexo 2).

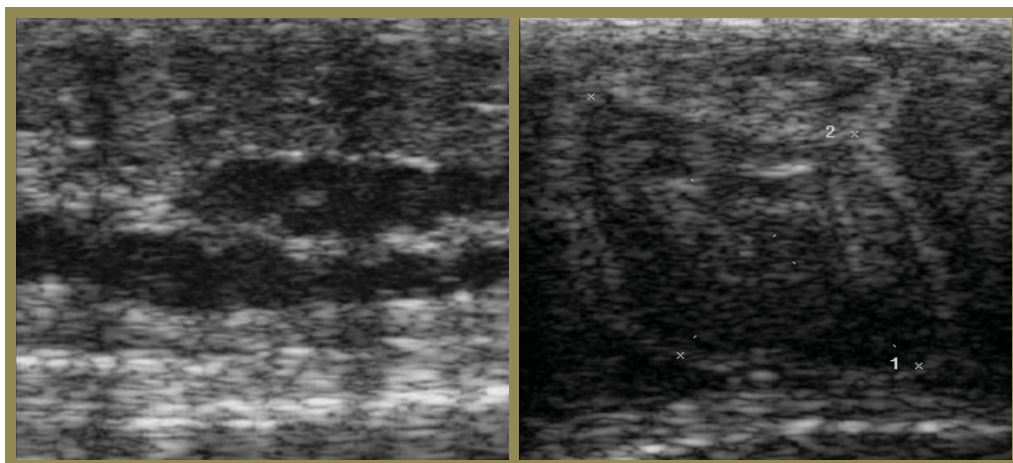


FIGURA 29: Folículos pré-vitelogênicos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*).

FIGURA 30: Folículo de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) em regressão (atrésico).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Nesse estudo foi possível observar as mudanças anatômicas sazonais das estruturas reprodutivas de cascavéis (*C.d.t.*) machos e fêmeas através do exame ultrassonográfico e dosagem sérica de progesterona e testosterona.
- O exame ultrassonográfico se mostrou eficiente na identificação de estruturas reprodutivas em cascavéis, tais como folículos pré-vitelogênicos e vitelogênicos, embriões, ovos atrésicos e testículos.
- Ultrassonograficamente, os testículos apresentaram formato alongado ou fusiforme, de contornos regulares e definidos, ecotextura homogênea, hipocóicos em relação às estruturas adjacentes, envolvidos por uma cápsula hiperecótica. Essas características se mantiveram semelhantes nos diferentes meses de avaliação.
- O maior comprimento testicular foi observado em janeiro (verão), período correspondente ao pico da espermatogênese em cascavéis (*C.d.t.*).
- Não foi possível detectar diferenças no comprimento testicular nas avaliações realizadas em abril, julho e outubro. O ultrassom pode não ter sido sensível o suficiente para detectar discretas alterações no tamanho ou tal fato ocorreu devido ao intervalo grande entre as avaliações.
- Os maiores níveis séricos de testosterona observados foram em janeiro (verão) e abril (outono), pico da espermatogênese e fase de cópula, respectivamente. No inverno, fase de inatividade e regressão testicular, foram verificados os menores níveis.
- As fêmeas gestantes apresentaram folículos em vitelogênese secundária em abril (outono) e inverno (julho). Estes foram caracterizados como estrutura de formato circular a oval, com margens

hiperecóicas e centro hipoecóico, ecotextura homogênea ou discretamente heterogênea, dispostos em cadeia ou “cachos”. O tamanho variou entre 10 a 30 mm, onde foram considerados folículos pré-ovulatórios.

- As ovulações e as gestações iniciaram em setembro e outubro (primavera), onde foram observados ovócitos ou ovos (zigotos) presentes em ovidutos, caracterizados como estruturas oblongas, achatadas, hipoecóicas, com ecotextura homogênea e de grandes dimensões, sendo que o maior diâmetro registrado foi de 44 mm.
- O desenvolvimento embrionário/fetal foi observado através dos batimentos cardíacos, movimentos fetais, calcificação da coluna vertebral e quantidade de vitelo presente.
- O ultrassom se mostrou eficiente na contagem de fetos.
- As gestações duraram aproximadamente 120 dias e os nascimentos ocorreram em dezembro e janeiro (verão).
- As fêmeas em período não reprodutivo apresentaram folículos em vitelogênese primária (pré-vitelogênicos) durante todos os meses de avaliação. Estes apresentaram formato circular, anecóicos, com diâmetro inferior a 10 mm.
- As fêmeas em período não reprodutivo apresentaram níveis baixos de progesterona em todos os meses de avaliação.
- Os níveis de progesterona aumentaram na fase ovulatória e estes se mantiveram altos durante todas as fases da gestação, decaindo drasticamente após o parto.

6.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para melhor acompanhamento do ciclo reprodutivo, sugere-se a realização da dosagem de estradiol sérico e dosagem de corticosterona para descartar as possíveis interferências causadas por estresse nesses animais.

Sugere-se também, a utilização de um aparelho ultrassonográfico com melhor definição para acompanhamento da organogênese dos fetos em desenvolvimento.

A diminuição dos intervalos entre os exames possibilitaria o acompanhamento das gestações, foliculogênese e tamanho testicular de forma mais detalhada, porém poderia haver maior estresse para os animais, especialmente as gestantes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALDRIDGE, R.D. Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. **Copeia**, n. 3, p. 493-496, 1975.
- ALDRIDGE, R.D. Female reproductive cycles of the snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, v. 35, p. 256-261, 1979.
- ALMEIDA, F.S.; CONTE, A.V.; SANT'ANNA, S.S.; FERNANDES, W.; GREGO, K.F. Localização topográfica e imagem ultrassonográfica dos órgãos internos da jararaca (*Bothrops jararaca*, Serpentes, Viperidae). In: CONGRESSO, 13., ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS (ABRAVAS), 19., 2010, Campos do Jordão. **Anais...Campos do Jordão: ABRASAS**, 2010. p. 67-70.
- ALMEIDA SANTOS, S.M. **Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 206f. Tese (Doutorado em Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ALMEIDA SANTOS, S.M.; ABDALLA, F.M.F.; SILVEIRA, P.F.; YAMANOUYE, N.; BRENO, M.C.; SALOMÃO, M.G. Reproductive cycle of the neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. **General and Comparative Endocrinology**, v. 139, p. 143-150, 2004.
- ALMEIDA SANTOS, S.M.; SALOMÃO, M.G. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). **Japanese Journal of Herpetology**, v.17, p. 46-52, 1997.
- ALMEIDA SANTOS, S.M.; SALOMÃO, M.G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. (Eds.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Publ. Mountain, 2002. p. 445-462.
- ALMEIDA SANTOS, S.M.; ORSI, A.M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 2, p. 109-112, 2002.

ARAUJO, F.A.A., SANTALUCIA, M.; CABRAL, R.F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C.; SIQUEIRA FRANÇA, F.O.; WEN, F.H.; SANT'ANA MALAQUE, C.M.; HADDAD, V.J. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Editora Sarvier, São Paulo, p. 6-9, 2003.

AUGUSTO, A.Q. Ultrasonography in South American Wild Animals. In: FOWLER M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, medicine, and surgery of South American Wild Animals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001. p. 536.

AUGUSTO, A.Q. Ultra-sonografia. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. p. 879-895.

BARRAVIERA, B.; FERREIRA JÚNIOR, R.S. **Acidentes por animais peçonhentos**. Botucatu: CEVAP-UNESP, 2007. p.110.

BASTOS, E.G.M.; ARAUJO, A.F.B.; SILVA, H.R. Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. **Revista Brasileira de Zoolologia**. v.22, n.3, p.812- 815, 2005.

BAUMAN, M.A.; METTER, D.E. Reproductive cycle of the northern watersnake, *Natrix s. sipedon* (Reptilia, Serpentes, Colubridae). **Journal of Herpetology**, v. 11, p. 51-59, 1977.

BÉRNILS, R.S. (Org.). **Brazilian reptiles: list of species**. Disponível em: < <http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 01 fev. 2010.

BERTONA, M.; CHIARAVIGLIO, M. Reproductive Biology, Mating Aggregations, and Sexual Dimorphism of the Argentine Boa Constrictor (*Boa constrictor occidentalis*). **Journal of Herpetology**, v. 37, n. 3, p. 510-516, 2003

BETKOWSKI, S.E. **Estudo dos níveis de progesterona e estradiol séricos e acompanhamento das características ultra-sonográficas de ovários e ovidutos de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) mantidas em cativeiro, em um período de 12 meses**. 94f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BLEM, C.R. Biennial reproduction in snakes: an alternative hypothesis. **Copeia**, n. 4, p. 961-963, 1982.

BONNET, X.; NAULLEOU, G.; MAUGET, R. The influence of body condition on 17 β -estradiol levels in relation to vitellogenesis in female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 93, p. 424-437, 1994.

BONNET, X.; NAULLEOU, G.; BRADSHAW, D.; SHINE, R. Changes in plasma progesterone in relation to vitellogenesis and gestation in the viviparous snake *Vipera aspis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, p. 84-94, 2001.

CALLARD, I.P.; HIRSCH, M. The influence of oestradiol-17 β and progesterone on the contractility of the oviduct of the turtle, *Chrysemys picta*, in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 68, p.147-152, 1976.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. New York: Cornell University Press, 2004. 728p.

CASARES, M.; RUBEL, A.; HONEGGER, R.E. Observations on the Female Reproductive Cycle of Captive Giant Tortoises (*Geochelone* spp.) using Ultrasound. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n. 3, p. 267-273, 1997.

CHIARAVIGLIO, M.; SIRONI, M.; CERVANTES, R.; BERTONA, M.; LUCINO, S. Imagenes de ultrasonido de estruturas reproductivas em *Boa constrictor occidentalis* (serpentes: Boidae). **Gayana Zoology**, v. 62, n. 1, p. 91-95, 1998.

DENARDO, D. Reproductive Biology In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006. p. 212-224.

DENARDO, D.F.; AUTUMN, K. Effect of male presence on reproductive activity in captive female blood pythons, *Python curtus*. **Copeia**, v. 4, p. 1138-1141, 2001.

FARR, D.R.; GREGORY, P.T. Sources of variation in estimating litter characteristics of the garter snake, *Thamnophis elegans*. **Journal of Herpetology**, v. 25, p. 261-268, 1991.

FRANCO, F.L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003. p.13-32.

FITCH, H.S. Natural history of the racer, *Coluber constrictor*. **University of Kansas Museum of Natural History Miscellaneous Publication**, v. 15, p. 351-468, 1963.

FUNK, R.S. Reproductive Biology. In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006. p. 42-58.

GIRLING, J.E. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 141-170, 2002.

GNUDI, G.; VOLTA, A.; DI IANNI, F.; BONAZZI, M.; MANFREDI, S.; BERTONI, G. Use of ultrasonography and contrast radiography for snake gender determination. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 50, n. 3, p. 309-311, 2009.

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

GREGO, K.F. **Determinação dos níveis séricos de corticosterona e hormônios esteóides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e da extração de veneno, em *Bothrops jararaca* (Ophidea: Viperidae)**. 2006. 130f. Tese (Doutorado - Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

HILDEBRANDT, T.B.; HERMES, R.; JEWGENOW, K.; GORITZ, F. Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species. **Theriogenology**, v. 53, p. 73-84, 2000.

HILDEBRANDT, T.B.; GÖRITZ, F. Use of ultrasonography in zoo animals. In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. **Zoo & wild animal medicine: current therapy**. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 41-54.

ISAZA, R.; ACKERMAN, N.; JACOBSON, E.R. Ultrasound imaging of the coelomic structures in the *Boa constrictor* (*Boa constrictor*). **Veterinary radiology and ultrasound**, v.34, n.6, p. 445-450, 1993.

ISHII, S. Gonadotropins. In: PANG, P.K.T.; SCHREIBMAN, M. P.; JONES, R.E. **Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications**. San Diego: Academic Press, 1991, p. 33 – 66.

JACOBSON, E.J. Snakes. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 23, n. 6, p. 1179-1213, 1993.

JANEIRO-CINQUINI, T.R.F. Capacidade reprodutiva de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae). **Iheringia, Série Zoologia**, v. 94, n. 4, p. 429-431, 2004.

JUAN, F.C.; THOMAZINI, I.A.; GIANINI, M.J.M.; VITERBO, F.; TOSCANO, E.; MORAES, R.A.; BARRAVIEIRA, B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. **São Paulo Medical Journal**. v.113, n.5, p.1000 – 1002, 1995.

KING, R.B. Analyzing the relationship between clutch size and female body size in reptiles. **Journal of Herpetology**, v. 34, n. 1, p. 148-150, 2000.

KOLESNIKOVAS, C.K.M.; GREGO, K.F.; ALBUQUERQUE, L.C.R. Ordem Squamata Subordem Ophidia (Serpente). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. p.68-85.

KUCHLING, G. Assesment of ovarian follicles and oviductal eggs by ultrasound scanning in live freshwater turtles, *Chelodina oblonga*. **Herpetologica**, v. 45, n. 1, p. 89-94, 1989.

KUHNEL, W.; KRISCH, B. On the sexual segment of the kidney in the snake *Natrix natrix*. **Cell Tiss. Res.**, v.148, p.417-429, 1974.

LANGLADA, F. Ciclo sexual bienal de serpentes *Crotalus* do Brasil. Comprovação. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 36, p. 67-72, 1972.

LANGLADA, F.G.; SANTOS, S.; FERREIRA, I.L.L. Techniques of artificial insemination in *Crotalus durissus terrificus* (VIPERIDAE-CROTALINAE). **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 31, n. 2, p. 141-144, 1994.

LEMOS, J.C.; ALMEIDA, T.D.; FOOK, S.M.L.; PAIVA, A.A.; SIMÕES, M.O. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.12, n.1,.2009.

LIND, C.M. **The relationship between seasonal steroid hormone concentrations and the reproductive cycle in the northern pacific rattlesnake, *Crotalus oreganus***. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Politécnica da Califórnia, Califórnia, 2009.

MARTINEZ-TORRES, M.; GUZMAN-RODRIGUEZ, R.; CARDENAS-LEON, M.; BRUNNER-REYNALDO, N. Follicular development and ovulation determined by ultrasound imaging in the viviparous lizard *Barisia imbricata* (reptilia: anguidae). **The Southwestern Naturalist**, v. 51, n. 3, p. 401- 406, 2006.

MATAYOSHI, P.M.; SOUZA, P.M.; PRESTES, N.C.; FERREIRA JUNIOR, R.S., GASPAROTTO, V.P.O.; BISCOLA, N.P. Avaliação ultrassonográfica hepática de cascavéis (*Caudisona durissa*). In: HERPÉTIL, 3., 2010, Niterói. **Anais...** Niterói: Herpétil, 2010a.

MATAYOSHI, P.M.; SOUZA, P.M.; PRESTES, N.C.; FERREIRA JUNIOR, R.S. Avaliação ultrassonográfica das estruturas da cavidade celomática da cascavel (*Caudisona durissa*). In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS – CONPAVEPA, 10., São Paulo, 2010. **Anais...**São Paulo, 2010b.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JUNIOR, V. **Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003. p.33-62.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância e Epidemiologia. **Guia de vigilância epidemiológica**. Acidentes por animais peçonhentos. 2008. p. 5-6.

NETO, F.C.P.; GUERRA, P.C.; COSTA, F.B.; ARAUJO, A.V.C.; MIGLINO, M.A.; BOMBONATO, P.P.; VULCANO, L.C.; ALVES, F.R. Ultra-sonografia do fígado, aparelho renal e reprodutivo da jibóia (*Boa constrictor*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 317-321, 2009.

NIJAGAL, B.S.; YAJURVEDI, H.N. Influence of corticosterone on FSH-induced ovarian recrudescence in the lizard *Mabuya carinata*. **General and Comparative Endocrinology**, v.115, p. 364-369, 1999.

OLIVEIRA, C.A.; SILVA, R.M.; SANTOS, M.M.; MAHECHA, G.A. Location of the ureteral openings in the cloacas of tinamous, some rattle birds, and crocodilians: A primitive character. **Journal of Morphology**, v. 260, n. 2, p.234-246, 2004.

PIZZATTO, L. **Ecomorfologia e estratégias reprodutivas nos Boidae (Serpentes), com ênfase nas espécies Neotropicais**. 2006. 162f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Faculdade de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PIZZATTO, L.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; MARQUES, O.A.V. Biologia reprodutiva das serpentes brasileiras. In: OLIVEIRA, M.E.; BARRETO, L. **Herpetologia no Brasil**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2006. p. 201-221.

POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; MCFARLAND, W.N. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 1999. 798p.

RAITI, P. Transcoelomic ultrasonography of the reptile reproductive tract. **Exotic DVM Veterinary Magazine**, v. 1, n. 6, p. 27-32, 2000.

RAITI, P. Non-invasive imaging. In: GIRLING, S.J.; RAITI, P. **BSAVA Manual of reptiles**. 2.ed. Cheltenham: Blackwell Publishing, 2004. p. 87-102.

REDROBE, S.; WILKINSON, R.J. Reptile and amphibian anatomy and imaging. In: REDROBE, S.; MEREDITH, A. **Manual of exotic pets**. 4.ed. Barcelona: Grafos, 2002. p. 193-207.

ROOT, C.R.; SPAULDING, K.A. Diagnostic imaging companion animal theriogenology. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 9, n. 1, p. 7-27, 1994.

ROSEN, P.C.; GOLDBERG, S.R. Female reproduction in the Western Diamond-Backed Rattlesnake, *Crotalus atrox* (Serpentes: Viperidae), from Arizona. **Texas Journal Science**, v. 54, p. 347-356, 2002.

SAINSBURY, A.W.; GILLI, C. Ultrasonography anatomy and scanning technique of the coelomic organs of the bosc monitor (*varanus exanthematicus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 4, p. 421-433, 1991.

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

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

SALOMÃO, M.G.; ALMEIDA-SANTOS, S.M. The reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: SCHUETT, G.W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. **Biology of the vipers**. Indiana: Carmel, 2002. p. 507-514.

SALOMÃO, M.G.; ALMEIDA SANTOS, S.M.; PUERTO, G. Activity pattern of the rattlesnake *Crotalus durissus* (Viperidae: Crotalinae): Feeding reproduction and snakebite. **Studies on Neotropical Fauna Environment**, v. 30, p.101-106, 1995.

SCHUMACHER, J.; TOAL, R. Advanced radiography and ultrasonography in reptiles. **Seminars in Avian an Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 4, p. 162-168, 2001.

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

SEVER, D.M. Ultrastructure of the reproductive system of the Black swamp snake (*Seminatrix pygaea*) IV: Occurrence of an ampulla ductus deferentis. **Journal of Morphology**, v.626, n.5, p.714-730, 2004.

SHINE, R. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. In: GANS, C.; BILLETT, F. (Eds.). **Biology of reptilian**. New York: Wiley,1985. v.15, p. 605-694.

SILVA, W.B.; SOARES, R.M.; MACHADO, C.; FREIRE, I.M.A.; SILVA, L.C.C.P.; MOREIRA, S.B.; GOLDBERG, D.W.; ALMOSNY, R.N.P. Bioquímica

plasmática de cascavéis (*Caudisona durissa* LINNAEUS, 1758) em cativeiro. **Ciência Rural**. v.40, n.12, p.2510-2514, 2010.

SILVERMAN, S. Diagnostic Imaging. In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006. p. 471-489.

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

STAHL, S.J. Reptile ultrasound examination. In: WESTERN VETERINARY CONFERENCE, 79., 2007, Las Vegas. **Anais...** Las Vegas, 2007. v. 525.

STETTER, M.D. Ultrasonography. In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006. p. 665-674.

TAYLOR, E.N.; DENARDO, D.F. Reproductive ecology of wetern diamond-backed rattlesnakes (*Crotalus atrox*) in the Sonoran Desert. **Copeia**, v. 1, p. 152-158, 2005.

TURNER, F.B. The dynamics of populations of squamates and crocodilians. In: GANS, C.; TINKLE, D.W. **Biology of reptilia**. New York: Academic, 1977. v. 7, p. 157-264.

UETZ, P. **The reptile database**. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/>>. Acesso em: 5 mar. 2011.

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

VOLSØE, H. Seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus* (L.). **Spolia Zoology Museum Hauniensis**, v. 5, p.1-157, 1944.

WEN, F.H. Soroterapia. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.F.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD, V. **Animais Peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 380-93.

YAMANOUYE, N.; SILVEIRA, P.F.; ABDALLA, F.M.F.; ALMEIDA SANTOS, S.M.; BRENO, M.C.; SALOMÃO, M.G. Reproductive cycle of the Neotropical

Crotalus durissus terrificus: II. Establishment and maintenance of the uterine muscular twisting, a strategy for long-term sperm storage. **General Comparative Endocrinology**, v. 139, p. 151-157, 2004.

ZACARIOTTI, R.L. **Estudo longitudinal do espermograma e dos níveis de testosterona sérica de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) proveniente da natureza do estado de São Paulo**. 2004. 80p. Dissertação (Mestrado - Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ZACARIOTTI, R.L. **Avaliação reprodutiva e congelamento de sêmen em serpentes**. 2008. 98f. Tese (Doutorado - Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TRABALHO CIENTÍFICO

REVISTA “VETERINÁRIA E ZOOTECNIA”
NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS
INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados um por linha, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, **em três vias (uma original e duas cópias)** impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½" de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias **deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.**

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com key words e resumen com palabras-claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

RELATOS DE CASO

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com key words, resumen com palabras-claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

COMUNICAÇÕES CURTAS

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Exemplos

Citações

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (5).

Aulisa(1) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias.

Udupa & Prasad (9) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização

Herbsman et al. (7) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram.

O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51).

O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

Referências

Indique somente até seis autores. Em caso de mais autores, usar et al. após o sexto autor.

1 Artigo de revista

Andrade SF, Sakate M. Intoxicação por amitraz: revisão. Vet Not. 2004;10:1-15.

Modolo JR, Stachissini AVM, Gennari SM, Dubey JP, Langoni H, Padovani CV, et al. Frequência de anticorpos anti-Neospora caninum em soros de caprinos do estado de São Paulo e sua relação com o manejo dos animais. Pesq Vet Bras. 2008;28:597-9.

2 Organização como autor

Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12nd ed. Washington; 1975.

Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas: manual do usuário: versão 7.1. Viçosa; 1997.

3 Livro

Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.

4 Capítulo de livro

Corrêa MC, Corrêa CNM. Estafilococis em geral. In: Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p.91-103.

Mendes AA, Saldanha ESPB. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: Mendes AA, Naas IA, Macari M. Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. p.1-22

5 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3º Congresso Nordestino de Produção Animal; 2004, Campina Grande. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p.1-3

6 Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos

Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.

7 Publicações disponíveis na Internet

Vasconcelos JLM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras. Campinas; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <<http://www.milkpoint.com.br>>.

Trabalho enviado para a revista “Veterinária e Zootecnia”, registrado sob o número 509/11.

AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA CAVIDADE CELOMÁTICA DE SERPENTES

ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION OF SNAKES COELOMIC CAVITY

EVALUACIÓN ECOGRAFICA DE LA CAVIDAD CELÓMICA DE SERPIENTES

Priscilla Mitie Matayoshi¹

Priscilla Macedo de Souza²

Rui Seabra Ferreira Júnior³

Nereu Carlos Prestes⁴

Roberta Valeriano dos Santos¹

¹ Pós-graduanda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

² Professora do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

³ Pesquisador do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

⁴ Professor Adjunto do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Distrito de Rubião Júnior, s/n. 18618-000 Tel: (14) 3811-6249. Botucatu, SP, Brasil. E-mail: priscilla_mitie@yahoo.com.br (P.M. Matayoshi)

RESUMO

O interesse pelos répteis vem crescendo nos últimos anos e o aumento do número desses animais em cativeiro fez o conhecimento em manejo e clínica uma necessidade para o veterinário. Exames complementares como a ultrassonografia podem auxiliar no diagnóstico clínico de afecções nesses animais, que muitas vezes, não apresentam sinais clínicos evidentes. A ultrassonografia é um método diagnóstico seguro, não invasivo e eficiente utilizado na medicina de répteis. Suas aplicações incluem monitoramento da função reprodutiva e diagnóstico de afecções por meio da análise das mudanças anatômicas e topográficas dos órgãos. Existem poucos trabalhos sobre a aparência ultrassonográfica dos diferentes órgãos de um grande número de espécies de animais silvestres, sendo raros aqueles realizados em serpentes. Estes répteis possuem o corpo e os órgãos internos alongados, o que os difere dos outros animais na sua forma e apresentação. Diante do exposto, esta revisão teve por objetivo descrever o exame ultrassonográfico da cavidade celomática de serpentes.

Palavras-chave: Ultrassonografia, cavidade celomática, serpentes.

ABSTRACT

Interest in reptiles has been growing in the last years and the increasing of these animals in captivity became the knowledge in management and clinic, a necessity for the vet. Complementary tests such as ultrasound may help in clinical diagnosis of diseases which often show no clinical evident signs. Ultrasound is a safe diagnostic method, non invasive and efficient in reptile medicine. The applications include monitoring of reproductive function and disease diagnostic through analysis of anatomical and topographical organs changes. There are few studies about ultrasound of different organs in a large number of wild animals and rare studies in snakes. These reptiles present the body and internal organs elongated, which differ them from others animals in form and presentation. The aim of this revision is to describe ultrasound exams of snake's coelomic cavity.

Key words: Ultrasonography, coelomic cavity, snakes.

RESUMEN

En los últimos años el interés por los reptiles ha crecido y el número cada vez mayor de estos animales en cautividad hizo con que el conocimiento en el manejo y clínica sea una necesidad para el veterinario. Pruebas complementarias como la ecografía pueden ayudar en el diagnóstico clínico de las enfermedades en estos animales, que a menudo no muestran señales clínicas evidentes. La ecografía es un método diagnóstico seguro, no invasivo y eficaz, utilizado en la medicina de reptiles. Sus aplicaciones incluyen el control de la función reproductiva y el diagnóstico de los trastornos de los órganos a través del análisis anatómico y topográfico. Existen pocos estudios sobre la apariencia ecográfica de los diferentes órganos de un gran número de especies de animales salvajes, siendo raros aquellos realizados en serpientes. Estos reptiles tienen el cuerpo y los órganos internos alargados, con lo cual les diferencian de otros animales en su forma y presentación. Teniendo en cuenta el anterior, esta revisión tiene el objetivo de describir sobre el examen ecográfico de la cavidad celómica de serpientes.

Palabras-clave: ecografía, cavidad celómica, serpientes.

1. INTRODUÇÃO

A criação doméstica de répteis é uma prática relativamente recente, mas que vem crescendo de maneira vertiginosa, já sendo considerado o terceiro segmento da indústria “pet” nos EUA e na Europa, perdendo apenas em popularidade para os cães e gatos. No Brasil, apesar de muito recente, esse mercado vem seguindo esta tendência mundial e está crescendo rapidamente. Porém, esses animais exigem cuidados bastante distintos daqueles destinados aos demais animais domésticos, e por isso, é fundamental buscarmos conhecimento adequados (1).

Geralmente estes animais não demonstram sinais clínicos evidentes na maioria das afecções e, frequentemente, o exame físico não fornece informações suficientes para a conclusão do diagnóstico. As técnicas de diagnóstico por imagem como a ultrassonografia podem promover um diagnóstico mais preciso (2).

A ultrassonografia na medicina veterinária tem se mostrado um excelente método diagnóstico não invasivo (3). Ela é utilizada em diversas áreas incluindo: a oftalmologia, cardiologia, neurologia, ginecologia, andrologia, obstetrícia, oncologia e ortopedia (4). Além de auxiliar diagnóstico de afecções por meio da análise das mudanças anatômicas e topográficas dos órgãos (5), em animais silvestres, esta técnica oferece novas oportunidades relacionadas com o manejo dos animais em cativeiro, principalmente na área reprodutiva, pois, em conjunto com outras técnicas de diagnóstico, pode promover uma melhora nos programas de reprodução de espécies ameaçadas (6).

O exame ultrassonográfico em répteis pode ser um desafio, pois a anatomia de muitas espécies é única e se difere consideravelmente quando comparada com mamíferos e aves (7). As serpentes possuem o corpo alongado e apresentam todos seus órgãos internos delgados e também alongados, o que os difere dos outros animais na sua forma e apresentação (8).

O sucesso da aplicação do exame ultrassonográfico depende da habilidade e experiência do operador, incluindo o conhecimento da anatomia normal das espécies examinadas (7). O ultrassonografista deve estar familiarizado com a anatomia normal dos órgãos em estudo para reconhecer e diferenciar variações normais de alterações causadas por doenças (6). Levando em consideração a importância desse método diagnóstico por imagem e o aumento da criação dessa espécie silvestre em cativeiro, este trabalho teve por objetivo realizar uma revisão de literatura sobre a avaliação ultrassonográfica das estruturas da cavidade celomática de serpentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ANATOMIA TOPOGRÁFICA

As serpentes não possuem diafragma separando o coração e pulmões dos órgãos abdominais. Suas estruturas estão distribuídas dentro de uma cavidade, denominada cavidade celomática (9). A cavidade celomática pode ser dividida em três partes (terço cranial, médio e caudal). O terceiro cranial geralmente é composto pela traquéia, esôfago, glândula paratireóide, timo, tireóide e coração. O terceiro médio é composto pelos pulmões, fígado, continuação do esôfago, estômago, baço, pâncreas, vesícula biliar e porção inicial do intestino delgado. A parte final do intestino delgado, gônadas, adrenais, rins e intestino grosso localizam-se no terceiro caudal. Essa divisão pode ser utilizada para facilitar a localização das áreas de interesse no diagnóstico por imagem ou na determinação do acesso cirúrgico (10).

Outro método utilizado para descrição topográfica das vísceras de serpentes é descrito por Thompson (11,12), Brangdon (13), Gomes e Puerto (14) e Gabaldo et al. (15) que relaciona as vísceras das serpentes com a escutelação ventral com o objetivo de localizar a posição dos órgãos. A contagem é feita no sentido craniocaudal, sendo considerada a primeira escama cuja largura é maior que o comprimento e aquela que precede a placa anal, é considerada a última, como descrito por Gabaldo et al. (15). Posteriormente, esta técnica foi utilizada por Almeida et al. (16) para localização topográfica e ultrassonográfica dos órgãos internos de jararaca.

A organização das estruturas internas pode variar entre as famílias de serpente (15,17). O coração das serpentes localiza-se no final do terceiro cranial da cavidade celomática (16,18,19), possui dois átrios divididos por um septo completo e um ventrículo com um canal interventricular. Embora exista essa comunicação entre os ventrículos, há uma separação consideravelmente funcional entre a circulação oxigenada e a não-oxigenada que deixa o ventrículo. A posição do coração varia de acordo com o nicho ecológico da serpente e de sua posição filogenética (9). Badeer (20)

observou que em serpentes arborícolas, que estão sujeitas à pressão gravitacional sangüínea, o coração localiza-se mais cranial em relação à cabeça, enquanto que serpentes terrestres e serpentes aquáticas possuem o coração mais distante da cabeça.

Ao colocar a serpente em decúbito dorsal, os movimentos cardíacos podem ser visualizados através dos movimentos das escamas localizadas sobre o coração (10,19).

O fígado das serpentes localiza-se caudal ao coração e cranial ao segmento inicial do estômago (10), é bilobado (21), alongado e a vesícula biliar se encontra distante dele, em uma tríade, junto ao baço e aos pâncreas (10). Algumas espécies possuem o baço unido ao pâncreas, sendo chamado esplenopâncreas (9).

O estômago possui formato linear a alongado, localiza-se do lado esquerdo da cavidade celomática, imediatamente caudal ao segmento final do fígado (21). Suas paredes internas são mais pregueadas longitudinalmente do que as do esôfago (14).

O intestino divide-se em três porções: anterior, média e terminal. O intestino anterior estende-se até a altura da margem cranial do rim direito, é um tubo alongado, fortemente pregueado, formando uma sucessão de alças dispostas em “S”. O intestino médio é um tubo liso, bem estreito e quase reto, terminando entre os dois rins. O tubo digestivo se alonga, formando o intestino terminal que termina na cloaca (14).

As serpentes possuem dois ovários e dois ovidutos dispostos assimetricamente (22), sendo o lado direito mais cranial em relação ao esquerdo (14) e estão situados entre a tríade pancreática e os rins (9). O crescimento folicular é influenciado pela sazonalidade. O desenvolvimento folicular em répteis é dividido em fase pré-vitelogênica, onde os folículos apresentam-se pequenos e brancos e a fase vitelogênica, caracterizada por folículos grandes e amarelos por acúmulo de vitelo (21).

Os testículos são intra-abdominais, situados entre a tríade pancreática e os rins e aumentam de tamanho na estação reprodutiva (9). O testículo direito localiza-se mais

cranial em relação ao esquerdo (19). Alguns autores descreveram a presença de epidídimo em serpentes (23,24), porém no estudo realizado por DeNardo (25) esta estrutura não foi observada. Os ductos deferentes ligam os testículos às papilas genitais na cloaca (14). O tamanho dos testículos varia sazonalmente (21).

Os rins das serpentes localizam-se no terço caudal da cavidade celomática, possuem formato linear e são lobulados. O número de lóbulos varia de acordo com a espécie. Localizam-se em alturas diferentes da cavidade, sendo o direito mais cranial (26). O rim direito situa-se entre o final do intestino médio e terminal e o esquerdo, entre a porção cranial do intestino terminal e a cloaca (14). Serpentes não possuem vesícula urinária. Os machos possuem o segmento sexual renal na porção caudal dos rins, que aumentam durante a época reprodutiva (26) e que tem o papel de secretar substâncias que são essenciais na ativação e sobrevivência dos espermatozóides durante a cópula (24).

2.2. TÉCNICA DE EXAME

Para a realização do exame ultrassonográfico em serpentes, alguns itens devem ser levados em consideração para a escolha da técnica adequada, como diferenças anatômicas entre as espécies e tamanho do animal (18). O conhecimento anatômico determina o local onde o transdutor deverá ser acoplado (27). A utilização de um aparelho de alta resolução é recomendado por Silverman (28). Em geral, são utilizados transdutores lineares e a frequência é escolhida de acordo com o tamanho do paciente. As frequências mais usadas em répteis, de acordo com Raiti (27), são de 5,0 e 7,5MHz, as quais penetram tecidos a uma profundidade de 10 e 5 cm, respectivamente. Redrobe e Wilkinson (19) recomendam a utilização de transdutores lineares de 7,5 a 10 MHz. Serpentes com menos de cinco centímetros de diâmetro necessitam de *stand-off*

pad para aumentar a distância entre o transdutor e o animal, proporcionando uma melhor avaliação dos órgãos (27,29). Luvas de procedimento preenchidas por água também podem ser colocadas entre o paciente e o transdutor (19).

O exame ultrassonográfico é um procedimento indolor e a escolha do método de contenção do animal é baseada no tamanho do paciente, temperamento e na sua mobilidade. Frequentemente, o exame em serpentes é realizado somente com contenção física, sem necessidade de sedação, com exceção de animais muito ativos ou agressivos (29). Alguns autores realizaram o exame ultrassonográfico em serpentes somente com a contenção física e obtiveram resultados satisfatórios (16,30,31,32,33,34).

As serpentes não peçonhentas podem ser contidas manualmente. Com o auxílio de um gancho, a cabeça pode ser imobilizada, e em seguida, com os dedos polegar e indicador posicionados lateralmente na parte posterior do osso quadrado ou na mandíbula, a cabeça é contida com uma das mãos. A mão livre deve ser utilizada para segurar o corpo da serpente. Tubos plásticos transparentes de vários tamanhos podem ser usados para a contenção física de serpentes peçonhentas. Estas devem ser manipuladas com o auxílio de profissionais treinados (10,35).

Os animais podem ser posicionados em decúbito ventral ou esternal (17). A janela acústica pode ser obtida através da parede lateral ou da superfície ventral da cavidade celomática (27). Isaza et al. (18) relatam que o acesso ultrassonográfico através da parede lateral da cavidade celomática resultou em uma pobre visibilização das estruturas internas devido aos artefatos de imagem causados pelas costelas.

O gel acústico pode ser aplicado até 5 minutos antes do início do exame (27) ou até 30 minutos (29) para penetrar entre as escamas, diminuindo a interface de ar. A técnica de imersão em água pode ser utilizada em pacientes mais dóceis ou anestesiados

(28). O animal fica parcialmente submerso em água morna com o transdutor posicionado sob a água a uma distância apropriada para a obtenção das imagens (19).

A varredura é feita metodicamente em direção craniocaudal. Todas as estruturas devem ser avaliadas em corte transversais e longitudinais para uma visualização tridimensional dos órgãos em estudo e para identificar possíveis alterações (19,27).

A principal limitação é a experiência do operador em realizar o exame e interpretar as imagens (29). A ecdise (mudança de pele) também pode dificultar a formação de imagem ultrassonográfica (27).

2.3. ANATOMIA ULTRASSONOGRÁFICA

2.3.1. Coração

A ecocardiografia é uma ferramenta eficaz na avaliação dos movimentos das valvas cardíacas, cardiomegalias, identificação de trombos, massas intracardíacas, defeitos estruturais, doenças valvares e efusão pericárdica (36). De acordo com Stetter (29), a presença de discreta quantidade de líquido em região de pericárdio é um achado normal em répteis.

Em serpentes, o coração geralmente localiza-se entre 20 a 33% da distância entre as narinas e a cloaca (29). Devido à mobilidade do coração das serpentes dentro da cavidade celomática, o ultrassonografista deve mover o transdutor alguns centímetros em direção cranial e caudal em relação à posição inicial durante o exame ecocardiográfico (37). Os cortes ultrassonográficos são feitos em eixo longo (corte longitudinal) e em eixo curto (corte transversal), movendo o transdutor da direita para a esquerda e em direção cranial e caudal, respectivamente, para avaliar todas as estruturas cardíacas (39). Os átrios são hipoecogênicos e o miocárdio apresenta uma ecotextura homogênea, discretamente hiperecogênico em relação ao parênquima hepático (16).

A contratilidade cardíaca e a anatomia interna são significativamente diferentes em relação aos mamíferos. A contratilidade ventricular em répteis caracteriza-se por um movimento peristáltico quando comparado à contração concêntrica dos mamíferos. O miocárdio é espesso e irregular, dificultando a realização de medidas (28). Sem a identificação da espécie e valores normais da temperatura do ambiente, a mensuração da espessura das câmaras e alterações na contratilidade são questionáveis (36).

2.3.2. Fígado:

A ultrassonografia é eficaz na identificação de hepatopatias em serpentes. Os critérios adotados para o diagnóstico das doenças hepáticas focais ou difusas são similares aos usados em mamíferos (28). O fígado localiza-se imediatamente caudal ao ápice cardíaco e estende-se até a metade do comprimento total da serpente (27), ocupando grande parte do terço médio direito da cavidade celomática (39). Possui aparência homogênea e é envolvido por uma cápsula hiperecogênica (Figura 1) (27).

O fígado das serpentes possui uma veia hepática central evidente, o que ajuda a diferenciar do tecido gorduroso (29). Ultrassonograficamente, esse vaso é caracterizado como uma estrutura tubular, de paredes ecogênicas e conteúdo anecogênico (27).

2.3.3. Vesícula Biliar

A vesícula biliar de serpentes não está em contato direto com o fígado (29). É caracterizada como uma estrutura anecogênica, envolvida por uma parede fina e ecogênica (Figura 2). De acordo com Stetter (29) e Almeida et al. (16), a vesícula biliar é uma estrutura facilmente localizada na porção média do corpo da serpente, imediatamente caudal ao estômago, servindo de ponto de referência para a localização dos demais órgãos. Porém, no estudo realizado por Neto et al. (39), a vesícula biliar não

foi identificada nos animais avaliados devido à presença de gás excessivo em alças intestinais adjacentes.

2.3.4. Estômago e Alças intestinais

O estômago localiza-se dorsal ao fígado. As alças intestinais estão envolvidas por tecido gorduroso, o que dificulta a sua identificação. O cólon localiza-se próximo aos rins, no terço médio a caudal da cavidade celomática (27).

No estudo realizado por Isaza et al.(18), o estômago foi facilmente identificado, porém, foram obtidas imagens ultrassonográficas de baixa qualidade devido à presença de gás luminal ou adjacente. Matayoshi et al. (33) visibilizaram parcialmente o estômago em alguns animais, e este foi identificado a partir do terço final do fígado, com paredes hipoeecogênicas. Raiti (27) e Redrobe & Wilkinson (19) relatam em seus trabalhos a dificuldade de visibilização ultrassonográfica das alças intestinais, devido à presença de gases, fezes ou conteúdo alimentar em seu lúmen.

2.3.5. Baço e Pâncreas

O baço e o pâncreas (esplenopâncreas) localizam-se imediatamente caudal à vesícula biliar e são dificilmente visibilizados (7,27). O baço caracteriza-se ultrassonograficamente como uma estrutura pequena e circular, discretamente hiperecogênica em relação ao parênquima hepático (19). O pâncreas, quando visibilizado, apresenta-se hipoeecogênico em relação ao baço (16).

2.3.6. Rins

Os rins são dificilmente visibilizados em várias espécies de répteis. Nas

serpentes, eles estão localizados a 75% do comprimento total da cavidade celomática, sendo o direito mais cranial em relação ao esquerdo (29). Os rins estão posicionados dorso-laterais ao cólon (39). Apresentam formato elipsóide, achatados dorso-ventralmente, segmentados, envolvido por uma cápsula fina e hiperecogênica. A região cortical é hiperecogênica em comparação à região medular (Figura 3) (39). Redrobe & Wilkinson (19) descreveram os rins com ecotextura semelhante ao fígado e ecogenicidade uniforme.

2.3.7. Testículos

O exame ultrassonográfico em machos é muito importante para avaliar as condições reprodutivas dos órgãos. Fornece informações sobre o tamanho e desenvolvimento dos testículos, sendo estes, em répteis, dificilmente observados ao exame ultrassonográfico quando inativos (6). Neto et al.(39) obtiveram pobre visibilização das estruturas reprodutivas de serpentes machos por influência da maturidade sexual dos animais em estudo. De acordo com Augusto (6), quando em atividade, o parênquima testicular é granular e de média ecogenicidade (Figura 4).

Os testículos estão localizados caudais à vesícula biliar, sendo o direito mais cranial em relação ao esquerdo e apresentam formato fusiforme (27). Em serpentes maiores o ducto deferente é visibilizado como duas linhas paralelas hiperecogênicas ligadas ao testículo (19).

2.3.8. Ovários e ovidutos

A ultrassonografia ginecológica pode ser utilizada para a avaliação das condições reprodutivas, acompanhamento da foliculogênese, diagnóstico de gestação, previsão da data de parturição, identificação das condições pré-natais (17), sexagem e

identificação da viabilidade fetal em serpentes vivíparas (29). No estágio final da gestação, os fetos são identificados devido à presença do esqueleto hiperecogênico, batimentos cardíacos e movimentos fetais (Figura 5) (27). Os ovários são difíceis de serem visibilizados ultrassonograficamente em fêmeas fora ciclo reprodutivo. Em período reprodutivo os ovários ocupam uma grande extensão da cavidade celomática. Os folículos aparecem como estruturas esféricas, sendo os pré-vitelogênicos hipoeecogênicos (Figura 6) e os folículos vitelogênicos hiperecogênicos (19). Neto et al.(39) descreveram os folículos como estruturas ovóides, anecogênicas ou preenchidas por conteúdo parenquimal misto (anecogênico e hipoeecogênico) devido ao acúmulo de vitelo. As margens dos folículos eram finas, regulares e hiperecogênicas, com aspecto semelhante a um “colar de contas” envolvido por tecido gorduroso.

Os ovidutos aparecem como paredes ecogênicas paralelas com centro hipoeecogênico (30). Em seu estudo com serpentes ovíparas, Smith et al. (41) relataram que os ovos foram caracterizados como estruturas ovais predominantemente hipoeecogênicas, com contornos hiperecogênicos. Foi observado o aumento progressivo da ecogenicidade da superfície dos ovos de acordo com a evolução da gestação.

3. CONCLUSÃO

É uma técnica não invasiva, de baixo custo operacional, que auxilia no diagnóstico clínico de afecções através das alterações das características ultrassonográficas e anatômicas. É uma ferramenta importante no estudo da biologia reprodutiva dos répteis e pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais eficientes para a manutenção e reprodução de ofídios em cativeiro.

REFERÊNCIAS

1. Love K, Love B. Corn Snakes - The Comprehensive Owner's Guide. California: AVS; 2005. p.227.
2. Valente ALS. Diagnostic imaging of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) [tese]. Barcelona: Universidade Autònoma de Barcelona; 2007.
3. Augusto AQ. Ultrasonography in South American Wild Animals. In: Biology, medicine, and surgery of South American Wild Animals. Iowa: Iowa State University Press; 2001. p.536.
4. Hildebrandt TB, Goritz F. Use of ultrasonography in zoo animals. In: Zoo & wild animal medicine. Current Therapy. 4a ed. Philadelphia: Saunders; 1998. p.41-54.
5. Sainsbury AW, Gili C. Ultrasonography anatomy and scanning technique of the coelomic organs of the bosc monitor (*varanus exanthematicus*). J Zoo Wildl Med. 1991; 22(4):421-33.
6. Augusto AQ. Ultra-sonografia. In: Tratado de animais selvagens. São Paulo: Roca; 2007. p. 879-95.
7. Schumacher J, Toal R. Advanced radiography and ultrasonography in reptiles. Semin Avian Exotic Pet Med. 2001;10(4):162-8.
8. Barraviera B, Ferreira Júnior RS. Acidentes por animais peçonhentos. Botucatu: CEVAP-UNESP; 2007. p.110.
9. Kolesnikovas CKM, Grego KF, Albuquerque LCR. Ordem Squamata Subordem Ophidia (Serpente). In: Tratado de animais selvagens. São Paulo: Roca; 2007. p.68- 85.
10. Mithell MA. Snakes. In: Manual of exotic pet practice. Missouri: Saunders; 2009. p. 136-63.
11. Thompson JC. Contributions to the anatomy of the Ophidia. Proc Zoo Soc Lond. 1913;2:414-25.

12. Thompson JC. Further contributions to the anatomy of the Ophidia. *Proc Zool Soc Lond.* 1914;1:379-402.
13. Bragdon DE. A contribution to the surgical anatomy of the water snake, *Natrix sipedon sipedon*; the location of the visceral endocrine organs with reference to ventral scutellation. *Anat Rec.* 1953;117(2):145-61.
14. Gomes N, Puerto G, Buobonato MA, Ribeiro MFM. Atlas Anatômico de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 (Serpentes, Boidae). *Monogr Inst Butantan São Paulo.* 1989;2:1-59.
15. Gabaldo FB, Gonçalves PO, Santos HF, Maso M. Topografia visceral comparadas de serpentes das famílias Viperidae e Colubridae com referência à escutelação ventral. In: *Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET); 2008, Gramado – RS. Gramado; 2008.*
16. Almeida FS, Conte AV, Sant'anna SS, Fernandes W, Grego KF. Localização topográfica e imagem ultrassonográfica dos órgãos internos da jararaca (*Bothrops jararaca*, Serpentes, Viperidae). In: *Anais do XIII Congresso e XIX Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens (ABRAVAS); 2010, Campos do Jordão – SP. Campos do Jordão; 2010.*
17. Jacobson EJ. Snakes. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1993;23(6):1179-213.
18. Isaza R, Ackerman N, Jacobson ER. Ultrasound imaging of the coelomic structures in the *Boa constrictor* (*Boa constrictor*). *Vet Radiol Ultrasound.* 1993;34(6):445-50.
19. Redrobe S, Wilkinson RJ. Reptile and amphibian anatomy and imaging. In: *Manual of exotic pets. 4a ed. Barcelona: Grafos; 2002. p.193-207.*
20. Badeer H. Anatomical position of heart in snakes with vertical orientation: a new hypothesis. *Comp Biochem Physiol.* 1998;119(1):403-5.
21. Jacobson ER. Overview of reptile biology, anatomy and histology. In: *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text. Flórida: CRC Press; 2007. p.1-130.*

22. Almeida-Santos SM, Orsi AM. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. *Rev Bras Reprod Anim.* 2002; 26(2):109-12.
23. Langlada FG, Ferreira ILL. Techniques of artificial insemination in *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae – Crotalinae). *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1994;31(2):141-4.
24. Saint-Girons H. Reproduction and growth. In: *Snakes – a natural history*. New York: Sterling Publishing; 1994. p.92.
25. Denardo D. Reproductive biology. In: *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p. 376-90.
26. Canny C. Gross anatomy and imaging of the avian and reptilian urinary system. *Semin Avian Exotic Pet Med.* 1998;7(2):72-80.
27. Raiti P. Non-invasive imaging. In: *Manual of reptiles*. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA). 2a ed. Cheltenham: Blackwell Publishing; 2004. p. 87-102.
28. Silverman S. Diagnostic imaging. In: *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p.471-89
29. Stetter MD. Ultrasonography. In: *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p.665-74.
30. Chiaraviglio M, Sironi M, Cervantes R, Bertona M, Lucino S. Imagenes de ultrasonido de estruturas reproductivas em *Boa constrictor occidentalis* (serpentes: Boidae). *Gayana Zool.* 1998;62(1):91-5.
31. Betkowski SE. Estudo dos níveis de progesterona e estradiol séricos e acompanhamento das características ultra-sonográficas de ovários e ovidutos de cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*) mantidas em cativeiro, em um período de 12 meses [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2006.
32. Gnudi G, Volta A, Di Ianni F, Bonazzi M, Manfredi F, Bertoni G. Use of

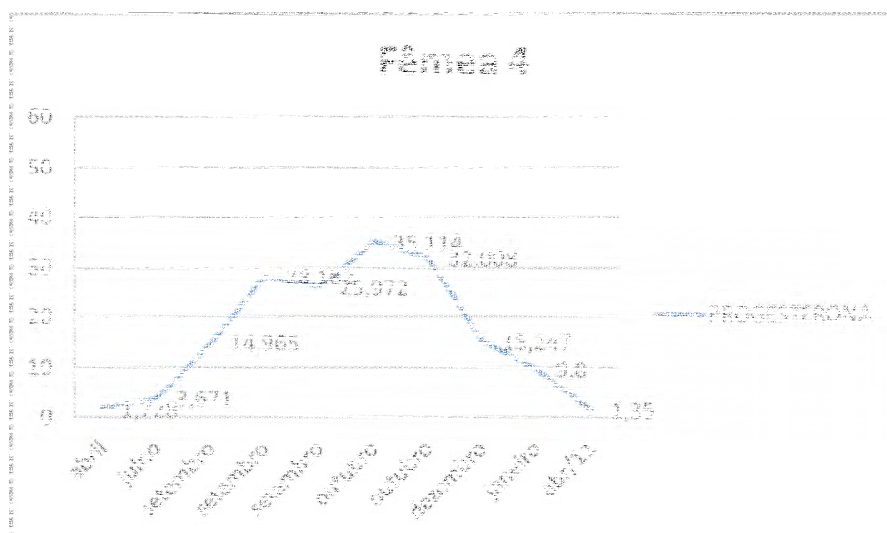
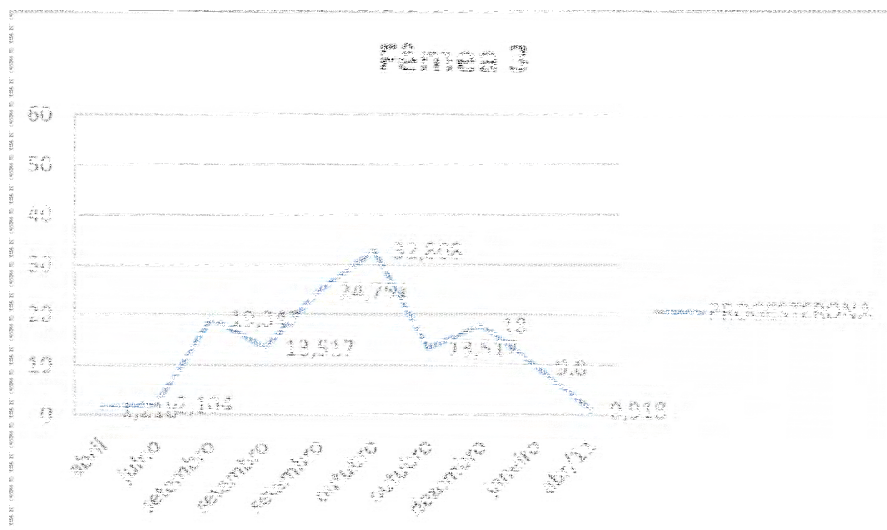
- ultrasonography and contrast radiography for snake gender determination. *Vet Radiol Ultrasound*. 2009;50(3):309–11.
33. Matayoshi PM, Souza PM, Prestes NC, Ferreira Junior RS, Gasparotto VPO, Biscola NP. Avaliação ultrassonográfica hepática de cascavéis (*Caudisona durissa*). In: *Anais do 3º Herpétil*; 2010, Niterói – RJ. Niterói; 2010.
 34. Matayoshi PM, Souza PM, Prestes NC, Ferreira Junior RS. Avaliação ultrassonográfica das estruturas da cavidade celomática da cascavel (*Caudisona durissa*). In: *Anais do 10º Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais – CONPAVEPA*; 2010, São Paulo-SP. São Paulo; 2010.
 35. Grego KF. Ophidia: restraint, anesthesia, medicine. In: *Biology, medicine, and surgery of South American Wild Animals*. Iowa: Iowa State University Press; 2001. p. 536.
 36. Murray MJ. Cardiology. In: *Reptile medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p. 182-95.
 37. Schilliger L, Tessier D, Pouchelon JL, Chetboul V. Proposed Standardization of the two-dimensional echocardiographic examination in snakes. *J Herpetol Med Surg*. 2006;16(3):90-102.
 38. Snyder PS, Shaw NG, Hear DJ. Two-dimensional echocardiographic anatomy of the snake heart (*Python molurus bivittatus*). *Vet Radiol Ultrasound*. 1999;40(1):66-72.
 39. Neto FPCP, Guerra PC, Costa FB, Araújo AVC, Minglino MA, Bombonato PP, et al. Ultra-sonografia do fígado, aparelho renal e reprodutivo da jibóia (*Boa constrictor*). *Pesqui Vet Bras*. 2009;29(4):317-21.
 40. Jacobson ER, Homer B, Adams W. Endocarditis and congestive heart failure in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*). *J Zoo Wildl Med*. 1991;22(2):245-8.
 41. Smith CR, Cartee E, Hathcock JT, Speake DW. Radiographic and ultrasonographic scanning of gravid eastern indigo snakes. *J Herpetol*. 1989;23(4):426-9.

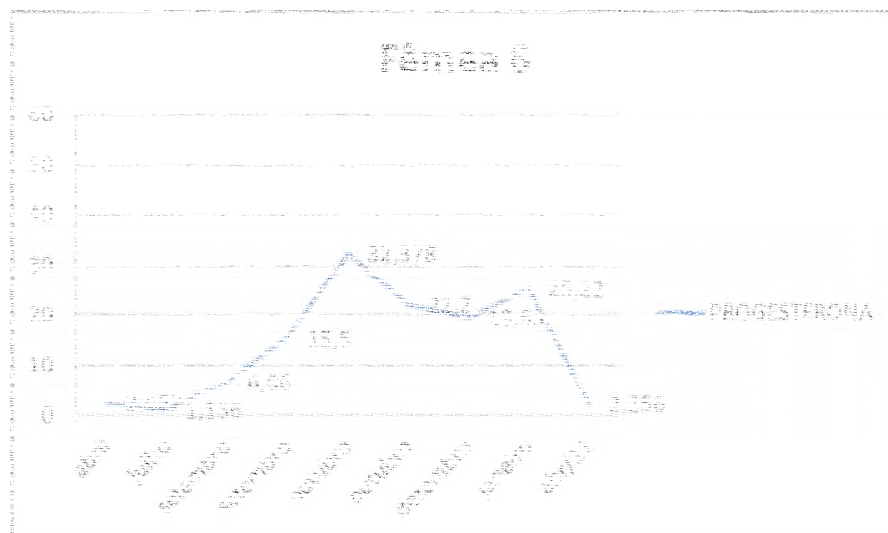
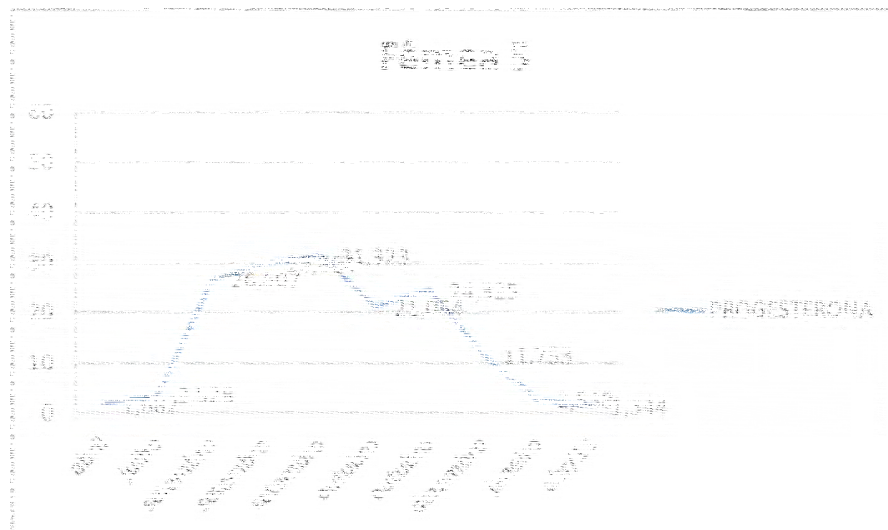
ANEXOS

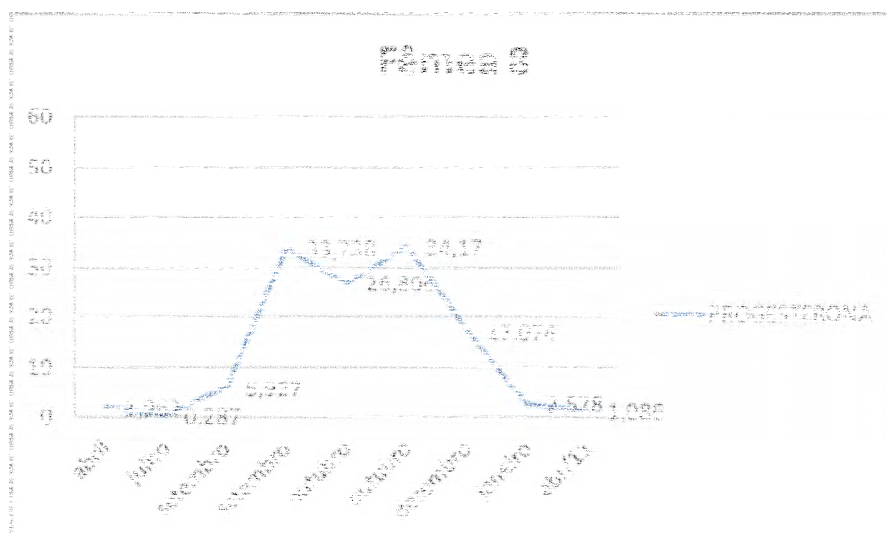
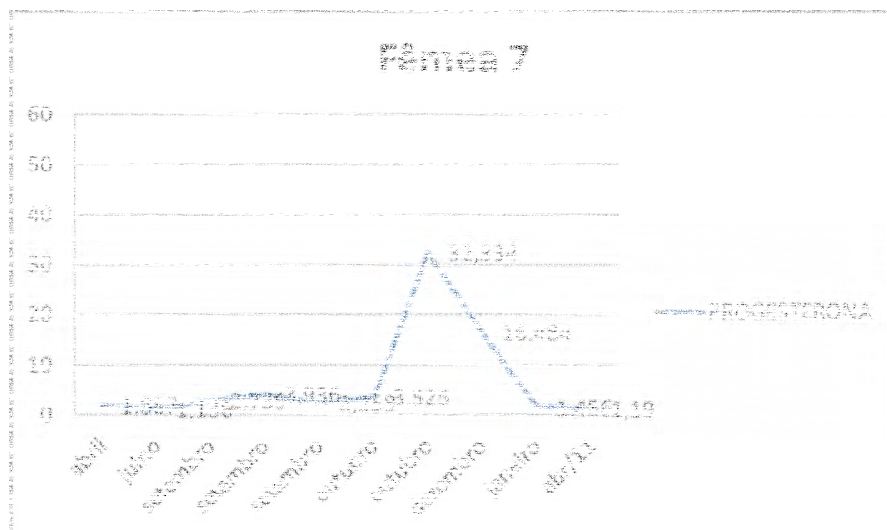
ANEXOS

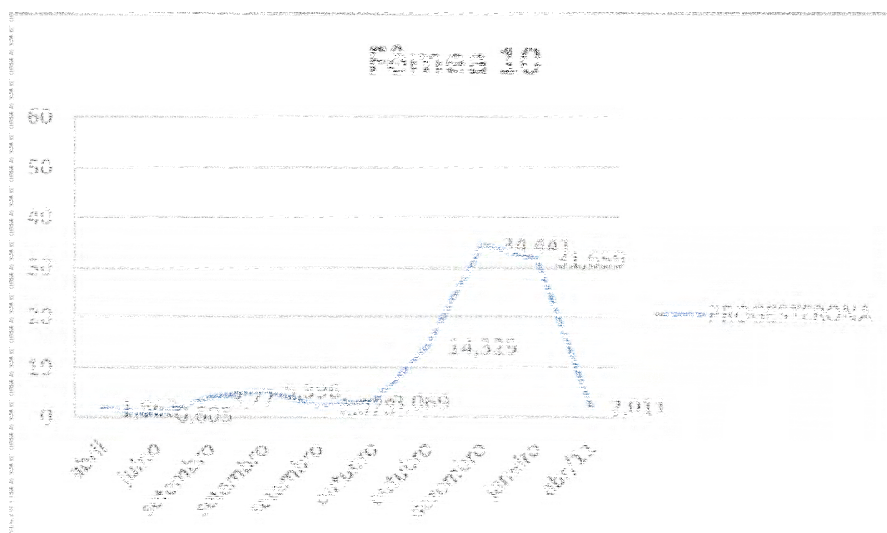
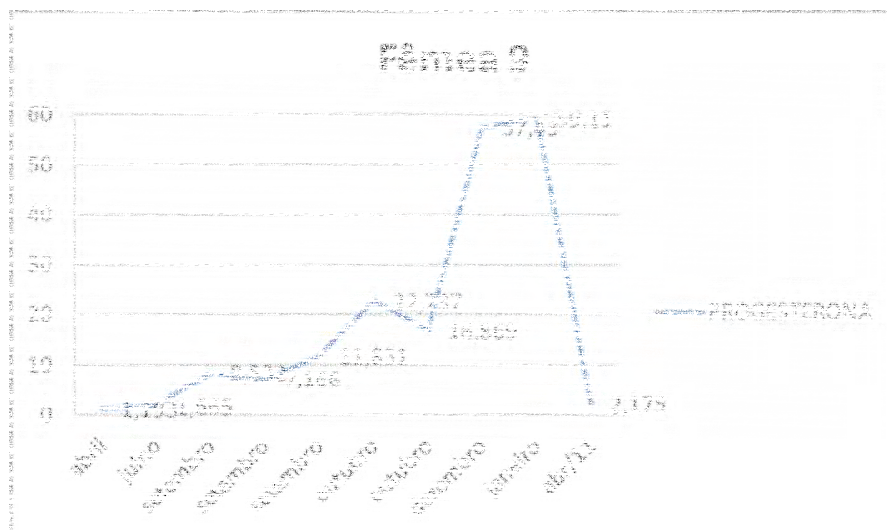
Anexo 1: Dosagem da progesterona sérica de 10 fêmeas de cascavéis (*C.d.t.*) gestantes durante os diferentes meses de avaliação:











Anexo 2: Dosagem da progesterona sérica de 4 fêmeas de cascavéis (*C.d.t.*) não gestantes (fêmeas 11, 12, 13 e 14) durante os diferentes meses de avaliação:

