

Comparação de métodos de sexagem em filhotes de serpentes da espécie *Python brongersmai*

Comparing methods of sex identification in Python brongersmai snakelets

Felipe Sueo de Freitas Suzuki¹, Thaise Paes Fernandes¹, Maicon Alan Paiva dos Santos², Rafael Haddad Manfio¹, Dhiego Gomes Ferreira³, Caroline Apolinário da Silva³

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, Paraná, Brasil

²Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

³Universidade Estadual do Norte do Paraná, Cornélio Procópio, Brasil

Resumo

Com a ascensão de animais exóticos no mercado pet, observou-se a necessidade de maiores estudos nesta área. Este estudo teve como objetivo comparar diferentes métodos de sexagem em filhotes de serpentes da espécie *Python brongersmai* (Bloody Python), sendo utilizados 14 filhotes com aproximadamente 1 ano e 9 meses de vida, oriundos do Criadouro Comercial de Fauna Silvestre e Exótica – CCF, autorização de manejo N° 414064, localizado no município de Cornélio Procópio – PR. Foi utilizado a introdução da probe metálica de sexagem para contagem de escamas, mensurações do Comprimento Rostro-Cloacal (CRC), Comprimento Pós-Cloacal (CPC), Comprimento Total (CT); avaliação ultrassonográfica dos órgãos reprodutivos e perfil genético (DNA), indicando a fidedignidade de cada um. Observou-se uma eficácia de 100% na determinação do sexo através das amostras de DNA, enquanto a sexagem a partir da contagem de escamas via probe metálica e o dimorfismo sexual por mensurações corporais permitiram apenas uma classificação sexual prévia, sofrendo variações quando comparadas, mostrando-se como métodos inconclusivos. Já a ultrassonografia não foi eficaz para o processo de sexagem em serpentes filhotes de até aproximadamente 1 ano e 9 meses de idade da espécie *Python brongersmai*.

Palavras-chave: dimorfismo sexual, silvestres, ultrassonografia, perfil genético.

Abstract

With the increment of exotic animal's trade in the pet business, the necessity of more studies in this area was observed. This study aimed at comparing different methods of sex identification in Python brongersmai snakelets (Bloody Python), using 14 baby snakes aged 1 year and 9 months approximately, from commercial breeding of wild and exotic fauna, situated in Cornélio Procópio – PR. Methods used were the probing technique introduction, measurement of snout-vent length, post-vent length, total length; ultrasound evaluation of reproductive organs and genetic profile exam (DNA samples), denoting the veracity of each one. A 100% efficacy was observed in the study of sexual determination through DNA samples, while the other methods were shown to be inconclusive, whilst the sexing scale count via the probing technique introduction and sexual dimorphism by bodily measurements permitted only a previous sexual classification, suffering variations when compared, showing to be inconclusive methods. The ultrasound evaluation was not efficient for the sexing process in snakelets aged approximately 1 year and 9 months in Python brongersmai.

Keywords: sexual dimorphism, wild animals, ultrasound, genetic profile.

Introdução

A criação de animais silvestres como pet tem crescido significativamente no mercado, principalmente no exterior, ficando atrás somente de cães e gatos (Matayoshi, et al., 2012). A aquisição de serpentes como animais de companhia tem se destacado cada vez mais, relacionando-se muito com a facilidade e simplicidade do manejo. A família Pythonidae se sobressai no comércio pet por possuir diversas espécies que têm se mostrado extremamente delicadas e dóceis em cativeiro, o que permite a interação e manuseio.

*Correspondência: fels.suzuki@gmail.com

Recebido: 26 de setembro de 2021

Aceito: 20 de maio de 2022



A família *Pythonidae* é composta por diversas espécies cujo comprimento pode variar em média nove metros, sendo por sua vez constritoras e ovíparas. São em sua maioria encontradas em climas temperados, principalmente na África subsaariana, Indonésia, Filipinas, Papua Nova Guiné, Austrália. Essas serpentes têm hábitos fossoriais, arborícolas ou terrestres e noturnos (Barker et al., 2015). A espécie *Python brongersmai*, conhecida como *Blood Python* devido a um de seus padrões de coloração, são naturais do sudeste asiático, sendo mais encontradas especificamente na Tailândia, Indonésia e Malásia. Apesar de serem terrestres, são animais que necessitam de recintos com cuba de água em seu interior, pois localizam-se em regiões úmidas e possuem o hábito de ficarem submersas esperando e espreitando suas presas. Em cativeiro, elas podem ser alimentadas com roedores, aves e lagomorfos. Por possuírem diversas linhagens que apresentam comportamento dócil em cativeiro e colorações que interessam os adquirentes, as serpentes da espécie *Python brongersmai* têm se mostrado cada vez mais popular em criadouros comerciais. Na comercialização desses animais a sexagem se torna extremamente relevante, pois com a determinação do sexo há maior facilidade no planejamento reprodutivo para a criação e comércio legal, além de também ser utilizada em investigações forenses e conservação biológica (Tawichasri, 2017).

Geralmente, a determinação sexual dessas serpentes nos criadouros é definida através do dimorfismo sexual, devido sua facilidade e simplicidade. Consiste nas diferenças anatômicas, as quais podem se manifestar de diversas formas, como por exemplo em relação às diferenças nas proporções corporais das serpentes machos e fêmeas, além de apresentarem variações na contagem de escamas percorridas na cauda, através do método de introdução da probe de sexagem. Em relação às dimensões corporais, na maioria das espécies, as fêmeas possuem um corpo maior que dos machos devido a maior capacidade de produção e armazenamento de ovos (Darwin, 1874; Hirst e Kiørboe 2014). Como a perpetuação da espécie depende da capacidade reprodutiva de um animal, fêmeas maiores tendem permanecer pela seleção natural (Darwin, 1874; Shine, 1994). Já os machos, portam caudas mais longas em relação às fêmeas, pelo fato de acomodar o hemipênis e os músculos retratores (King, 1989; Shine et al., 1998). Machos com caudas relativamente mais longas são dominantes ao competir com outras serpentes do mesmo gênero no processo de acasalamento e conseqüentemente, demonstram uma maior capacidade reprodutiva (Emlen et al., 2012; Sivan et al., 2020). Entretanto, o dimorfismo sexual não é evidente nas serpentes em modo geral, dispondo a possibilidade de equívocos na sexagem (Pizzato e Marques, 2007). Além disso, o método de introdução da probe se mostra arriscado, visto que quando realizada erroneamente, é passível de resultar em lesões teciduais nesses animais (Lima et al., 2019), podendo comprometer o trato reprodutivo.

Segundo Matayoshi et al. (2012), na medicina veterinária a ultrassonografia tem se destacado como um método de exame complementar não invasivo, auxiliando para diagnósticos mais específicos tanto dos animais convencionais como para animais silvestres, que associada a outras técnicas pode auxiliar principalmente na área reprodutiva e determinação sexual para controle de espécies ameaçadas de extinção e para o comércio. Entretanto, o uso da ultrassonografia em serpentes é um fator desafiante, principalmente quando o médico veterinário não possui experiência em relação à anatomia topográfica e aos padrões ecográficos dos órgãos reprodutivos a serem avaliados, interferindo na interpretação dos resultados (Banzato et al., 2011).

Outra possibilidade para a sexagem é a realização do perfil genético através da análise laboratorial, a partir da retirada de um fragmento de uma única escama na parte ventral do animal, considerado um método com uma fonte de DNA de alta qualidade (Maigret, 2018). Entretanto, esse método é considerado muito oneroso e de difícil acesso para criadouros comerciais. Durante muitos anos, biólogos acreditavam que todas as espécies de serpentes compartilhavam o mesmo cromossomo sexual ZW. Entretanto, segundo Vicoso et al. (2013), serpentes da espécie *Python* não possuem cromossomos sexuais ZW, e de acordo com Gamble et al. (2017), essa espécie possui cromossomos XY.

Com as diferentes técnicas de sexagem, o objetivo deste estudo foi descrever, avaliar e comparar os diferentes métodos e suas particularidades, a fim de definir o método de maior taxa de sucesso e com menos invasão no manejo desses animais, utilizando filhotes de serpentes da espécie *Python brongersmai*.

Material e Métodos

Declaração do comitê de ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade



Estadual do Norte do Paraná em 30/05/2019, seguindo os princípios éticos de experimentação animal vigentes na legislação Brasileira, sob o número de registro: nº 13/2019.

Animais utilizados e manuseio

Foram utilizados filhotes de serpentes da espécie *Python brongersmai* com aproximadamente 1 ano e 9 meses de vida, oriundos do Criadouro Comercial de Fauna Silvestre e Exótica – CCF, autorização de manejo Nº 414064, localizado no município de Cornélio Procópio – PR. 14 filhotes foram avaliados em etapas, sendo elas: introdução da probe metálica intra-cloacal de sexagem para contagem de escamas; mensurações do Comprimento Rostro-Cloacal (CRC), Comprimento Pós-Cloacal (CPC), Comprimento Total (CT); avaliação ultrassonográfica dos órgãos reprodutivos e perfil genético para o gênero (DNA).

As análises foram realizadas em um animal por vez, iniciada com a retirada da serpente do recinto com o auxílio de um gancho herpetológico, precedendo a utilização de luvas de procedimento e tubos de contenção com a finalidade de minimizar o estresse causado pela manipulação do animal e priorizar a agilidade e segurança. Neste trabalho optou-se pela realização de um método de contenção física, onde consistiu no uso de tubos plásticos adaptados ao tamanho dos animais, seguindo Cubas *et al.* (2014).

Realização da sexagem via probe metálica para contagem de escamas

Após os procedimentos já descritos, as serpentes foram posicionadas dorso-ventralmente apoiadas em mesa de procedimento. Com o uso de vaselina sólida RIOQUÍMICA®, a probe metálica de 0,8 milímetros de espessura foi inserida craniocaudalmente na borda lateral da cloaca e demarcadas as medidas percorridas por ela. Após isso, foi realizada imediatamente a contagem das escamas, utilizando como guia o comprimento da probe percorrida via intra-cloacal (Fig. 1). Por fim, a probe foi higienizada e repetiu-se o procedimento em todos os indivíduos. Foram estabelecidos valores para serpentes machos a partir de 07 escamas percorridas e para serpentes fêmeas abaixo de 06 escamas.



Figura 1. Contagem de escamas pela probe na serpente 1152.

Mensuração do CRC, CPC e CT

As serpentes foram colocadas na posição ventro-dorsal em um recipiente plástico plano e transparente para a mensuração do seu comprimento total (CT), permitindo a visualização da cloaca dos animais. Sobre a superfície externa do recipiente, foi percorrida uma linha com pincel marcador seguindo a posição estacionária do animal, da ponta da cabeça à ponta da cauda (Fig. 2). Posteriormente, foi realizado um alinhamento com o uso de uma fita métrica COATS CORRENTE® e efetuadas as mensurações do comprimento Total das serpentes. Com a serpente ainda no recipiente, a mensuração do Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) foi obtida com o posicionamento da fita métrica no eixo da cabeça a cloaca e para a medida do Comprimento Pós-Cloacal (CPC), foi utilizado um paquímetro MOTOTEM®



da cloaca ao final da cauda (Fig. 3), realizando a contenção física dos animais através da utilização de tubos plásticos.

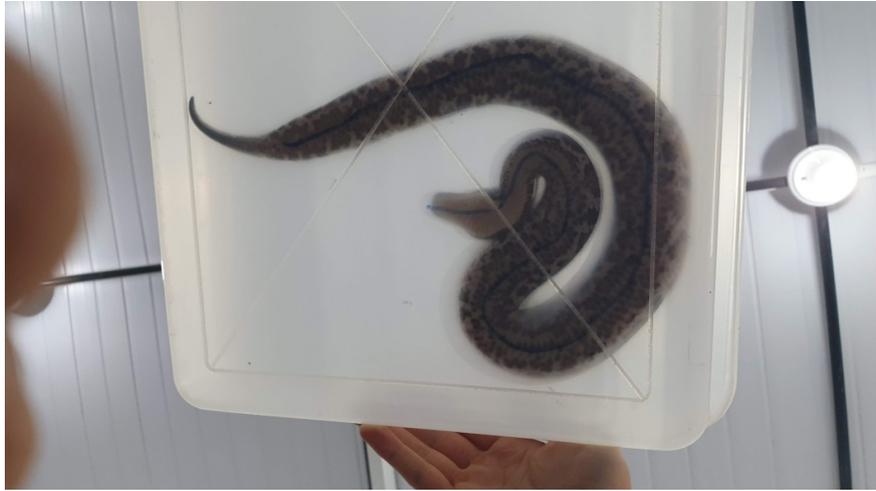


Figura 2. Serpente em recipiente plástico, evidenciando a linha percorrida por pincel marcador.



Figura 3. Medição de CPC, com utilização de paquímetro.

Análise Ultrassonográfica

Os animais foram parcialmente submersos em um recipiente com água morna (27°C) com o intuito de melhorar a acoplagem do transdutor, oferecendo a captação de melhores imagens (Cubas *et al.*, 2014). Foi utilizado o aparelho ultrassonográfico Sonoscape®S6-V-Sonoscape® Medical Corporation, Shnzhen, CHINA, com transdutor linear multifrequencial de 7-12MHz. O transdutor foi posicionado em região ventro-lateral direita e esquerda, iniciando pelo terço cranial da serpente, seguindo com uma ampla varredura da cavidade celomática de forma sistemática em todos os animais, para procura de ovidutos. A vesícula biliar é usada como guia, devido sua caracterização específica anecogênica e por estar cranial aos ovidutos. Foi estabelecido que, a visualização de estrutura compatível com ovidutos, o indivíduo seria classificado como fêmea, e a ausência desta estrutura, como macho.

Perfil Genético

Os animais foram submetidos a uma extração do fragmento da escama com a utilização de uma

pinça dente-de-rato e tesoura cirúrgica, ambas previamente higienizadas com álcool 70%. Após a remoção dos fragmentos, estas foram imediatamente armazenadas em tubos de (1,5 mL) com álcool 70%, os quais foram identificados de acordo com cada serpente e refrigerados para a conservação das amostras.

As amostras foram encaminhadas para análise no Laboratório de Genética da Conservação - GECON, onde o DNA foi extraído a partir de um protocolo utilizando NaCl (Bardakci e Skibinski, 1994) e quantificado a partir da espectrofotometria pelo Nanodrop 2000c UV-Vis THERMO SCIENCE®, sendo as amostras diluídas em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) para 5 ng/μL. As reações de PCR foram realizadas com a utilização de 1 μM dos *primers* M3F e M3R, seguindo o protocolo de Gamble *et al.* (2017). Amplificações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de um trecho específico do cromossomo Y foram conduzidas utilizando o par de primers M3F: 5'-GCTGATTATTCCAGCGGCAT-3' e M3-R: 5'-GGATTCCAAGTCCACAACGG-3', descritos por Gamble *et al.* (2017). As condições de amplificação e as concentrações de reagentes na PCR também foram de acordo com Gamble *et al.* (2017), seguido de avaliação dos produtos da PCR em eletroforese, utilizando gel de agarose 1% e marcador de peso molecular de 100 pares de bases (PB). As imagens das amplificações foram capturadas em câmera digital, permitindo avaliar perfis com presença de banda e ausência de banda, que foram classificados como indivíduos machos e fêmeas para respectivamente (Gamble *et al.*, 2017). Os testes incluíram um controle negativo (sem DNA) e foram realizados em duplicata. Após a realização dos procedimentos citados anteriormente, todos os dados coletados foram tabulados e analisados.

Resultados e Discussão

A partir da realização dos métodos de sexagem citados nesse estudo, os dados obtidos foram tabulados (Tab. 1) e analisados.

A coleta dos fragmentos de escama para a análise do perfil genético seguiu o protocolo de Maigret (2018). Essas análises realizadas indicaram que em 7/14 serpentes ocorreu amplificação dos marcadores genéticos para o sexo masculino, sendo essas classificadas como indivíduos machos, enquanto a outra metade que não apresentou amplificação/formação de bandas, foram classificadas como fêmeas (Fig. 4). Esses dados corroboram com o estudo de Gamble *et al.* (2017), onde foram identificados marcadores genéticos sexo-específicos, com o intuito de serem utilizados para inferir o sistema de cromossomos sexuais de outras espécies de serpentes. Como a ferramenta de análise genética e protocolo utilizados contam com uma fonte de DNA de alta qualidade para a identificação de marcadores genéticos sexo-específicos (Maigret, 2018; Gamble *et al.*, 2017), esse método foi utilizado como padrão de comparação entre as demais técnicas, devido seu resultado efetivo.



Figura 4. Produtos da PCR em eletroforese em gel; 100pb: marcador de peso molecular 100 pares de bases; F: referente a indivíduos fêmeas; M: referente a indivíduos machos; Setas indicam formações de bandas, cujo perfil é relacionado com indivíduos machos.



A sexagem via probe metálica para contagem de escamas foi realizada em conformidade com os estudos de Lima *et al.* (2019), Cubas *et al.* (2014) e Oliveira (2017), a partir da quantidade de escamas percorridas. Indicou-se que 10/14 das serpentes são machos enquanto 4/14 são fêmeas, dados evidenciados na Tabela 1. Foram estabelecidos valores para machos acima de 07 escamas percorridas e para fêmeas abaixo de seis escamas. Relacionando esses dados com os perfis genéticos (DNA) obtidos, a partir de uma análise estatística quantitativa, notou-se uma compatibilidade de 64% entre eles, indicando que o método de sexagem pela contagem de escamas não foi totalmente fidedigno, como no caso da serpente 1147, que foi sexado como macho pela contagem de escamas, porém o perfil genético a indicou como fêmea. Já em relação aos parâmetros corporais, é possível verificar discordância entre o Comprimento Total (CT) e sexagem por análise genética, como por exemplo a serpente 1149, que apresentou o menor CT entre as serpentes utilizadas no estudo, a qual característica de menor comprimento é relacionada a indivíduos machos (Clark, 1966; King, 1989; Klauber, 1943), entretanto foi sexada como fêmea pela análise de DNA.

Tabela 1. Parâmetros de escamas, sexo, CRC, CPC, CT, ovidutos e DNA das serpentes sexadas

Nº Serpente	Escamas	Sexo	CRC (cm)	CPC (cm)	CT (cm)	Ovidutos	DNA
1147	10	M	57	4,6	61,6	-	F
1148	6	F	58,5	5	63,5	-	M
1149	7	M	54	5,5	59,5	-	F
1150	13	M	59	4,6	63,6	-	M
1151	9	M	58	4,5	62,5	-	F
1152	5	F	58	5	63	-	F
1153	7	M	55	5,2	60,2	-	M
1154	10	M	57	5,2	60,2	-	M
1155	10	M	62,5	4,7	67,2	-	F
1156	6	F	56,5	4,7	61,2	-	F
1157	8	M	57,5	5,3	62,8	-	M
1158	10	M	60,5	5,3	65,8	-	M
1159	8	M	61,5	5	66,5	-	M
1168	6	F	58	5,1	63,1	-*	F

CRC: comprimento rostro-cloacal; CPC: comprimento pós-cloacal; CT: comprimento total; Ovidutos referem-se a análise ultrassonográfica; Sexo: referente a contagem de escamas; DNA: refere-se a sexagem por perfil genético *Possível oviduto encontrado (inconclusivo).

Analisando o método de sexagem via probe metálica para contagem de escamas com a conformação corporal das serpentes pode-se perceber que ambas entram em desacordo quando comparadas. Um exemplo é a serpente 1155, que foi sexada como macho pela contagem das escamas, entretanto foi o animal que apresentou o maior comprimento total, contrariando Pizzato e Marques (2007), os quais relatam que serpentes fêmeas são potencialmente maiores que os machos, enquanto machos possuem o tamanho da cauda maior (Clark, 1966; Emlen *et al.*, 2012; King, 1989; Klauber, 1943; Sivan *et al.*, 2020).

Essas divergências podem ter ocorrido devido a utilização de serpentes filhotes neste estudo, pois o crescimento do animal, nessa fase, pode ocorrer de forma dessincronizada. Com o intuito de melhorar acoplagem do transdutor e obter uma melhor captação das imagens, empregou-se a imersão parcial das serpentes em um recipiente com água morna, sendo evidente neste estudo a melhora na qualidade das imagens obtidas, corroborando com os achados de Matayoshi *et al.* (2012) e Cubas *et al.* (2014).

Na maioria das serpentes, o exame ultrassonográfico não comprovou efetivamente a presença de ovidutos. Apenas na 1168 foi possível observar uma imagem sugestiva de oviduto imaturo (Figura 5), que apresentou uma característica análoga a descrição de Matayoshi *et al.* (2012), a qual relata que os ovidutos são visibilizados como paredes ecogênicas paralelas com centro hipocogênico, porém a imagem desse estudo não foi conclusiva. Segundo Lima *et al.* (2019), o início do período reprodutivo em serpentes é chamado de vitelogênese. Neste intervalo, o organismo do animal direciona as reservas energéticas para o desenvolvimento da vitelogênese, sendo a conformação corpórea e maturidade de extrema importância (Denardo, 2006). Logo, a não caracterização dos ovidutos possivelmente deu-se por



conta da idade juvenil dos animais utilizados nesse estudo. De acordo com o estudo de Matayoshi *et al.* (2012), a visibilização dos órgãos reprodutivos é extremamente difícil em serpentes que não estão no período reprodutivo. No estudo de Garcia *et al.* (2015), a avaliação ultrassonográfica dos órgãos reprodutivos foi realizada com sucesso, entretanto, os animais utilizados no experimento eram adultos e com maturidade sexual estabelecida, diferentemente dos animais utilizados nesse trabalho. Ainda, a resolução do aparelho utilizado e a habilidade do operador ultrassonográfico podem ter refletido nos achados ultrassonográficos para a análise do trato reprodutivo das serpentes utilizadas.

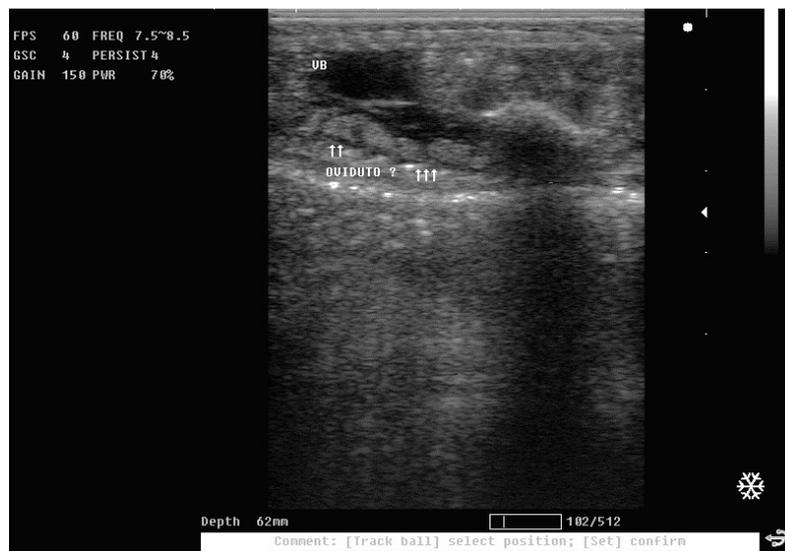


Figura 5. Imagem ultrassonográfica evidenciando a vesícula biliar (VB) e um possível oviduto (inconclusivo)

Conclusões

A análise do perfil genético (DNA) é uma ferramenta que se mostrou eficaz para a sexagem, sendo essa técnica mais onerosa e invasiva dentre as demais, contudo fidedigna. A sexagem a partir da contagem de escamas via probe metálica e o dimorfismo sexual por parâmetros corporais, permitem uma classificação sexual prévia, enquanto o exame ultrassonográfico não se mostrou uma ferramenta eficaz para o processo de sexagem em serpentes filhotes de até aproximadamente 1 ano e 9 meses de idade da espécie *Python brongersmai*. A associação dos métodos de sexagem deve ser considerada no processo, além de uma análise holística dos indivíduos, possibilitando maior probabilidade de êxito para as demais técnicas não genéticas, bem como utilização de métodos que envolvam exames de imagem avançados com maior acurácia e sensibilidade.

Referências

- Andrade RS.** Parâmetros corporais e morfometria ultrassonográfica de órgãos da cavidade celomática de jiboias. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia - PPGSPA) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.
- Bardakci F, Skibinski DOF.** Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, v.73, p.117-123, 1994.
- Barker DG, Barker TM, Davis MA, Schuett GW.** A review of the systematics and taxonomy of Pythonidae: an ancient serpent lineage. *Zoo J Linn Soc*, v.175, p.1-19, 2015.
- Banzato T, Russo E, Finotti L, Milan MC, Giansella M, Zotti A.** Ultrasonographic anatomy of the coelomic organs of boid snakes (*Boa constrictor imperator*, *Python regius*, *Python molurus molurus*, and *Python curtus*). *Am J Vet Res*, v.73, p.634-645, 2012.
- Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL.** Tratado de animais silvestres: medicina veterinária, 2.ed. São Paulo: Roca, 2014. 2470p.



- Darwin CR.** The descent of man, and selection in relation to sex. 2 ed. New York: Appletown. 1874, p.668.
- Denardo D.** Reproductive biology. In: Reptile Medicine and Surgery, 2nd edition; DR Mader (ed). Saunders, Missouri. p.376-390, 2006.
- Emlen DJ, Warren IA, Johns A, Dworkin I, Lavine LC.** A mechanism of extreme growth and reliable signaling in sexually selected ornaments and weapons. *Science*, p.860–864, 2012.
- Gamble T, Castoe TA, Nielsen SV, Schield DR, Schuett GW, Booth W.** The discovery of XY sex chromosomes in a Boa and Python. *Curr Biol*, v.27, p.2148–2153, 2017.
- Garcia VC, Vac MH, Badiglian L, Almeida-Santos SM.** Avaliação ultrassonográfica do aparelho reprodutor em serpentes vivíparas da família Boidae. *Pesq Vet Bras*, v.35, n.3, p.311-318, 2015.
- Hirst AG, Kjørboe T.** Macroevolutionary patterns of sexual size dimorphism in copepods. *Proc R Soc B* 281: 20140739, 2014.
- King RB.** Sexual dimorphism in snake tail length: sexual selection, natural selection, or morphological constraint? *Biol J Linn Soc*, v.38, p.133-154, 1989.
- Lima TO, Saldanha A, Myller G, Eleuterio NF, Almeida EC.** Manejo reprodutivo de jiboias e outros boídeos criados em cativeiro. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, n.2, p.276-283, 2019.
- Maigret TA.** Snake scale clips as a source of high-quality DNA suitable for RAD sequencing. *Cons Gen Res*, v.11, p. 373-375, 2019.
- Matayoshi PM, Souza PM, Júnior RSF, Prestes NC, Santos RB.** Avaliação ultrassonográfica da cavidade celomática de Serpentes. *Vet Zoot*, v.19, n.1, p.448-459, 2012.
- Pizzato L, Marques OAV.** Reproductive ecology of boine snakes with emphasis on brazilian species and a comparison to pythons. *S Am J Herpetol*, v.2, p.107-122, 2007.
- Sivan J, Hadad, S, Tesler, I, Rosenstrauch, A, Degen, AA, Kam, M.** Relative tail length correlates with body condition in male but not in female crowned leafnose snakes (*Lytorhynchus diadema*). *Sci Rep*, v.10, p.4130, 2020.
- Shine R, Olsson MM, Moore IT, LeMaster MP, Mason RT.** Why do male snakes have longer tails than females? *Proc Royal Soc B*, v.266, p.2147–2151, 1999.
- Tawichasri P, Laopichienpong N, Chanhome L, Phatcharakullawarawat R, Singchat W, Koomgun T, Prasongmaneerut T, Rerkamnuaychoke W, Sillapaprayoon S, Muangmai N, Suntrarachun S, Baicharoen S, Peyachoknagul S, Srikulnath K.** Using blood and non-invasive shed skin samples to identify sex of caenophidian snakes based on multiplex PCR assay. *Zool Anz*, v.271, p.6-14, 2017.
- Vicoco B, Emerson JJ, Zekster Y, Mahajan S, Bachtrog D.** Comparative sex chromosome genomics in snakes: differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation. *Plos Biol*, v.11, n.8, e1001643. 2013.
-