

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Influência Do Jejum Na Modulação Da Microbiota Cloacal De *Crotalus durissus* De Diferentes Escore Corporais

FERNANDA DE CÁSSIA GONÇALVES ALVES

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Março 2019

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Influência Do Jejum Na Modulação Da Microbiota Cloacal De *Crotalus durissus* De Difentes Escore Corporais

Autora: Fernanda de Cássia Gonçalves Alves
Orientadora: Dr^a Alinne Pereira de Castro
Co-Orientadora: Dr^a Paula Helena Santa Rita

"Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – Área de concentração: Biotecnologia"

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Março 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Universidade Católica Dom Bosco - UCDB, Campo Grande-MS
Bibliotecária Mourâmise de Moura Viana - CRB-1 497

A474i Alves, Fernanda de Cássia Gonçalves
Influência do jejum na modulação da microbiota coacial
de crotalus durissus de diferentes escore corporais/
Fernanda de Cássia Gonçalves Alves; orientadora Prof.^a
Dr.^a Alinne Pereira de Castro.-- Campo Grande, MS
: 2019.
70 p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS, 2019
Bibliografia: p. 55 a 66

1. Biotecnologia. 2. Serpentes - Nutrição - Biotecnologia.
I.Castro, Alinne Pereira. II. Título.

CDD: Ed. 21 -- 660.6

Influência do Jejum na Modulação da Microbiota Cloacal de *Croesus durissus* com diferentes escore corporais

Autora: Fernanda de Cássia Gonçalves Alves

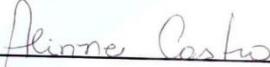
Orientador: Prof. Dra. Alinne Pereira de Castro

Coorientadora: Profa. Dra. Paula Helena Santa Rita

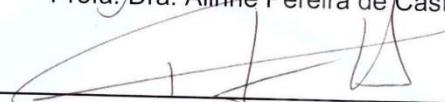
TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

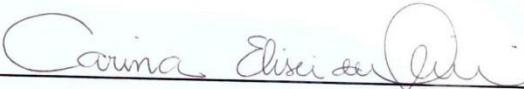
APROVADA em 14 de março de 2019.



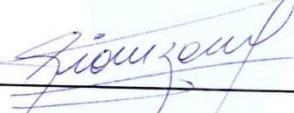
Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro - UCDB



Profa. Dra. Paula Helena Santa Rita - UCDB



Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB



Prof. Dr. Ubiratan Piovezan - EMBRAPA

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

(Johann Goethe)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelas oportunidades, pelas boas pessoas que colocou em meu caminho, pela proteção e a permissão para ter chegado até aqui.

A minha família, minha mãe Lucilene, meu padrasto Marinaldo e minha irmã Marina, por todo apoio emocional, psicológico e financeiro, acreditando e confiando em meu potencial.

Aos mestres que além de me ensinarem, se tornaram grandes amigos que levo no coração, Jania de Rezende a quem muito devo, pois me deu as primeiras oportunidades para crescer cientificamente e portanto me abriu muitas portas; minha coorientadora Paula Helena Santa Rita que me proporcionou uma das oportunidades mais importantes pro meu crescimento pessoal e profissional; a professora Alinne Pereira de Castro, querida orientadora deste trabalho que me aceitou de braços abertos em seu grupo de pesquisa, aceitou minhas ideias e ainda me ensinou muito.

Aos amigos verdadeiros que fiz neste período, Natalí Camposano, Thaís Maryelle, Luccas Pires, Marcos Morales e Luciane Perez, estes que foram mais que colegas de estudo, tornaram-se minha família; e em especial Luiz Humberto, que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis desde a graduação e da vida, me apoiando e incentivando.

Agradeço também a todos os meus professores durante esta jornada, me ajudando a construir minha formação sendo cordiais, acessíveis e passando todo o conhecimento adquirido, deixando e me marcando com um pouco si.

E por fim aos professores Carina Elisei e Ubiratan Piovezan , profissionais admiráveis, pela disponibilidade sem hesitar de estarem presentes em um dia tão importante para o fechamento deste ciclo.

BIOGRAFIA

Fernanda de Cássia Gonçaves Alves, filha de Lucilene Gonçalves e Nelson Roberto Alves, nasceu em 2 de setembro de 1987 em Cubatão, no Estado de São Paulo. Graduada no ano de 2009 em Tecnologia de Gestão em Logística pela Universidade de Sorocaba e em Ciências Biológicas (Bacharelado), no ano de 2016 pela Universidade Católica Dom Bosco. Tem experiência na área de manejo de animais de laboratório (ratos e camundongos) e manejo de serpentes em cativeiro. Atuou em plano de trabalho de iniciação científica de cultura primária de células embrionárias de carapato *Rhipicephalus microplus*, voltada para a detecção molecular de *Borrelia* sp. Durante o mestrado, que resultou nesta dissertação, trabalhou com caracterização da microbiota de serpente *Crotalus durissus* cativas utilizando DNA metagenômico em serpentes com diferentes escore corporais no Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Crotalus durissus</i>	17
2.2 Serpentes em Cativeiro	19
2.3 Gene 16S rDNA.....	22
2.4 Microbiota intestinal	23
2.5 Abordagem metagenômica aplicada à microbiota intestinal de serpentes	25
3. OBJETIVOS.	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Aspectos Legais	27
4.2 Seleção dos animais.....	28
4.3 Coleta das amostras.....	30
4.4 Extração direta de DNA	32
4.5 Sequenciamento de DNA seguido por Análise de Bioinformática	33

4.7 Análise Estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Seleção dos animais.....	35
5.2 Extração direta de DNA.....	40
5.3 Quantificação de DNA	40
5.3 Amplificação do gene 16S rDNA	41
5.4 Análise Geral do Sequenciamento de DNA.....	41
5.5 Análise da Composição da Comunidade Bacteriana.....	42
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	56
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	57
9. REFERÊNCIAS	58
ANEXO.....	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Serpente da espécie <i>Crotalus durissus</i> , popularmente conhecida como cascavel, tendo como característica marcante o guizo na extremidade da cauda (Fonte: Fernanda Alves).....	18
Figura 2. Sala de manutenção de serpentes em cativeiro intensivo do Biotério da UCDB (A). Caixa de polipropileno onde são mantidas as serpentes (B e C). (Foto: Fernanda Alves)	20
Figura 3. Vértebra de serpente indicando processos espinhoso e transverso que são avaliados por palpação nas categorias de vista superior e vista lateral, respectivamente (A) (Foto: Fernanda Alves). Cortes transversais do formato do corpo de serpentes que devem ser considerados ao avaliar a condição corporal (Fonte: MOSMANN, 2001)	28
Figura 4. Porção final de serpente Magra, afilada com pouca musculatura, mais perceptível ao toque (A). Cauda de serpente considerada como Normal, com afilamento uniforme (B). Cauda de serpente Obesa, com afilamento abrupto (C) (Foto: Fernanda Alves)	30
Figura 5. Osso quadrado/ pescoço de serpentes Magra (A e E); Normal (B); e obesa (C e D);.....	30
Figura 6. Seleção das serpentes <i>Crotalus durissus</i> utilizando a tabela de escore da condição corporal desenvolvida neste estudo, resultando em três grupos com n de três indivíduos em cada, as quais foram mantidas em jejum por 50 dias, após sete dias da alimentação ocorreu a coleta do tempo zero, seguida da coleta do tempo 50, após o jejum.....	32
Figura 7. Coleta da amostra da cavidade cloacal de <i>Crotalus durissus</i> . (Foto: Luiz H.G. R.Junior)	32
Figura 8. Serpentes selecionadas para o grupo “Obesas” utilizando classificação de escore da condição corporal. (Foto: Fernanda Alves).....	36
Figura 9. Serpentes selecionadas para o grupo “Normais” utilizando classificação de escore da condição corporal. (Foto: Fernanda Alves).....	37
Figura 10. Serpentes selecionadas para o grupo “Magras” utilizando classificação de escore da condição corporal. (Foto: Fernanda Alves).....	38
Figura 11. Gel de agarose (1%) do produto bruto da extração mostrando a presença de DNA em todas as amostras coletadas da cavidade cloacal. (M1) Marcador 1kb Plus Ladder; (1,2,3=T0 e 10,11,12=T50) amostras coletadas das serpentes do grupo “Obesas”; (4,5,6=T0 e 13,14,15=T50) amostras coletadas do grupo “Normais”; (7,8,9=T0 e 16,17,18=T50) amostras coletadas do grupo “Magras”	40
Figura 12. Gel de agarose 2% do produto da PCR, mostrando a amplificação do gene 16S Rdna. (M1) Marcador 1kb Plus Ladder; (1,2,3=T0 e 10,11,12=T50) amostras coletadas das serpentes do grupo “Obesas”; (4,5,6=T0 e 13,14,15=T50) amostras coletadas do grupo “Normais”; (7,8,9=T0 e 16,17,18=T50) amostras coletadas do grupo “Magras”	41
Figura 13. Gráfico da análise de abundância relativa de filos bacterianos da microbiota	

X	
cloacal de <i>Crotalus durissus</i> de escore corporais diferentes.....	42
Figura 14. Diagrama de Venn representando, no centro e em sobreposição das figuras, o número de OTU's compartilhados entre os grupos experimentais e, nas extremidades, os OTU's que são exclusivos de cada grupo. (A) Antes do jejum; (B) Após o jejum prolongado.....	44
Figura 15. Alfa diversidade da microbiota cloacal de <i>Crotalus durissus</i> analisando os grupos experimentais em relação ao tratamento de jejum.....	45
Figura 16. Curva de rarefação estimando número de OTU's observadas comparando os grupos antes e após o jejum.....	45
Figura 17. Gráfico espacial de Analise de Componentes Principais (PCA) utilizando matriz de distância Weighted UniFrac, mensurando a distância de cada amostra dentro do seu grupo e entre os grupos experimentais	46
Figura 18. Análise de Variância (ANOVA), utilizando método de Tukey-Kramer de múltiplas comparações, com correção de Bonferroni ($p>0,05$) (com cobertura nominal de 99%)	47
Figura 19. Resultado da análise do LefSe com grau de diferença na abundância relativa. Histogramas LDA mostrando os táxons que dentre todos identificados representam as maiores diferenças estatísticas entre as comunidades e que as tornam como fenótipos de diferenciação da condição avaliada, neste estudo o jejum de 50 dias. Os cladogramas mostram os biomarcadores encontrados em que o diâmetro de cada nó é proporcional a abundância do táxon, além de terem contribuição significativa dentro do grupo a que está inserido. (A) Comparação de serpentes Normais (antes e após o jejum), mostrando os grupos diferenciais no LDA e 12 biomarcadores no cladograma com abundância diferencial. (B) Comparação de serpentes magras, no LDA os grupos diferenciais e oito biomarcadores.Resultado da análise do LefSe com grau de diferença na abundância relativa. Histogramas LDA mostrando os táxons que dentre todos identificados representam as maiores diferenças estatísticas entre as comunidades e que as tornam como fenótipos de.....	48
Figura 20. O gráfico a esquerda é a abundância dos filos mostrando significância entre a variação dos grupos, onde as barras representam as proporções médias de cada um. O gráfico do centro mostra o intervalo de confiança entre a diferença de proporção dos grupos analisados, assim o círculo representa o valor médio, a linha a esquerda representa o limite inferior e a direita, o limite superior. Os valores a direita do gráfico são p-value do teste de significância.....	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Concentração das amostras em ng/uL, quantificadas via Qubit® (Life tecnologies) após extração direta de DNA utilizando kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen). Os valores das concentrações seguem a mesma disposição das amostras aplicadas em gel de agarose 0,8 (Figura 11).....	40
Tabela 2. Número de sequências de DNA e OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) observados por amostra.....	41
Tabela 3. Porcentagem de abundância relativa dos filos mais representativos dos grupos experimentais.....	43

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Tabela desenvolvida neste estudo para avaliação de escore da condição corporal, possibilitando a classificação de serpentes da espécie <i>Crotalus durissus</i> entre seis grupos.....	39

RESUMO

Serpentes cativas podem enfrentar consequências do desequilíbrio nutricional que pode ser proveniente da alteração de apetite, digestão, assimilação dos nutrientes e até mesmo um manejo alimentar inadequado, desenvolvendo distúrbios como hipervitaminose, hipovitaminose, caquexia e obesidade. Diversas pesquisas têm tentado ir além de fatores externos e exploram a influência e contribuição da microbiota intestinal com as alterações na fisiologia normal, bem como no surgimento de doenças em seus hospedeiros. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi, primeiramente, desenvolver um protocolo de classificação por escore da condição corporal para serpentes *Crotalus durissus*, afim de separar os grupos experimentais em: magros, normais e obesos. Após a seleção das serpentes, a composição e diversidade da comunidade bacteriana associada à cavidade cloacal de *Crotalus durissus*, sob o efeito do manejo alimentar (50 dias de jejum) foi avaliada através do gene 16S r DNA a partir de “swab” com amostras da cavidade cloacal de três serpentes de cada grupo (n=9) durante 2 períodos: antes do jejum (Tempo 0) e coleta após 50 dias de jejum (Tempo 50). Após extração com kit DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen), sequenciamento de DNA e aplicação das ferramentas de bioinformática as amostras demonstraram redução no número de OTUs após o jejum prolongado. Em relação a abundância relativa dos filos pode-se observar que houve dominância dos filos Proteobacteria e Bacteroidetes para as amostras referentes antes do jejum, em contrapartida, houve alterações na proporção dos filos bacterianos, com redução da abundância relativa de Proteobacteria e aumento de Bacteroidetes nos grupos experimentais normais e magras após o jejum prolongado. As amostras demonstraram maior proximidade nas análises de PCA e análise de variância quando se levou em consideração o tempo de jejum prolongado do que quando comparadas por escore corporal. Este estudo fornece dados que permitem mudanças no manejo alimentar e manutenção de *Crotalus durissus* em cativeiro. É importante ressaltar que, o estudo proposto fornecerá a primeira análise simultânea de alfa e beta diversidade em comunidades bacterianas, presentes em amostras associada à cavidade cloacal de *Crotalus durissus* com escore corporais diferentes, frente a um período prolongado de jejum por meio de análises metagenômicas.

PALAVRAS-CHAVE: Escore da Condição Corporal. Gene 16S rDNA. *Crotalus durissus*.

ABSTRACT

Captive snakes may face consequences of nutritional imbalance that may come from altered appetite, digestion, assimilation of nutrients and even inadequate food management, developing disorders such as hypervitaminosis, hypovitaminosis, cachexia and obesity. Several researches have tried to go beyond external factors and explore the influence and contribution of the gut microbiome with changes in normal physiology as well as the emergence of diseases in their hosts. In this sense, the objective of this study was firstly to develop a body condition score protocol for *Crotalus durissus* snakes, in order to separate the experimental groups in: lean, normal and obese. After selection of the snakes, the composition and diversity of the bacterial community associated with the cloacal cavity of *Crotalus durissus*, under the effect of food management (50 days of fasting) was evaluated through the 16S rDNA gene from swabs with cloacal cavity of three snakes of each group ($n = 9$) during 2 periods: before the fast (Time 0) and after 50 days of fasting (Time 50). After extraction with DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen), sequencing and application of bioinformatics tools, the samples demonstrated a reduction in the OTU's number after fasting, dominance of the phylum Proteobacteria and Bacteroidetes before fasting, with changes in the phylum proportion, reduction of Proteobacteria and increase of Bacteroidetes in normal and lean experimental groups after prolonged fasting. The samples showed greater proximity in PCA analyzes and ANOVA, when taken into account the prolonged fasting time than when compared by body score. This study may provide a tool for changes in feeding management and maintenance of *Crotalus durissus* in captivity. It is important to emphasize that the proposed study will provide the first simultaneous analysis of alpha and beta diversity in bacterial communities, present in samples associated with the cloacal cavity of *Crotalus durissus* with different body score, against a prolonged period of fasting through metagenomic analyzes.

KEYWORDS: 16S rDNA gene. Body Condition Score. *Crotalus durissus*.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil são descritas 405 espécies de serpentes, agrupadas em onze famílias (BÉRNILS; COSTA, 2018), porém o grupo de maior importância para a saúde pública, protagonizando a maioria dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, são as espécies da família Viperidae (Jararacas, Cascavéis e Surucucus) (SINAN, 2018). Este grupo é também o de maior interesse para manutenção em cativeiro, tanto por conservação quanto por bioprospecção do veneno (BARRVIEIRA, 1999).

A defesa contra o ofidismo foi o que motivou o início da manutenção das serpentes peçonhentas em cativeiro, no Instituto Butantan em 1901, quando Vital Brazil, após perceber a especificidade do veneno de cada espécie de serpente, praticava a permuta de serpentes por ampolas do soro anti-ofídico, desta maneira salvando vidas ao oferecer tratamento aos acidentes ofídicos e mantendo ao seu alcance os animais que forneciam a matéria prima para seu trabalho (TANASOV, 2003)

Em cativeiros existem duas modalidades de criação e manutenção: cativeiro semi-extensivo e intensivo. O primeiro permite que os animais sejam mantidos em um *solarium* (viveiro), ou seja, vários animais de mesma espécie são acondicionados em espaços amplos com enriquecimento ambiental baseado em estudos de ecologia e biologia de cada espécie. Diferentemente, o cativeiro intensivo, permite criar um grande número de indivíduos de espécies distintas em um espaço reduzido, por serem acondicionados individualmente, esta modalidade tem maior custo, porém proporciona maior controle de monitoramento ambiental, higiênico, alimentar e de reprodução. (MELGAREJO-GIMENÉZ, 2002; PAIVA, 2015)

A manutenção de um serpentário envolve desde a captura e recebimento de animais de diferentes regiões, o que inclui custo elevado para a climatização das salas de manutenção, técnicas de manejo adequado e profissional especializado (SERAPICOS et al., 2005; PAIVA, 2015; SANTA-RITA, 2018). A mortalidade dos animais cativos é inevitável e pode estar associada a imunossupressão, diante do

estresse causado pelas dificuldades em aclimatar-se ao novo ambiente, levando ainda à instalação de uma série de infecções associadas com a higiene, e podem ser causadas por doenças bacterianas, virais, fúngicas e por protozoários tornando o prolongamento da sobrevida do plantel um grande desafio (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2015; PAIVA, 2015).

Além disso, os animais cativeiros podem enfrentar ainda as consequências do desequilíbrio nutricional que pode ser proveniente da alteração de apetite, digestão, assimilação dos nutrientes e até mesmo um manejo alimentar inadequado (FRYE, 1991; SCOTT, 1992). Estes fatores, aliados à limitação desses animais a um microambiente podem levar a um quadro de obesidade ou caquexia. (MELGAREJO-GIMENÉZ, 2002).

Neste sentido, acredita-se que a composição da microbiota intestinal, ou seja, a comunidade de microrganismos associadas ao intestino, exerçam influência na fisiologia normal assim como podem contribuir para o surgimento de doenças em seus hospedeiros. Dessa maneira, a microbiota intestinal tem sido alvo de pesquisas em humanos desde o século XIV, no qual vem se desvendando a importância dos microrganismos colonizadores do trato gastrointestinal, ressaltando que Louis Pasteur em 1885 já havia salientado a importância das bactérias na digestão, afirmado ainda que a vida seria impossível com a ausência da microbiota (TANNOCK, 2005).

O papel destes microrganismos podem ser melhores compreendidos devido aos avanços das tecnologias e das ciências ômicas, como a metagenômica (análise do genoma de comunidades de microrganismos extraída diretamente de amostras ambientais), metatranscriptômica (análise de padrões de expressão gênica de uma comunidade microbiana através do RNA) ou metaproteômica (estudo das proteínas extraídas diretamente de fontes ambientais), que torna possível a caracterização da composição e diversidade bacteriana da microbiota intestinal e como a mesma pode afetar hospedeiros saudáveis ou doentes (DETHLEFSEN et al., 2006; CLEMENTE et al., 2012; MARTIN et al. 2014; BOURSIER et al., 2016), associando ainda alterações imunológicas (SHUKLA, 2017), diabetes (BRUNKWALL e ORHO-MELANDER, 2017) e aumento de tecido adiposo (BACKHED et al., 2004).

Embora estudos relacionados a microbiota intestinal tenham tido notáveis avanços e resultados em diversos grupos animais (WAITE; TAYLOR, 2015; COLSTON et al., 2015; GARDAJO et al., 2016; JIANG et al., 2017; ABARCA et al., 2018), é importante destacar que a maioria tem sido direcionada a hospedeiros mamíferos. De modo que estes modelos experimentais podem desenvolver ou ser induzidos a fisiopatologias ou morbidades, facilitando sua aplicação à saúde humana (WATANABE et al., 2014).

O presente estudo fornece uma análise da composição e diversidade da comunidade bacteriana associada à cavidade cloacal de *Crotalus durissus* (Cascavel), sob o efeito do manejo alimentar e escore corporal das serpentes em cativeiro através de análises metagenômicas. Neste sentido, o sequenciamento em larga escala de DNA metagenômico de comunidade bacteriana associada à cavidade cloacal de *Crotalus durissus* permite o conhecimento sobre a diversidade, abundância e mudança destas comunidades frente a um período prolongado de jejum.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Crotalus durissus*

Atualmente são conhecidas 47 espécies de serpentes para o gênero *Crotalus*, e sua maior diversidade encontra-se no México e Estados Unidos (UETZ et al., 2012). Este grupo também é conhecido pela grande variabilidade morfológica e no padrão de coloração (CAMPBELL e LAMAR, 2004), que podem ainda estar associados com o clima e ambiente onde estão inseridas, como relatado por Aston (2001) onde observou que na região ocidental da América do Norte, indivíduos da espécie *Crotalus viridis* possuíam comprimentos rostro-cloacais menores onde as temperaturas eram mais baixas e com estações bem delimitadas. Da mesma forma Allstead e colaboradores (2006) perceberam que haviam padrões de colorações diferentes para *C. horridus* entre as regiões Norte e Sul dos Estados Unidos, pois são mais escuras na região Norte, neste caso atribuíram estas alterações a altitude e temperaturas

A espécie *Crotalus durissus* restringe-se a América do Sul e divide-se em seis subespécies: *Crotalus durissus cascadella*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus dryinas*, *Crotalus durissus marajoensis*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus*

durissus terrificus (BÉRNILS e COSTA, 2015). Tem distribuição no Brasil, Uruguai, norte da Argentina, Paraguai, Peru e Bolívia (UETZ, 2012). No Brasil ocorre em praticamente todos os Estados. De acordo com Marques e colaboradores (2004), algumas serpentes, como a *Crotalus durissus*, tem ampliado a sua ocorrência devido a perturbação e perda de *habitat*, sendo encontradas em trechos perturbados da Serra do Mar no bioma Mata Atlântica. Sugere-se que fatores como sobrevivência, reprodução e alimento é o que margeiam a seleção e uso do ambiente (VALLE; BRITES, 2012).

A *Crotalus durissus* é popularmente conhecida como cascavel, que em espanhol significa chocalho (Figura 1), fazendo referência a um calo ósseo no final da cauda que acumula um anel queratinizado oco a cada troca de pele, esses anéis articulados entre si formam o guizo e produzem um som de chocalho quando o animal se sente ameaçado.

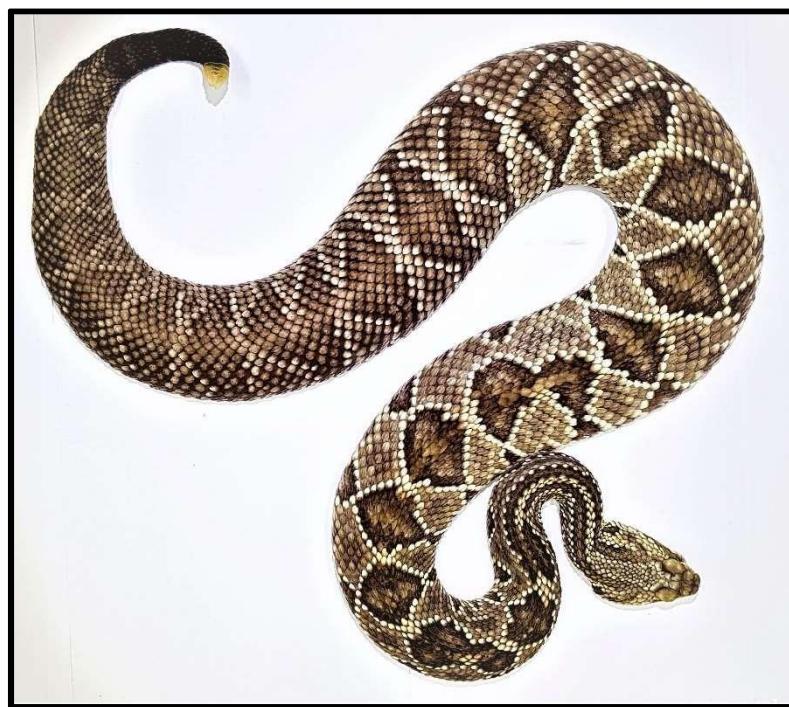


Figura 1. Serpente da espécie *Crotalus durissus*, popularmente conhecida como cascavel, tendo como característica marcante o guizo na extremidade da cauda (Fonte: Fernanda Alves)

Pertencente da família Viperidae, é uma serpente peçonhenta, vivípara, de hábito noturno e pode ser encontrada em campos abertos, pastos, regiões secas e pedregosas. As serpentes da espécie *Crotalus durissus* têm comportamento de caça por espreita ou *sit-and-wait* (NOGUEIRA et al., 2003), desta maneira o animal permanece parado a espera da passagem de uma presa. Este tipo de comportamento de predação confere a estes animais um melhor gerenciamento de suas reservas

energéticas (HUEY e PIANKA, 1981). Embora na maioria das serpentes exista uma variação ontogenética, onde serpentes jovens alimentam-se de animais poiquilotérmicos e quando adultos se alimentam de animais endotérmicos (KLAUBER, 1982), Salomão e colaboradores (1995) afirmam que a dieta de *Crotalus durissus* é composta apenas por presas endodérmicas, ou seja, pequenos mamíferos.

As cascavéis são temidas principalmente pelo fato de seu veneno ser altamente tóxico que pode causar quadros clínicos graves com reação local discreta, porém com intensa ação neurotóxica, coagulante e miotóxica, levando a óbito o acidentado, caso não seja tratado, por insuficiência renal e respiratória (AZEVEDO-MARQUES et al., 1992). Foi responsável por cerca de 2.166 acidentes notificados em 2016, em que 1,4% dos casos evoluíram a óbito (SINAN, 2018).

Os acidentes ofídicos e suas consequências fizeram com que as serpentes fossem temidas, mesmo quando Vital Brasil em 1901 demonstrou, no Instituto Soroterápico do Estado de São Paulo (atual Instituto Butantan), que soros produzidos contra cascavéis e jararacas mostravam propriedades distintas, associando o gênero da serpente com a especificidade do soro (Ministério da Saúde, 2018), levantando questões sobre outras propriedades que os venenos poderiam ter.

Desde então, o veneno das serpentes, incluindo a *Crotalus durissus*, são estudados, fornecendo diversos trabalhos que demonstram a grande diversidade funcional das moléculas bioativas e suas aplicações biotecnológicas como: analgésicos (YING-XIA et al., 2012); antimicrobiano (SANTAMARÍA et al., 2005; LEE et al., 2011), anti-hipertensivo (LAMEU et al., 2010); antiviral (MULLER et al., 2012), antiparasitário (PAIVA et al., 2011) e antitumoral (BREGGE-SILVA et al., 2012).

2.2 Serpentes em Cativeiro

O Brasil é pioneiro em criação de serpentes em cativeiro, começando 1901 para obtenção de veneno no Instituto Butantan de São Paulo, desde então houveram mudanças significativas para manter um serpentário, pois isso envolve fatores éticos, biológicos, sanitários e tecnológicos (MELGAREJO-GIMINÉZ, 2002).

As serpentes são consideradas animais de laboratórios e produção pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) sob a resolução normativa nº 29/ 2015, permitindo obter um padrão diferenciado de criação, manutenção e experimentação de outros grupos animais. Portanto, o desafio estrutural dos serpentários é influenciado praticamente pela biologia específica de cada gênero e espécie. Serpentes são animais ectotérmicos, e que possuem ampla distribuição geográfica, por isso cada espécie cativa exige uma climatização específica, bem como alimentação, manejo e condições ambientais, tornando complexa a manutenção das serpentes principalmente para laboratórios produtores de soros (MELGAREJO-GIMENEZ, 2002). Desafio este que pode ser amenizado com a manutenção e criação em cativeiro intensivo

O serpentário do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco mantém as serpentes peçonhentas, como a *Crotalus durissus*, em cativeiro intensivo. Trata-se de uma caixa de polipropileno condizente com o tamanho do indivíduo, contendo um substrato de papelão corrugado e água *ad libitum* (Figura 2), permitindo monitoramento dos controles ambientais, porém isso pode causar certas desvantagens como o espaço reduzido que limita os movimentos do animal propiciando atrofia muscular e obesidade, a falta de enriquecimento ambiental causando desequilíbrio fisiológico e consequentemente doenças (MELGAREJO- GIMENEZ, 2002).



Figura 2. Sala de manutenção de serpentes em cativeiro intensivo do Biotério da UCDB (A). Caixa de polipropileno onde são mantidas as serpentes (B e C). (Foto: Fernanda Alves)

Além disso, os processos digestórios das serpentes também podem sofrer alterações, pois por serem ectotérmicas dependem de fatores ambientais como a temperatura e umidade. Mesmo nos animais que estão há mais tempo em cativeiro. Tal alteração pode resultar problemas nas atividades enzimáticas gástricas, pancreáticas e hepáticas (FRYE, 1991; SCOTT, 1992; MADER, 2006), desta maneira, ainda que os animais recebam uma alimentação balanceada, o manejo adequado fará toda diferença na sanidade dos animais cativos. Adicionalmente, o manejo alimentar reflete ainda, no estado nutricional dos indivíduos cativos, desta forma analisar a condição corporal pode ser uma forma de rápido diagnóstico. A análise visual e tátil, independente de tamanho e/ou estado fisiológico a fim de se estimar o estado nutricional e possíveis distúrbios alimentares, é mais viável do que mensurar pelo peso vivo (DIAS, 1991).

Mayer (2008) defende que as origens dos distúrbios alimentares são classificadas por excesso ou deficiência de nutrientes. É possível destacar distúrbios como hiper e hipovitaminoses, deficiência de proteínas ou caquexia, anorexia e obesidade (PARANZINI et al., 2008).

A anorexia pode ser definida como a falta de apetite ou desinteresse do animal ao alimento oferecido (MADER, 2006), sendo assim é considerada como um sinal clínico consequente de uma causa. Ao descartar situações fisiológicas normais como ecdise, períodos de hibernação ou estado avançado de gestação em fêmeas (PARANZINI et al., 2008), devem ser consideradas as causas infecciosas como as desordens gastrointestinais de origem bacteriana (SANTOS; GALLI, 2017).

Já na obesidade, mesmo que em cada indivíduo haja diferença na composição da microbiota intestinal, pois são margeadas por características genéticas, sofrem influência também de fatores ambientais, hábitos alimentares, faixa etária, estresse ou uso de antibióticos (PENDERS et al., 2006; ALMEIDA, 2009; ZHANG et al., 2015). Ainda que a causa da obesidade esteja relacionada com a quantidade calórica ingerida em relação ao que se gasta, as diferentes comunidades microbianas podem afetar a gestão energética e homeostase, sustentando a hipótese de que a predisposição a obesidade é devido a presença de uma microbiota intestinal capaz, de extrair ou armazenar com mais eficiência, a dieta oferecida (LEY et al., 2005).

A obesidade é um distúrbio comum entre as serpentes mantidas em cativeiro intensivo (MADER, 1996). Como já exposto, trata-se de um ambiente com espaço limitado em que os animais são alimentados em períodos acertados, neste caso semanalmente para filhotes; quinzenalmente para jovens; e mensalmente para indivíduos adultos (MELGAREJO-GIMENEZ, 2002), mantendo o alimento a sua disposição, portanto dispensa a necessidade de comportamento predatório como ocorre na natureza.

Considerando que a dieta do hospedeiro é a chave da composição da microbiota e que a ingestão desregulada de alimentos pode causar distúrbios alimentares, pode –se assumir que há uma relação entre estes distúrbios e a microbiota alterada (LAM et al., 2017).

2.3 Gene 16S rDNA

Os ribossomos são responsáveis pela síntese proteica das células, esta estrutura possui duas subunidades e o gene 16S rDNA corresponde a menor subunidade ribossomal. Por estarem presentes em todas as células procarióticas, Woese e Fox (1977) propuseram que as relações filogenéticas bacterianas poderiam ser traçadas através deste gene. Desde então tem sido o mais empregado quando relacionada a distância filogenética bacteriana (BLAUT et al., 2002).

O gene 16s possui em torno de 1.500 pares de bases, além de ser uma região altamente conservada

(GRAY; SANKOFF; CEDERGREN, 1984). Algumas regiões possuem variabilidade que podem ser características particulares de um grupo ou espécie, totalizam nove regiões (V1-V9), que são chamadas de regiões hipervariáveis (CHAKRAVORTY et al., 2007).

O grau de conservação de cada região é diferente, desta forma quando trata-se de estudos relacionados com filogenia pode ocorrer variação no resultado, como no caso da região V1-V2, por possuírem juntas apenas 250 nucleotídeos, podem dificultar a identificação de grupos em níveis mais altos, como Filo (YARZA et al., 2014). Neste caso as regiões mais utilizadas são a V3, V4 ou V9 pois são as maiores sequencias, com 250 nucleotídeos cada região.

Por isso, em estudos utilizando DNA metagenomico voltados para populações bacterianas e seus nichos ecológicos, o gene 16S é utilizado como um marcador

molecular (MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD, 2013), que permite criar um perfil da comunidade bacteriana presente em uma amostra (OULAS et al., 2015).

2.4 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal, além de complexa, sofre variação entre as espécies e depende do tipo de dieta do animal (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004), além de outros fatores como hábito alimentar, idade e fatores ambientais (PENDERS et al., 2006; ALMEIDA, 2009; ZHANG et al., 2015). Kosiewcz (2011) ressalta que fatores genéticos e ambientais estão intimamente ligados com a composição da microbiota intestinal, que podem induzir a uma resposta protetora ou patogênica dependendo da suscetibilidade do hospedeiro. Adicionalmente, possuem um papel importante no que diz respeito a resposta imune em sítios intestinais e extra intestinais como na pele de anfíbios (HARRIS et al., 2009). Desta forma, qualquer fator pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, podendo ser causadas pela microbiota normal do animal ou causadas por agentes a partir de fonte externa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O interesse da relação entre a microbiota animal e suas funções tem sido testada em alguns experimentos. Como a capacidade de tornar-se patogênica ou até mesmo de favorecer doenças específicas foi avaliada por Jiang e colaboradores (2017) em 30 indivíduos de lagarto crocodilo (*Shinisaurus crocodilurus*) divididos em: doentes, saudáveis, selvagens e cátivos; sob efeito de diferentes dietas e mostrou que houve diferença na composição da microbiota entre os grupos avaliados referente a dieta, porém não houve diferença significante no favorecimento das doenças testadas neste experimento, sugere-se que pode ser por terem sido testadas doenças cutâneas e não do trato gastrointestinal.

Uma pesquisa de caracterização de microbiota intestinal conduzida por Peterson e seus colaboradores (2013 *apud* HANNING e DIAZ-SANCHEZ, 2015) relata que serpentes *Boaedon fuliginosus* tratadas com antibióticos que recebiam roedores e água esterilizados em ambiente controlado, obtiveram diferença na população bacteriana presente nas amostras de intestino quando comparados a um grupo controle, porém não houve diferença na absorção dos nutrientes, descartando a relação entre um e outro.

Para testar a relação entre a microbiota intestinal e a obesidade, camundongos *germ free* foram submetidos a transplante de microbiota intestinal humana, sob efeito

de dieta rica em lipídios e carboidratos, Turnbaugh e colaboradores (2009), observaram o aumento de tecidos adiposos nos camundongos, além de alterações na microbiota intestinal em resposta a dieta.

Outro estudo submeteu ratos gnotobióticos a um jejum de 24 horas a fim de verificar a relação metabólica entre o fígado e o coração mediada pela microbiota intestinal, revelando que a microbiota intestinal desenvolve papel importante ao aumentar o suprimento de corpos cetônicos, na ausência da microbiota, o suprimento seria compensado com a utilização de glicose, além de perceberem uma significativa mudança na microbiota intestinal durante o jejum (CRAWFORD et al., 2009).

Segundo a afirmação de Costello (2014) a microbiota intestinal passa a ter uma configuração diferente quando há escassez de nutrientes. A alimentação com pequenos intervalos, como nos mamíferos, resulta em regulação das respostas metabólicas em intervalos menores (SECOR; DIAMOND, 1998). Em pítons birmanesas notou-se aumento da massa cardíaca ventricular em 40%, 48 horas após a quebra de um jejum de 28 dias (ANDERSEN et al., 2005).

Algumas serpentes, tem comportamento alimentar *sit-and-wait*, o que pode conferir uma maneira de diminuir o gasto energético, assim permanecem enrodilhadas em espreita aguardando a passagem de uma presa, podendo passar longos períodos sem alimentar-se. Assim como em *Crotalus durissus*, este comportamento pôde ser observado em uma jararaca *Bothrops atrox*, que pertence também à família Viperidae, a mesma passou 96 dias enrodilhada, deixando o local somente após predar um roedor (OLIVEIRA, 2003). Muitas espécies de serpentes

passam períodos extremos de jejum, períodos que podem ser de um ano entre uma alimentação e outra, trazendo questionamentos em torno do impacto que o jejum pode causar a microbiota intestinal ou se promove alguma adaptação (HANNING; DIAZ-SANCHEZ, 2015).

Ainda que cada indivíduo tenha a composição do microbioma intestinal variada pode-se confirmar que dentre os vertebrados as espécies mais prevalentes são *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Ruminococcus* (SOMMER & BÄCKHED, 2013).

Neste contexto, devido as condições seletivas e a composição dos meios que podem dificultar o isolamento e identificação dos microrganismos presentes nos mais diversos microbiomas, a abordagem metagenômica tem ganhado espaço nas pesquisas, seja em amostras de solos (CASTAÑEDA e BARBOSA, 2017; CHANG et al., 2017), gastrointestinais humanas (WANG et al., 2015) e de animais (HANNING e DIAZ-SANCHEZ, 2015; KIM et al., 2017).

2.5 Abordagem metagenômica aplicada à microbiota intestinal de serpentes

A metagenômica é uma técnica que foi descrita pela primeira vez por Jo Handelsman na Universidade de Wisconsin nos Estados Unidos, na qual baseia-se na análise genômica de DNA microbiano total extraído diretamente das amostras alvo, permitindo a identificação de microrganismos, mesmo em pequenas quantidades, fornecendo ainda a composição taxonômica da comunidade microbiana (HANDELSMAN, 2004).

Ao analisar um gene específico é possível tomar conhecimento da biodiversidade de uma amostra utilizando tecnologias de sequenciamento, aliadas a ferramentas de bioinformática (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012; OULAS et al., 2015). Desta forma após traçar um comparativo entre as sequências metagenômicas e um banco de dados, através de sequências homólogas é possível obter a caracterização de populações microbianas a partir de amostras ambientais. É também possível identificar a presença de microrganismos específicos ou dominantes, rotas

metabólicas, presença e localização de um gene ou operóns responsáveis por síntese de moléculas que podem causar interesse biotecnológico (STEELE et al., 2005).

No que diz respeito a caracterização, McLaughlin (2015) utilizou serpentes do gênero *Crotalus horridus* e caracterizou a microbiota do estômago, intestino delgado e cólon a partir da técnica de metagenômica e foram encontradas um total de 2.377.974 sequências divididos em 26 OTUs (Operational Taxonomic Units). A microbiota intestinal do indivíduo estudado não pareceu ser muito diversificada no seu ambiente natural, tendo por sua vez o filo Proteobacteria como dominante nos três tecidos estudados.

Já no trabalho de Colston e colaboradores (2015) foi traçado um comparativo entre os microrganismos encontrados na cavidade oral, intestino delgado, intestino grosso e cloaca em oito indivíduos da espécie *Agkistrodon piscivorus*, e após extração de DNA, amplificação por PCR e pirosequenciamento do gene 16S rRNA, revelando dominância do filo Bacteriodes no intestino grosso como esperado e consistente com outros estudos, a dominância no intestino delgado e cloaca foi do filo Proteobacteria.

Ainda neste trabalho, ao comparar as amostras coletadas ao longo do trato gastrointestinal com amostras coletadas da cloaca com auxílio de um *swab*, foi possível identificar comunidades bacterianas correspondentes a diversidade encontrada nas outras amostras, mostrando assim, a representatividade positiva de amostras coletadas da cloaca.

Trabalhos de caracterização de microbiota intestinal em serpentes são necessários para comparar com outros grupos de répteis, como no trabalho de Jiang e colaboradores (2017), que observaram diferenças na riqueza e abundância de OTUs em lagartos da espécie *S. crocodilurus* com manejo alimentar distinto, pois há uma falta de conhecimento na microbiota intestinal de desses animais, o que demonstra muita importância em estudos dessa linha feitas com cada serpente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar a composição e diversidade da comunidade bacteriana associada à cavidade cloacal de *Crotalus durissus*, sob o efeito do manejo alimentar e escore corporal de serpentes mantidas em cativeiro, por meio de DNA metagenômico.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um protocolo de classificação de escore corporal para *Crotalus durissus*, que permita a padronização dos grupos de estudo em magras, normais e obesas.
- Caracterizar a diversidade bacteriana cloacal de *Crotalus durissus* utilizando técnicas de metagenômica.
- Avaliar e comparar alfa e beta diversidade da comunidade bacteriana presente na cloaca dos indivíduos classificados nos grupos de escore corporal: normal, obeso e magro;
- Avaliar e comparar alfa e beta diversidade da comunidade bacteriana cloacal sob efeito prolongado de jejum para serpentes de cativeiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Legais

O presente trabalho foi realizado de acordo com o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob registro 47695-1, Instituto do Meio Ambiente do Mato Grosso do Sul (IMASUL) e o Comitê de Ética e Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Católica Dom Bosco, sob protocolo nº 022/2017 (Anexo 1).

4.2 Seleção dos animais

As serpentes utilizadas neste estudo foram *Crotalus durissus* (cascavel) provenientes dos plantéis de cativeiro intensivo do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Para que fossem distribuídos entre os grupos determinados, além de terem no mínimo três anos de cativeiro, com uma rotina mensal de alimentação, foram criados critérios que os classificassem como obesos, magros e normais.

O escore da condição corporal desenvolvido no presente estudo, foi embasado nos conceitos utilizados para mamíferos, através de inspeções visuais e palpação permitindo verificar reserva de gordura e massa muscular, classificando o animal numa escala de um a seis. Sendo assim, o quadro desenvolvido possui as categorias, S1, S2, S3, S4, S5 e S6, considerando S1, muito magra; S4, animal desejado; e S6, obeso.

As categorias intermediárias, S2, magra, S3, magra com musculatura e S5, sobrepeso; foram criadas visando agrupar animais que, de acordo com os parâmetros, não se encaixavam nas categorias extremas.

Para que os animais fossem agrupados foram padronizados a avaliação da costela, vista lateral, vista superior, vista ventral, porção final, e pescoço/ osso quadrado. A definição para cada critério em cada categoria foi baseada, primeiramente, no conhecimento da biologia do animal e nas percepções sobre a

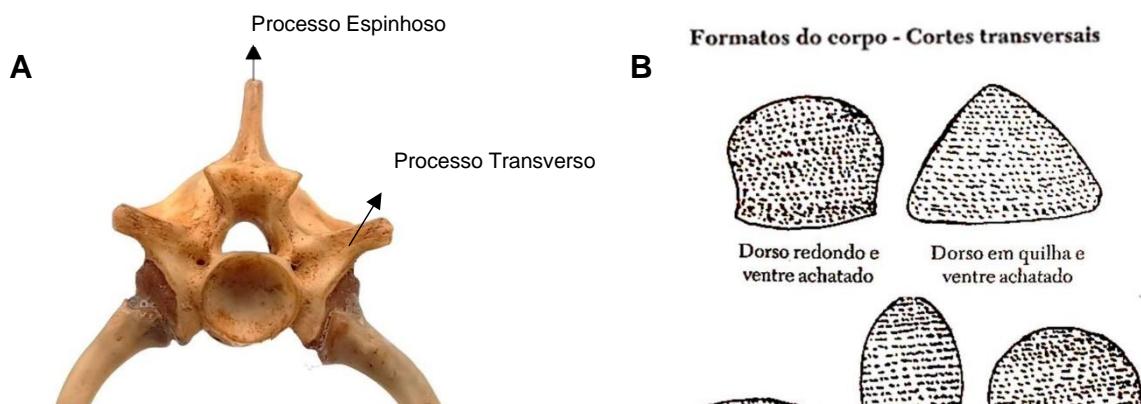


Figura 3. Vértebra de serpente indicando processos espinhoso e transverso que são avaliados por palpação nas categorias de vista superior e vista lateral, respectivamente (A) (Foto: Fernanda Alves). Cortes transversais do formato do corpo de serpentes que devem ser considerados ao avaliar a condição corporal (Fonte: MOSMANN, 2001).

anatomia de *Crotalus durissus*. Posteriormente analisando cada animal do plantel foi possível fazer ajustes em cada critério avaliado.

Na região da costela, quanto mais magro o animal, mais fácil é a visualização das costelas, além ser possível identificar a camada de musculatura durante a palpação. Em animais obesos não é possível fazer esta visualização e ainda é possível palpar camadas de gordura.

Ao avaliar vista lateral e superior, levou-se em consideração o quanto o processo transverso e espinhoso da coluna vertebral (Figura 3A), respectivamente, ficavam aparentes. Portanto, foi necessário considerar que a *Crotalus durissus* possui o formato do corpo em quilha com ventre achatado (Figura 3B) e que mesmo nas serpentes obesas o processo espinhoso fica um pouco visível. Ao palpar, é possível sentir a quantidade de musculatura no local e também a presença de gordura, além do formato arredondado que alguns animais obesos podem apresentar. Nos animais considerados como desejáveis ou saudáveis o processo transverso não é visível, já nos indivíduos magros há perda de camada muscular.

Anatomicamente as serpentes não possuem o osso esterno, sendo assim quando estão magras há a formação de um sulco que possibilita a identificação de algumas estruturas internas através do toque, tornando-se uma característica desta condição corporal. Esta identificação não é tão fácil nos indivíduos saudáveis e impossível nos animais obesos, já que possuem corpos gordurosos nesta região.

Na porção final foi possível observar que nos animais obesos, independente do sexo do animal, havia um afilamento abrupto entre a cloaca e o início da cauda (Figura 4C), como não ocorria nos animais classificados como normais (Figura 4B), de maneira que o afilamento da cauda era proporcional ao corpo do animal. Desta forma nos animais magros (Figura 4A), é possível observar um afilamento que pode ser considerado como proporcional, porém ao palpar há pouca musculatura.

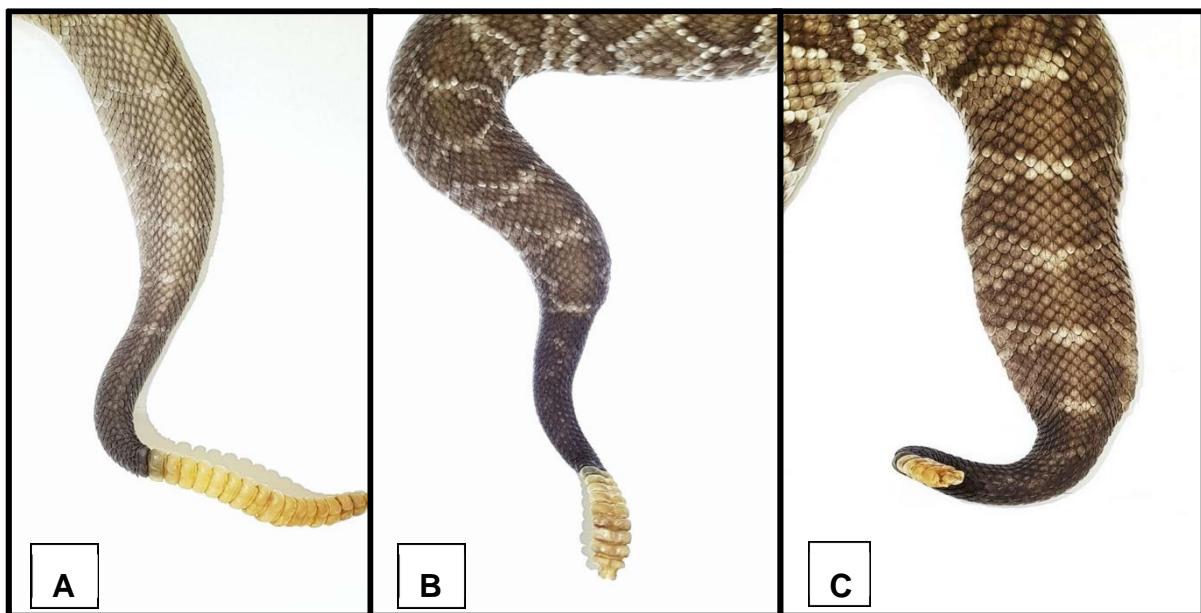


Figura 4. Porção final de serpente Magra, afilada com pouca musculatura, mais perceptível ao toque (A). Cauda de serpente considerada como Normal, com afilamento uniforme (B). Cauda de serpente Obesa, com afilamento abrupto (C) (Foto: Fernanda Alves).

Por fim, na região osso quadrado e cervical (Figura 5), é possível observar que há musculatura nas serpentes saudáveis, que iniciam no osso quadrado e seguem pela parte cervical da coluna vertebral. Foi possível observar também que nas serpentes magras havia pouca musculatura, deixando evidentes as extremidades do osso quadrado (Figura 5A).

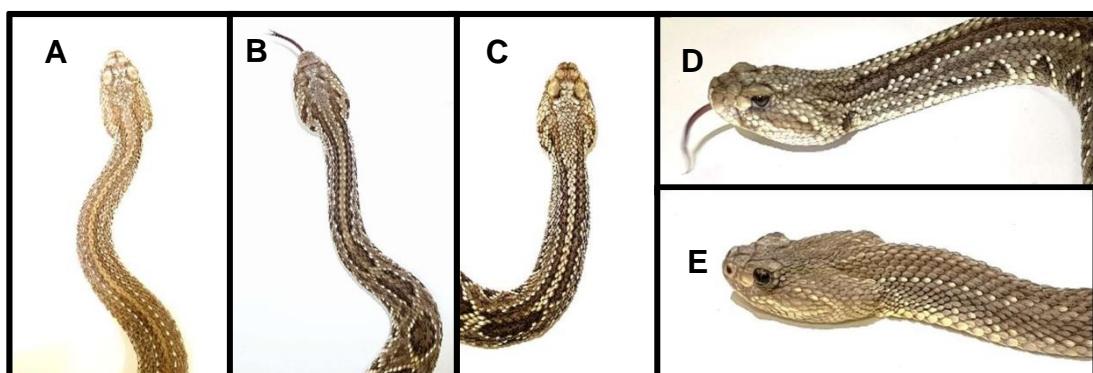


Figura 5. Osso quadrado/ pESCOço de serpentes Magra (A e E); Normal (B); e obesa (C e D); onde é possível observar a diferença de musculatura nestas regiões. (Foto: Fernanda Alves)

4.3 Coleta das amostras

Posteriormente a seleção e agrupamento, nove animais ($n=3/\text{grupo}$) foram alimentados e após sete dias ocorreu a primeira coleta da microbiota cloacal, sendo consideradas como amostras do tempo zero (T0). Por se tratar de animais de cativeiro com manejo alimentar mensal, conforme descrito por Melgarejo (2002), a segunda coleta da microbiota cloacal ocorreu 50 dias após a primeira, considerado um período de jejum prolongado para serpentes de cativeiro. Estas últimas amostras foram chamadas de tempo 50 (T50) (Figura 6).

As amostras foram coletadas da cavidade cloacal das serpentes conforme Colston (2015). Após esterilização da parte externa da cloaca com álcool 70%, afim de garantir que o material coletado não seja da microbiota associada ao ambiente, um “swab” estéril foi introduzido gentilmente na cloaca (~5-8 mm) (Figura 7), foi rotacionado várias vezes, por aproximadamente um minuto, no interior da cloaca do animal. Os “swabs” foram armazenados em microtubos de 2mL estéreis em temperatura -20°C até o momento da realização da extração direta do DNA

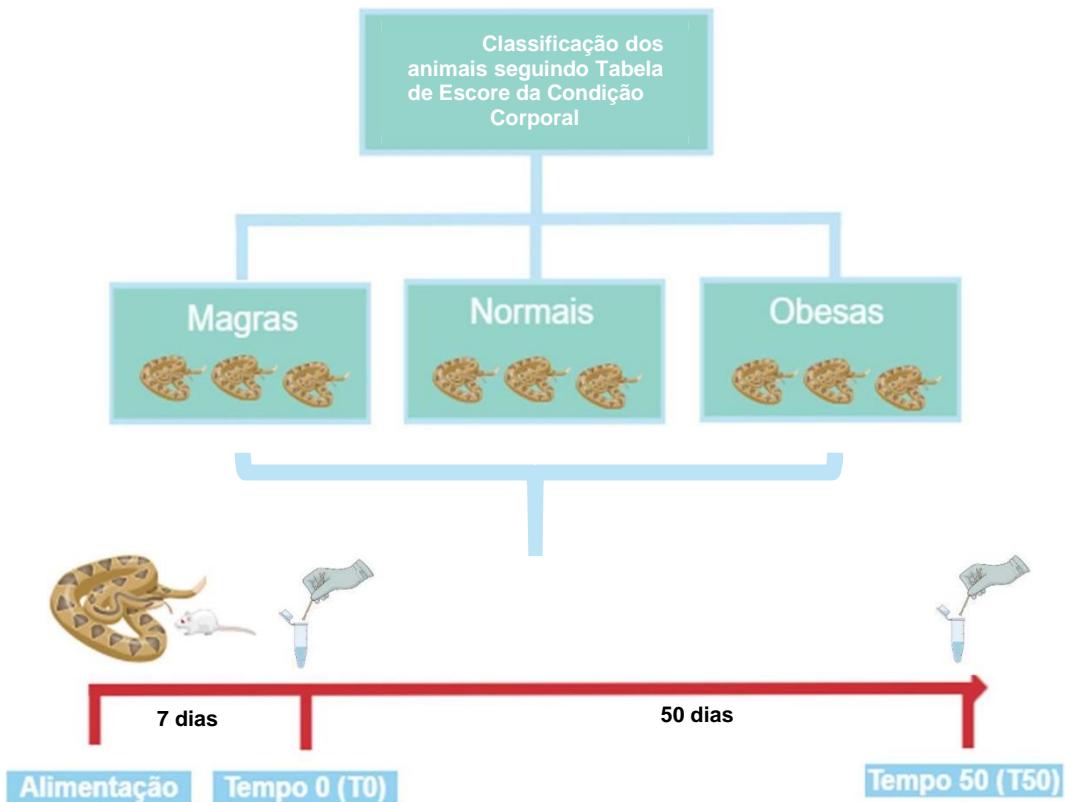


Figura 6. Seleção das serpentes *Crotalus durissus* utilizando a tabela de escore da condição corporal desenvolvida neste estudo, resultando em três grupos com n de três indivíduos em cada, as quais foram mantidas em jejum por 50 dias, após sete dias da alimentação ocorreu a coleta do tempo zero, seguida da coleta do tempo 50, após o jejum.

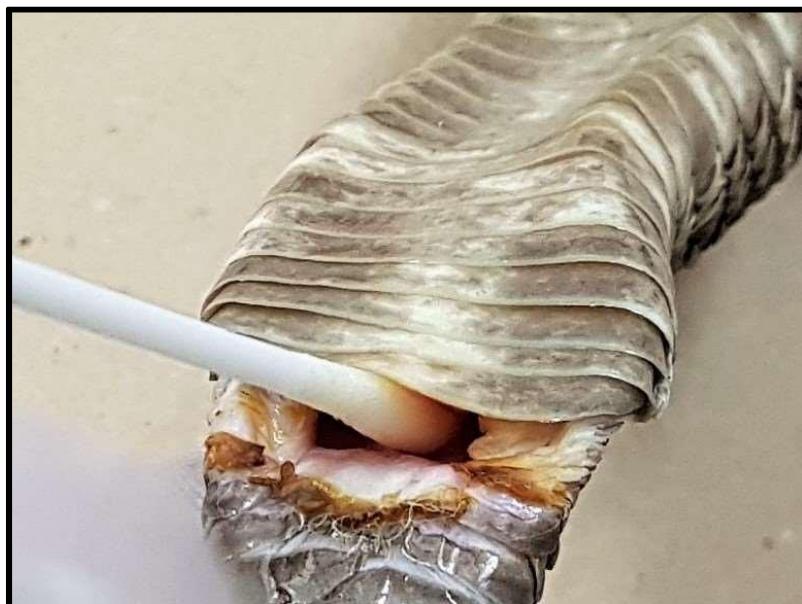


Figura 7. Coleta da amostra da cavidade cloacal de *Crotalus durissus*. (Foto: Luiz H.G. R.Junior)

4.4 Extração direta de DNA

A extração total direta de DNA das amostras foi realizada utilizando o kit DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen), com alterações nas instruções dos fabricantes, incluindo: (1) Após adição da solução C1 as amostras foram incubadas a 70°C por 10 minutos. (2) Vortex na velocidade máxima por 20 minutos em posição horizontal. (3)

Foi adicionado 30uL da solução C6 no centro do filtro. (4) Após adição da solução C6 à coluna, a mesma foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos, antes da centrifugação final.

O produto da extração de DNA foi quantificado com auxílio do Qubit® 3.0 Fluorometer e posteriormente avaliado por eletroforese em gel de agarose 0.8 % e corado com brometo de etídeo. O seu tamanho pôde ser estimado por comparação com marcador 1kb *plus ladder*. Confirmada a amplificação do gene 16S rDNA, as amostras foram preparadas para serem sequenciadas.

4.5 Sequenciamento de DNA seguido por Análise de Bioinformática

Para complementaridade dos resultados, 18 amostras foram enviadas para o sequenciamento em larga escala de DNA para empresa GenOne Soluções em Biotecnologia, situada no Rio de Janeiro, Brasil. A amplificação da região V4 do gene 16S rDNA foi feita utilizando primers específicos: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), assim como o sequenciamento foi realizado pela plataforma Illumina HiSeq (<http://www.genone.com.br/genomica/>), obtendo uma biblioteca metagenômica.

O pacote QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) V1.7.0 (CAPORASO et al., 2010) foi usado para filtrar tags brutas para obter as tags limpas de alta qualidade. Em seguida, sequências com similaridade de $\geq 97\%$ foram atribuídas às mesmas unidades taxonômicas operacionais (OTUs) usando o software Uparse (Uparse v7.0.1001) (EDGAR, 2013). Uma sequência representativa para cada OTU foi anotada com Threshold 0,8 usando o software Mothur (SCHLOSS et al., 2009) contra o banco de dados SILVA (QUAST et al., 2013) para anotação em cada classificação taxonômica. A relação filogenética de todas as sequências representativas de OTUs pode ser comparada usando o software MUSCLE (EDGAR, 2004). E para visualizar os OTUs compartilhados entre os grupos experimentais Obesas, Normais e Magras (antes e depois do jejum) a informação das análises de compartilhamento de comunidades bacterianas para esses grupos foi detalhada em diagrama de Venn

A alpha diversidade foi estimada utilizando o índice de Shannon, que atribui maior importância a espécies raras, utilizando o QIIME e exibido usando o software R (Version 2.15.3). Os índices foram comparados entre as amostras através do método

de Tukey considerando ($p=0,05$).

A beta diversidade, para demonstrar a similaridade entre as amostras, foi calculada por meio da análise dos componentes principais (PCA) na plataforma do QIIME usando matriz de distância *Weighted UniFrac*, distância ponderada que considera tanto a participação de uma comunidade quanto a abundância relativa, por isso é uma métrica quantitativa. Para avaliar a similaridade entre os grupos experimentais foi calculado por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando método de Tukey-Kramer de múltiplas comparações, com correção de Bonferroni ($p>0,05$) (com cobertura nominal de 99%). Esta análise permite verificar se existe diferença significativa entre as médias comparando as médias dos grupos com a variância dentro dos grupos, gerando dados que possibilitem estimar se os grupos são parte de uma população ou populações distintas com características diferentes.

Para identificar os grupos bacterianos presentes ou ausentes mediante o jejum ou escore corporal foi utilizado o método do tamanho do efeito de análise discriminatória linear (LDA) utilizando o LEfSe software (Segata et al., 2011), permitindo assim comparar, através do histograma, as abundâncias diferenciais das bactérias entre os grupos nos níveis familiar e genético; e do cladograma identificar os biomarcadores de abundância relativa entre os grupos antes e após o jejum.

4.7 Análise Estatística

O teste estatístico das diferenças taxonômicas foi calculado pelo software Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) versão 2.0.0 (PARKS e BEIKO, 2010), com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,05$) (cobertura nominal de 95%).

5. RESULTADOS

5.1 Seleção dos animais

Por não obter parâmetros descritos, na comunidade científica, que classificassem as serpentes por escore corporal, foi necessário o desenvolvimento de parâmetros que possibilassem a avaliação do animal e suas reservas corporais, desta forma refletindo o quanto o animal está magro ou obeso. Sempre levando em conta as particularidades do grupo e da espécie escolhida para o estudo.

Assim foi possível obter uma tabela (Quadro 1) em que, baseado nas características do animal, fosse possível classificá-los por escore corporal.

Sendo assim, foram selecionados três indivíduos para o grupo de serpentes obesas (Figura 8); normais (Figura 9), e magras (Figura 10).

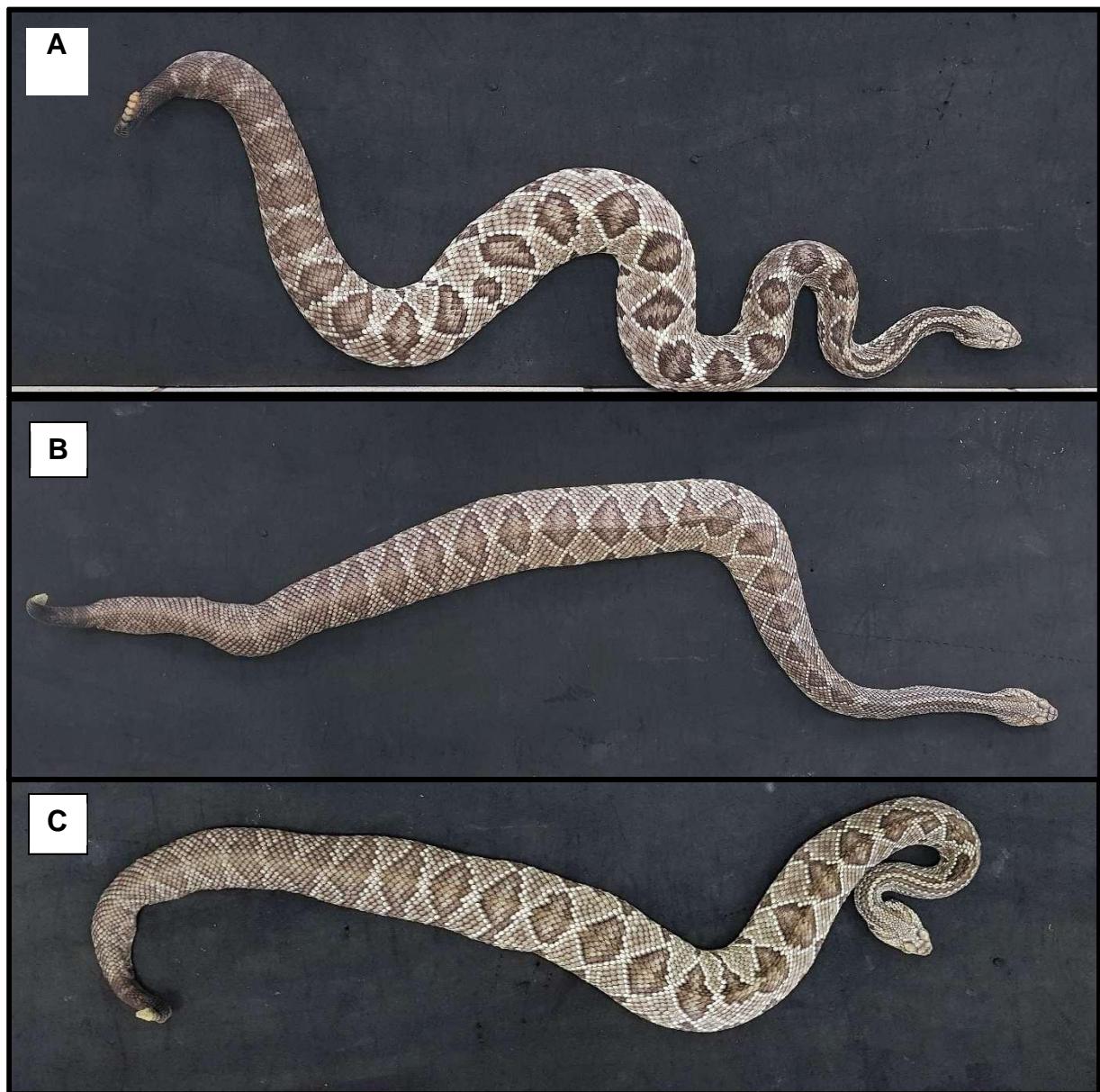


Figura 8. Serpentes selecionadas para o grupo “Obesas” utilizando classificação de escore da condição corporal. (Foto: Fernanda Alves)

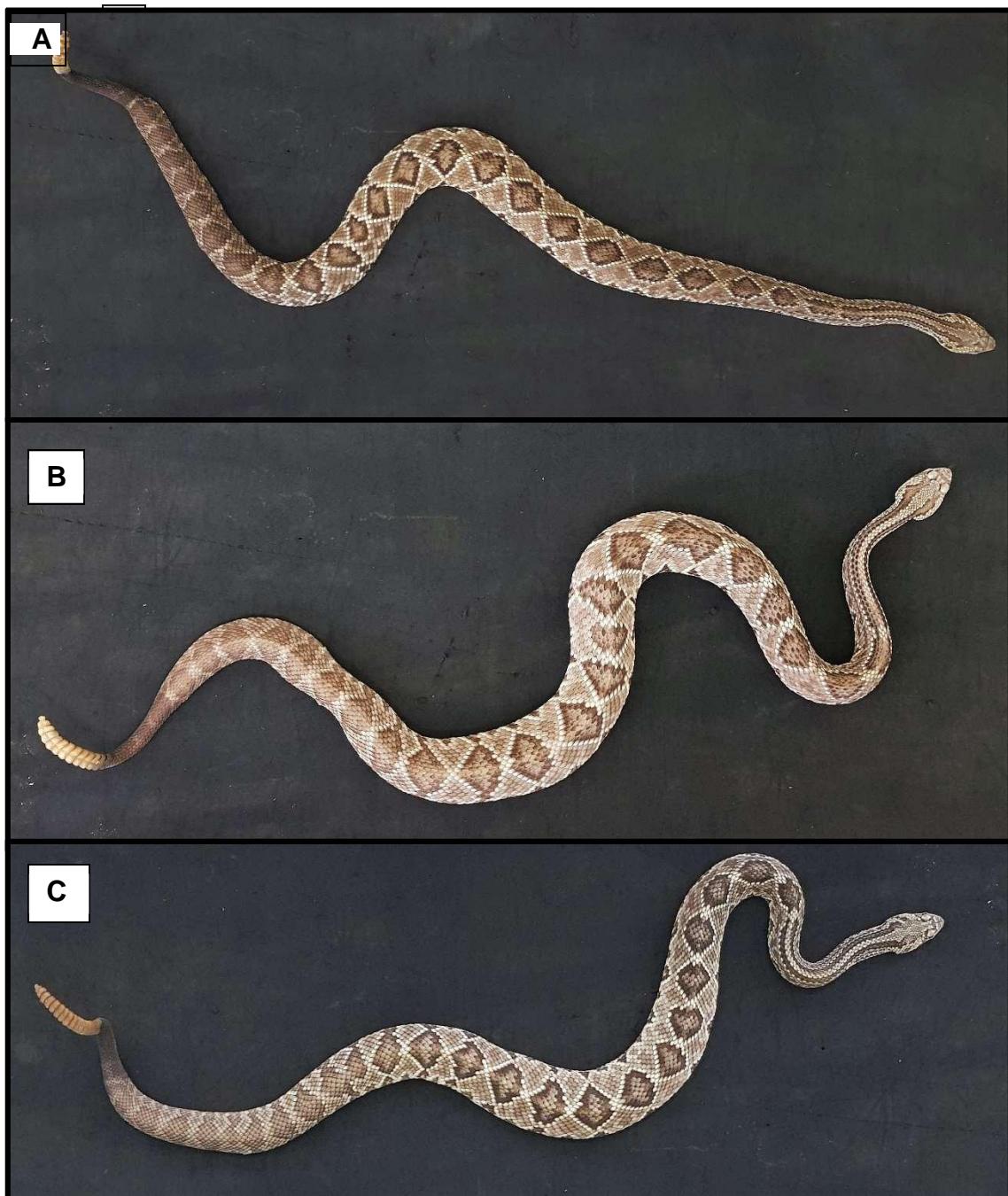


Figura 9. Serpentes selecionadas para o grupo “Normais” utilizando classificação de escore da condição corporal. (Foto: Fernanda Alves)

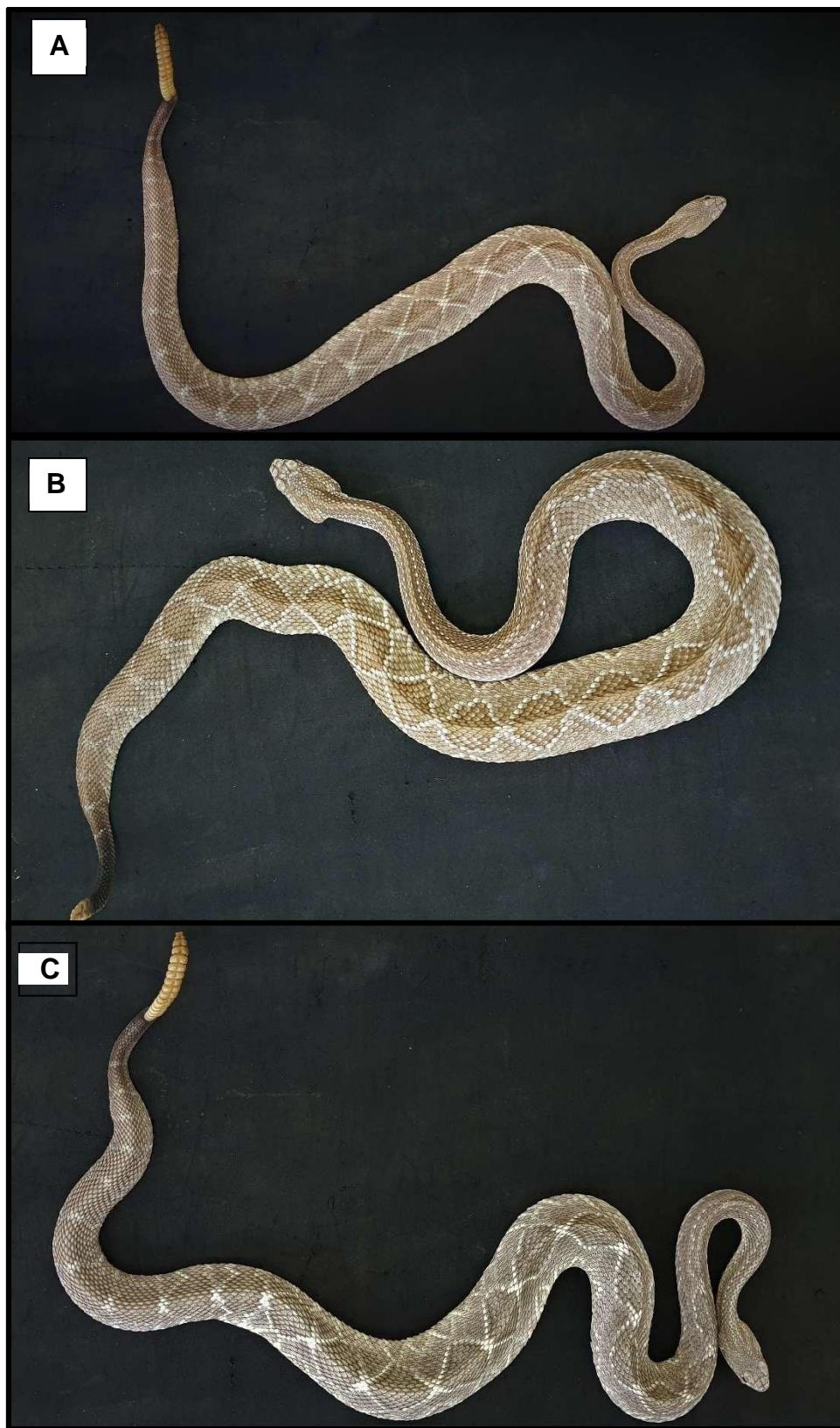


Figura 10. Serpentes selecionadas para o grupo “Magras” utilizando classificação de escore da condição corporal. (Foto: Fernanda Alves)

Quadro 1. Tabela desenvolvida neste estudo para avaliação de escore da condição corporal, possibilitando a classificação de serpentes da espécie *Crotalus durissus* entre seis grupos.

	S1 - Muito Magra	S2 - Magra	S3 - Magra com Musculatura	S4 - Animal Desejado	S5 - Sobrepeso	S6 - Obeso
Costela	Costelas bastante evidentes ao toque; com camada de musculatura bastante reduzida.	Costelas bastante evidentes (visíveis), facilmente palpadas; com fina camada de musculatura.	Costelas evidentes (visíveis), facilmente palpadas; com camada de musculatura.	Costelas pouco evidentes (não visíveis), facilmente palpadas; com camada de musculatura desenvolvida.	Costelas não visíveis; com camada de musculatura bem desenvolvida; com observação de pontos de gordura.	Costelas não visíveis; com espessa camada de gordura.
Vista Lateral	Processo espinhoso evidente, com musculatura reduzida ao longo do corpo	Processo espinhoso bastante visível com presença de pouca musculatura ao longo do corpo	Processo espinhoso visível com presença de musculatura ao longo do corpo; exceto na porção terminal	Processo espinhoso visível e passível de toque; distribuição muscular uniforme ao longo do corpo; exceto na porção terminal	Processo espinhoso passível de toque; distribuição muscular com pontos de gordura ao longo do corpo; exceto na porção terminal	Corpo arredondado, gordura evidente.
Vista Superior	Processo transverso bastante evidente; facilmente tocado; com musculatura muito pobre.	Processo transverso evidente; com suave musculatura, facilmente tocado	Processo transverso evidente, pouco visível; facilmente tocado	Processo transverso pouco evidente ou não visível; dificilmente tocado	Processo transverso não visível; dificilmente tocado	Corpo arredondado, gordura evidente; processo espinhoso visível até a região mediana do corpo.
Vista Ventral	Sulco ventral presente; estruturas internas facilmente tocadas.	É possível visualizar sulco ventral na porção final; com fácil identificação de estruturas internas através de toque ventral.	Sem formação de sulco ventral; é possível identificação de estruturas internas através de toque ventral.	Sem formação de sulco ventral; com dificuldade de identificação de estruturas internas através de toque ventral.	Estrutura internas dificilmente tocadas; é possível sentir pontos de gordura através de toque ventral.	Difícil palpação, impossível distinção do conteúdo abdominal, devido a presença de muita gordura.
Porção Final	Afilada com musculatura reduzida	Corpo com musculatura reduzida; pele encostada no esqueleto	Corpo uniforme, com pouca musculatura.	Corpo uniforme, sem estrangulamento na porção terminal do corpo. Afilamento uniforme do corpo.	Corpo avolumado; com porção final reduzida e afilada	Estrangulamento na porção terminal do corpo; afilamento abrupto
Pescoço/Osso Quadrado	Pouca estrutura muscular; sem observações de gordura; com possível identificação das extremidades do osso quadrado.	Estrutura muscular uniforme, sem observações de gordura.	Estrutura muscular uniforme	Estrutura muscular bem distribuída, uniforme; sem observações de gordura	Estrutura muscular bem distribuída, uniforme;	Estrutura muscular bem distribuída, uniforme; podendo ter presença de gordura

5.2 Extração direta de DNA

O protocolo de extração direta de DNA padronizado a partir do kit DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen) mostrou-se eficiente, uma vez que revelou bandas de DNA ao ser aplicada em gel de agarose a 0,8% de concentração (Figura 11). É possível afirmar que nesta concentração, o gel faz separação de fragmentos de 0,5 a 20-30 kb (quilobase, 1kb=1000 pares de base).

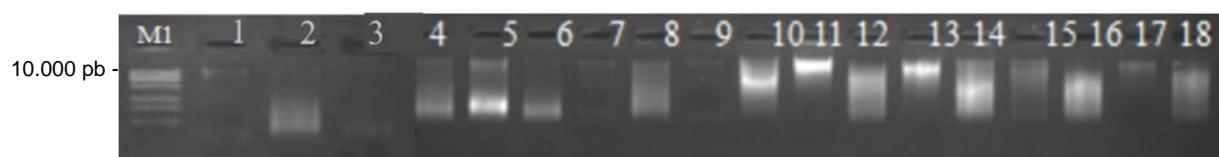


Figura 11. Gel de agarose (1%) do produto bruto da extração mostrando a presença de DNA em todas as amostras coletadas da cavidade cloacal. (M1) Marcador 1kb Plus Ladder; (1,2,3=T0 e 10,11,12=T50) amostras coletadas das serpentes do grupo “Obesas”; (4,5,6=T0 e 13,14,15=T50) amostras coletadas do grupo “Normais”; (7,8,9=T0 e 16,17,18=T50) amostras coletadas do grupo “Magras”.

5.3 Quantificação de DNA

Após quantificação via Qubit® (Life tecnologies), as amostras tiveram concentrações que as tornaram aptas a seguir para a etapa de sequenciamento do gene 16S rDNA pela plataforma HiSeq (Illumina) (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração das amostras em ng/uL, quantificadas via Qubit® (Life tecnologies) após extração direta de DNA utilizando kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen). Os valores das concentrações seguem a mesma disposição das amostras aplicadas em gel de agarose 0,8 (Figura 11).

Quantificação de DNA (ng/uL)									
	Obesas (1)			Normais (2)			Magras (3)		
T0	9,8	41	10	20,1	21,5	20,4	14	19,3	10,1
T50	107	22,5	42,3	62,8	37,3	28,8	17	23,2	48,3

5.3 Amplificação do gene 16S rDNA

A amplificação do gene foi feita por PCR a partir do produto obtido da extração de DNA, como apresentada na Figura 12.

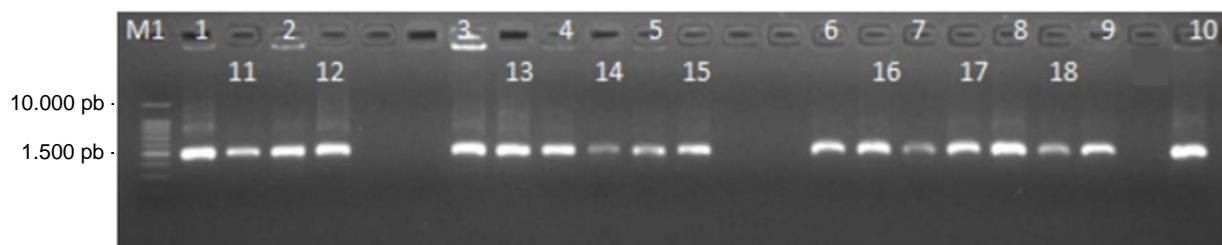


Figura 12. Gel de agarose 2% do produto da PCR, mostrando a amplificação do gene 16S rDNA. (M1) Marcador 1kb Plus Ladder; (1,2,3=T0 e 10,11,12=T50) amostras coletadas das serpentes do grupo “Obesas”; (4,5,6=T0 e 13,14,15=T50) amostras coletadas do grupo “Normais”; (7,8,9=T0 e 16,17,18=T50) amostras coletadas do grupo “Magras”.

5.4 Análise Geral do Sequenciamento de DNA

Após a PCR o sequenciamento resultou em um milhão sequências de DNA, com a aplicação dos filtros foram obtidas 967 mil sequências de qualidade. Para o melhor desempenho dos índices de alpha e beta diversidade, as sequências foram normalizadas, permanecendo assim com 46.335 sequências.

No geral, as amostras coletadas antes do jejum prolongado possuem maior número de sequências (Tabela 2), com uma média de 54.714, contra 52.766 sequencias das amostras após o jejum, porém este número não reflete a quantidade de OTUs em cada amostra. As amostras que obtiveram menores quantidades de OTUs, foram as amostras do grupo experimental de serpentes magras, mesmo havendo aumento do número de sequencias após o jejum. Pode-se observar ainda que este mesmo grupo obteve também aumento do número de OTUs, assim como no grupo experimental das serpentes de escore corporal considerado como normal, chamando atenção para uma das amostras que teve redução dessa quantidade. Já no grupo das serpentes obesas, todas tiveram redução da quantidade de OTUs após o jejum prolongado.

Tabela 2. Número de sequências de DNA seguido por OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) observados por amostra.

Amostra	Grupo Experimental	Sequências de DNA Qualidade	Número de OTUs

OB.T0	Obesa antes do Jejum	54.786	232
OB.T0	Obesa antes do Jejum	61.686	277
OB.T0	Obesa antes do Jejum	57.095	278
NO.T0	Normal ante do Jejum	52.760	229
NO.T0	Normal ante do Jejum	57.538	290
NO.T0	Normal ante do Jejum	52.151	230
TH.T0	Magra antes do Jejum	58.314	233
TH.T0	Magra antes do Jejum	47.458	221
TH.T0	Magra antes do Jejum	50.638	195
OB.T50	Obesa após Jejum	47.249	228
OB.T50	Obesa após Jejum	54.715	244
OB.T50	Obesa após Jejum	51.278	240
NO.T50	Normal após Jejum	56.107	249
NO.T50	Normal após Jejum	52.104	239
NO.T50	Normal após Jejum	56.930	252
TH.T50	Magra após Jejum	53.629	233
TH.T50	Magra após Jejum	52.199	224
TH.T50	Magra após Jejum	50.683	205

5.5 Análise da Composição da Comunidade Bacteriana

Na análise geral de abundância relativa o filo mais representativo para todas as amostras foi Proteobacteria (69,4%), seguido de Bacteroidetes (19,2%) e Synergistetes (11,2%) (Figura 13). Porém, é necessário ressaltar que há diferenças

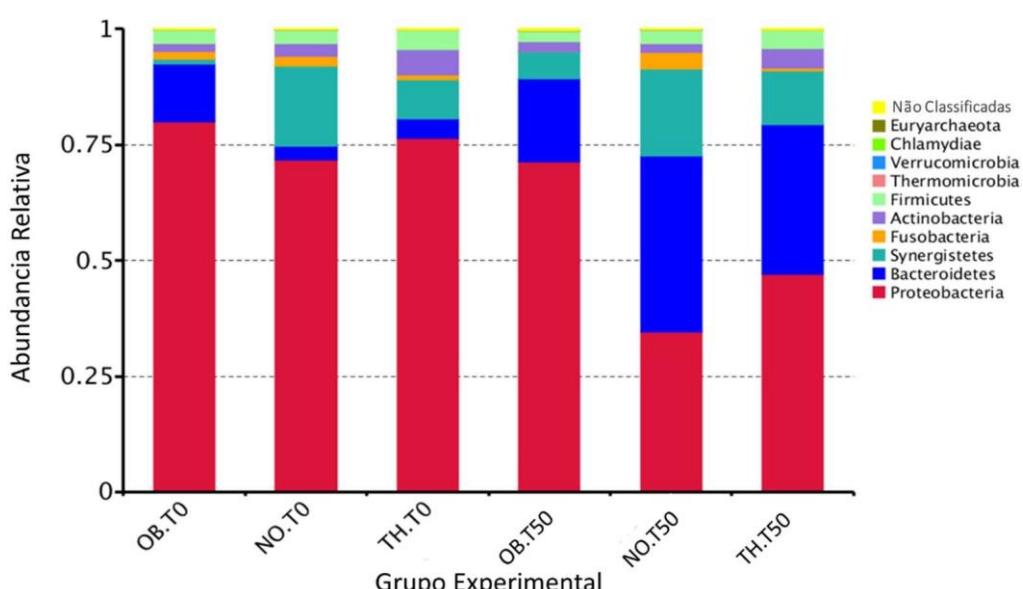


Figura 13. Gráfico da análise de abundância relativa de filos bacterianos da microbiota cloacal de *Crotalus durissus* de escore corporais diferentes. na representatividade dos filos Proteobacteria e Bacteroidetes quando comparados quanto ao tratamento (Tabela 3), antes e após o jejum prolongado. No grupo de serpentes obesas o filo Proteobacteria continuou sendo o grupo com maior abundância relativa nos dois momentos, com redução de 9,6%, bem como do filo

Bacteroidetes que reduziu 5,5%. Diferentemente, os grupos de serpentes normais e magras tiveram uma redução de 37,2% e 29,4% respectivamente do filo Proteobacteria e aumento da abundância relativa de 35% e 27,9% do filo Bacteroidetes respectivamente.

Tabela 3. Porcentagem de abundância relativa dos filos mais representativos dos grupos experimentais.

Grupo Experimental	Abundância Relativa - Filos (%)			
	Proteobacteria	Bacteroidetes	Synergistetes	Firmecutes
OB.T0	80,0	12,4	1,1	3,0
NO.T0	71,8	2,9	17,3	3,1
TH.T0	76,4	4,4	8,3	4,3
OB.T50	71,4	17,9	5,9	2,4
NO.T50	34,6	37,9	18,8	3,1
TH.T50	47,0	32,3	11,6	4,0

No diagrama de Venn (Figura 14) foi possível observar que houve compartilhamento de OTUs entre os grupos, bem como houveram OTUs que estavam presentes exclusivamente em um grupo experimental. Antes do jejum os grupos obtiveram 213 OTUs compartilhados que sofreram uma redução para 206 após o jejum prolongado, sugerindo que no geral, o tratamento teve influência nas comunidades bacterianas dos grupos, o que também foi possível observar quando analisados e comparados separadamente. É importante ressaltar que o aumento ou redução no número de OTUs, não necessariamente, reflete no aumento ou redução da riqueza de espécies em cada grupo, mas corrobora com os resultados obtidos da abundância relativa.

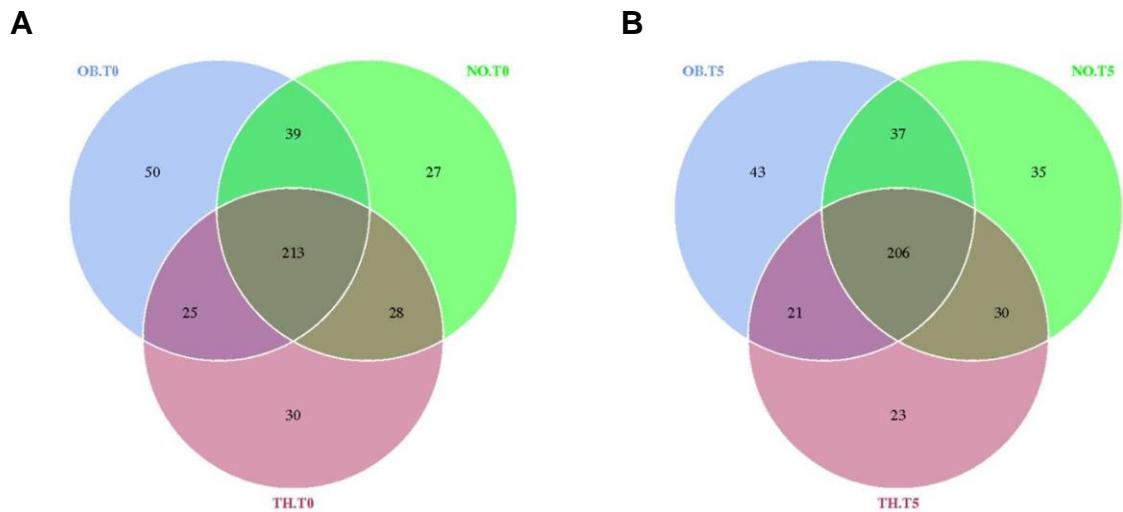


Figura 14. Diagrama de Venn representando, no centro e em sobreposição das figuras, o número de OTUs compartilhados entre os grupos experimentais e, nas extremidades, os OTUs que são exclusivos de cada grupo. (A) Antes do jejum; (B) Após o jejum prolongado.

O índice de diversidade Shannon (Figura 15) mostrou que antes do jejum os grupos de serpentes obesas e normais apresentaram maior riqueza de espécies, diferente do grupo das magras que demonstrou maior diversidade após jejum de 50 dias.

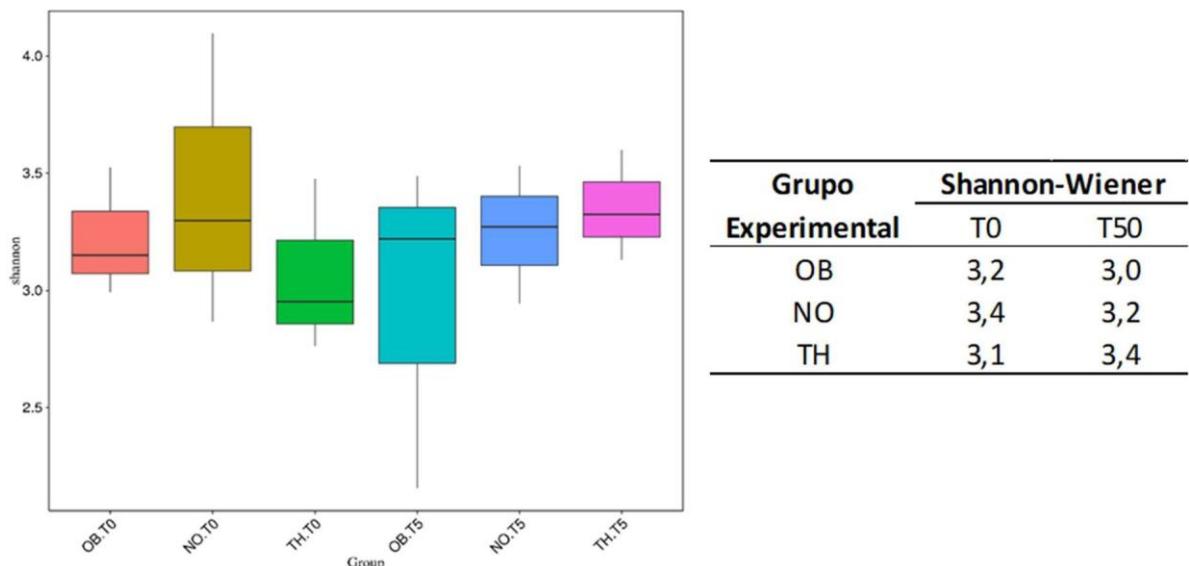


Figura 15. Alfa diversidade da microbiota cloacal de *Crotalus durissus* analisando os grupos experimentais em relação ao tratamento de jejum prolongado.

Ao traçar uma comparativo das comunidades bacterianas estimada, baseada nos OTUs observados, levando em consideração o tempo de jejum, a curva de rarefação demonstrou mudanças na quantidade de OTUs após atingir 46335 sequências (Figura 16). Este resultado permite afirmar que houve redução no número de OTUs após o jejum prolongado.

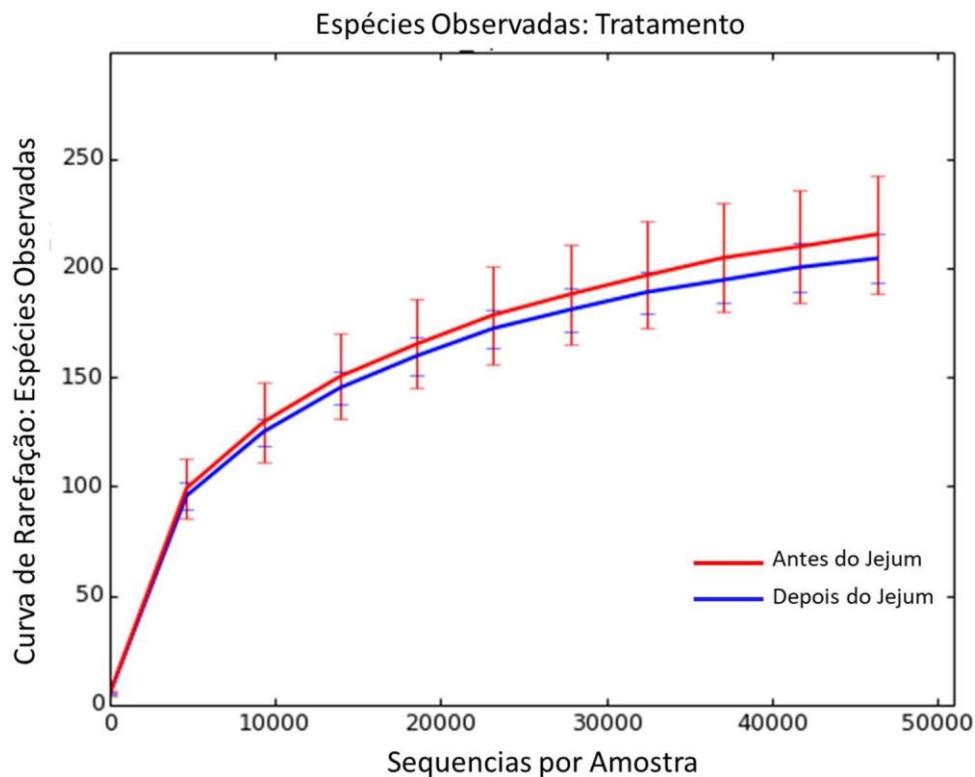


Figura 16. Curva de rarefação estimando número de OTU's observadas comparando os grupos antes e após o jejum prolongado

A beta diversidade, foi calculada por meio da análise dos componentes principais (PCA) (Figura 17), utilizando a métrica de distância ponderada (Weighted UniFrac) e mostrou similaridade da comunidade bacteriana entre as amostras analisadas, baseado no agrupamento dos OTUs, desta maneira, cada ponto do gráfico representa uma amostra e a cor o grupo experimental em que ela está inserida. Portanto, neste primeiro gráfico foi possível observar que, mesmo após o período de jejum prolongado, as amostras do Tempo 0 demonstraram similaridade com as amostras correspondentes do Tempo 50.

A análise de variância (Figura 18) demonstrou que os grupos experimentais possuem diferenças significantes entre suas comunidades, como pode ser observado

na nítida separação dos grupos em quadrantes diferentes, sugerindo que o jejum prolongado pode ter influenciado nas características das mesmas. Ainda assim é possível observar que as amostras que representam as serpentes obesas (pontos ligados por círculo vermelho representam o mesmo indivíduo), demostram maior proximidade das amostras dos grupos antes do jejum prolongado. Que corrobora com os resultados de abundância relativa, em que a proporção dos filos presentes nas amostras não demonstra variações significantes mediante ao jejum prolongado.

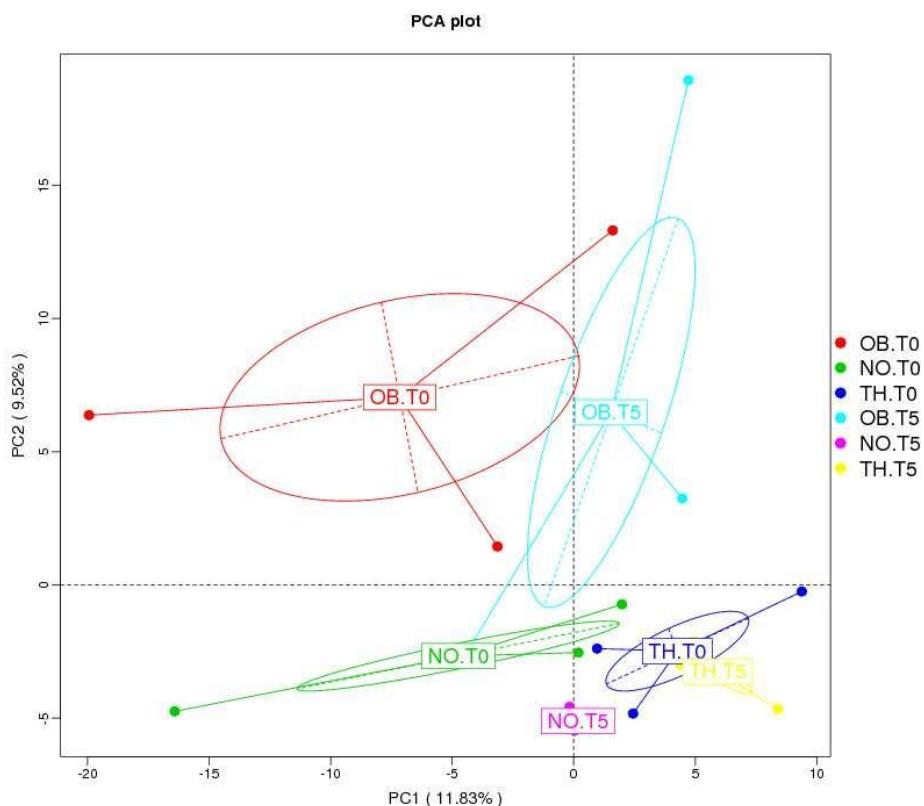


Figura 17. Gráfico espacial de Analise de Componentes Principais (PCA) utilizando matriz de distância Weighted UniFrac, mensurando a distância de cada amostra dentro do seu grupo e entre os grupos experimentais.

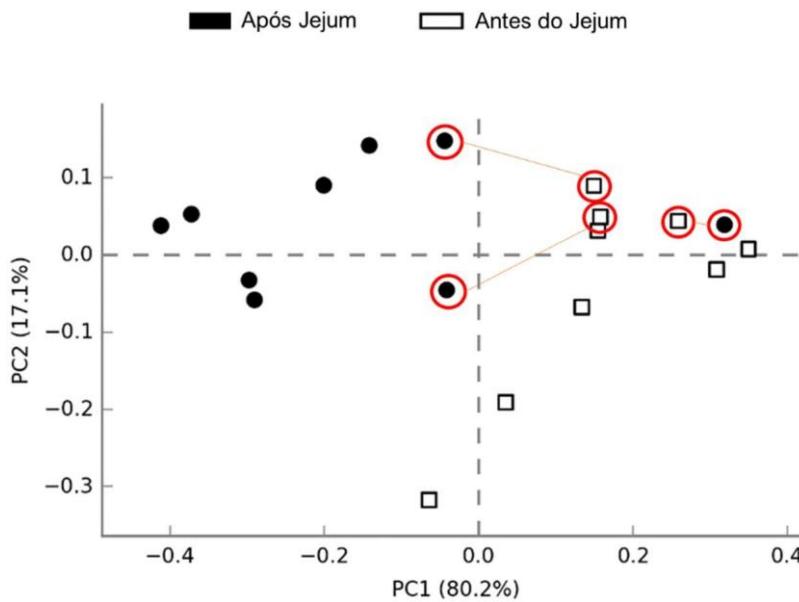


Figura 18. Análise de Variância (ANOVA), utilizando método de Tukey-Kramer de múltiplas comparações, com correção de Bonferroni ($p>0,05$) (com cobertura nominal de 99%).

Na análise do LEfSe para o presente estudo a metodologia foi aplicada em comparações par a par dentro dos grupos experimentais (OBESA.T0 – OBESA T50; NORMAL.T0 – NORMAL.T50 E MAGRA.T0 – MAGRA.T50), levando em conta assim, o tempo de jejum prolongado.

Ao comparar o grupo experimental de serpentes obesas, não houveram biomarcadores que diferenciassem os grupos, portanto não foi possível gerar um LDA e um cladograma deste grupo. No grupo experimental de serpentes normais (Figura 19A) foi possível observar os táxons que os diferenciam diante da condição a que foram impostas, desta maneira ressalta-se a alta abundância do filo Proteobacteria, incluindo duas famílias e dois gêneros, além da presença do gênero *Brucella* antes do jejum. Após 50 dias referente ao jejum prolongado houve um aumento significativo estatístico na abundância do filo Bacteroidetes. Já no grupo de serpentes magras (Figura 19B), assim como no das normais o filo Proteobacteria era mais abundante sendo característico da condição antes do jejum prolongado, passando a ter outra característica após os 50 dias, que é o aumento da abundância do filo Proteobacteria.

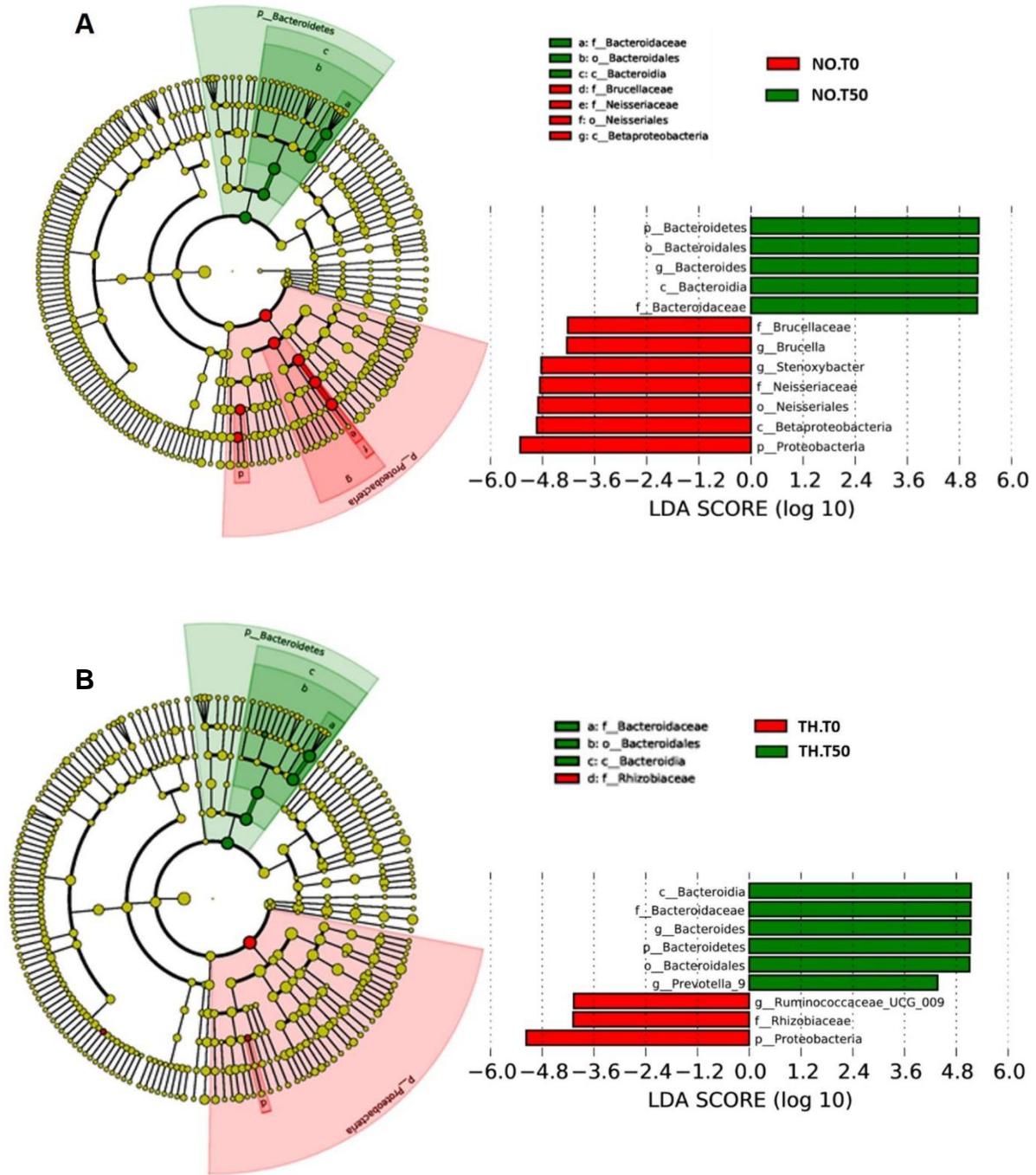


Figura 19. Resultado da análise do LEfSe com grau de diferença na abundância relativa. Histogramas LDA mostrando os táxons que dentre todos identificados representam as maiores diferenças estatísticas entre as comunidades e que as tornam como fenótipos de diferenciação da condição avaliada, neste estudo o jejum de 50 dias. Os cladogramas mostram os biomarcadores encontrados em que o diâmetro de cada nó é proporcional a abundância do táxon, além de terem contribuição significativa dentro do grupo a que está inserido. (A) Comparação de serpentes Normais (antes e após o jejum prolongado), mostrando os grupos diferenciais no LDA e 12 biomarcadores no cladograma com abundância diferencial. (B) Comparação de serpentes magras, no LDA os grupos diferenciais e oito biomarcadores. Resultado da análise do LEfSe com grau de diferença na abundância relativa. Histogramas LDA mostrando os táxons que dentre todos identificados representam as maiores diferenças estatísticas entre as comunidades e que as tornam como fenótipos de

Para os resultados estatísticos do presente estudo, foram feitas comparações par a par em que $p\text{-value} > 0,05$ para todas as amostras. Assim, foi possível verificar diferenças estatísticas significativas nos grupos de serpentes normais e magras (Figura 20). Os resultados permitiram afirmar que o jejum prolongado influenciou estatisticamente na abundância relativa dos filos Proteobacteria e Bacteroidetes, havendo aumento na abundância de OTUs do filo Bacteroidetes e redução do Proteobacteria, após o jejum. O grupo experimental de serpentes consideradas com escore corporal obesa, não tiveram significância estatística.

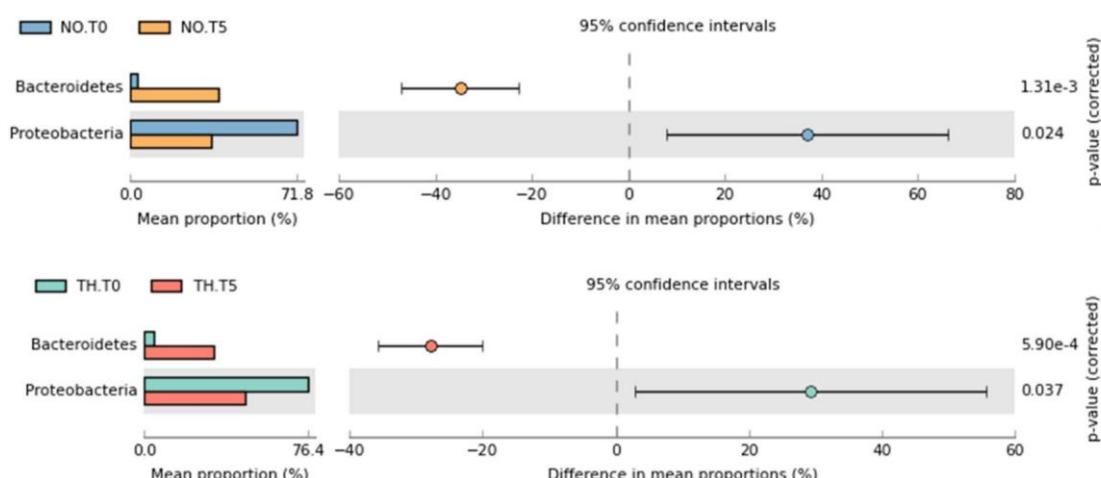


Figura 20. O gráfico a esquerda é a abundância dos filos mostrando significância entre a variação dos grupos, onde as barras representam as proporções médias de cada um. O gráfico do centro mostra o intervalo de confiança entre a diferença de proporção dos grupos analisados, assim o círculo representa o valor médio, a linha a esquerda representa o limite inferior e a direita, o limite superior. Os valores a direita do gráfico são p-value do teste de significância.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram apresentados resultados referentes ao desenvolvimento de uma tabela de classificação de escore da condição corporal para serpentes da espécie *Crotalus durissus* que receberam o mesmo manejo alimentar. Esse procedimento, ainda não publicado, possibilitou ter uma visão melhor da condição corporal do animal sem exames mais aprofundados. Dias (1991), afirma que analisar a condição corporal

do indivíduo de forma visual e tátil, independente de tamanho e/ou estado fisiológico a fim de se estimar o estado nutricional, é mais viável do que mensurar pelo peso vivo.

A classificação por escore corporal confere um rápido diagnóstico, pois após identificar o estado nutricional do indivíduo conforme sua espécie, encaminha-se o animal a exames específicos a fim de se confirmar o problema e buscar soluções. Segundo Mondini e Monteiro (1998), a desnutrição e obesidade são os distúrbios mais frequentemente observados.

O equilíbrio nutricional, ou seja, uma dieta que atenda as exigências do organismo, é aquela em que o indivíduo consome praticamente toda energia de sua dieta, sem que haja armazenamento ou escassez (GUIMARÃES; TUDURY, 2006).

Apesar do enriquecimento ambiental apropriado, o cativeiro torna-se para o animal capturado um fator limitante, Frye (1991), Scott (1992), Mader (1996) e Oliveira (2003) dão ênfase a obesidade em répteis cativeiros pelo fato de o animal ter alimento à disposição, sem que haja forrageamento e/ou gasto energético para adquirirem suas presas, como ocorre na natureza.

Além do manejo, estudos confirmam que a microbiota intestinal pode ter um papel importante em distúrbios como a obesidade, por se tratar de um microambiente composto de inúmeros gêneros, espécies bacterianas e sua modulação pode afetar tanto as colônias quanto o hospedeiro, refletindo nos processos fisiológicos relacionados aos sistemas metabólicos, nutricionais e imunológicos (LEITE et al., 2014).

Uma diversidade de microrganismos tem sido encontrada na microbiota intestinal de répteis, porém devido às condições seletivas e a composição dos meios de cultura, uma porção de microrganismos não podem ser cultivados (TORSVIK et al., 1990), porém a aplicação da técnica de PCR mostrou a alta diversidade e divergência de microrganismos não cultiváveis, quando comparado a minoria cultivável (HANDELSMAN, 2004).

A coleta ocorreu após sete dias da alimentação, pois com três dias já é possível observar alteração na configuração da microbiota intestinal devido a disponibilidade de nutrientes (SECOR, 2008). As amostras foram coletadas da cloaca, pois segundo

Colston et al. (2015), as amostras de cloaca possuem a amplitude da diversidade bacteriana encontrada no intestino da serpente avaliada.

Com este fim, a extração direta de DNA utilizando o kit DNeasy® PowerSoil® Kit (Qiagen) mostrou-se eficiente, uma vez que demonstrou concentrações satisfatórias, permitindo que as amostras seguissem para sequenciamento. Os kits comerciais, além de otimizarem o tempo entre a extração e o sequenciamento, garantem a pureza do DNA utilizando poucas quantidades da amostra. Este resultado pode ser alcançado quando há a padronização de um protocolo de extração direta. A extração de DNA é considerada um dos primeiros obstáculos a serem transpassados e o que define a continuidade dos trabalhos no que diz respeitos ao estudo da caracterização de microrganismos de um ambiente. A lise celular deve ser eficiente (REIS JUNIOR, 2002), pois o isolamento dos nucleotídeos é essencial para que as técnicas moleculares aplicadas funcionem.

A apresentação das amostras no gel de agarose vai depender da concentração de material genético obtido após a extração. No gel da extração (Figura 11) as amostras 1, 3, 7, 9 e 17 demonstraram bandas mais fracas, que podem ser explicadas pela tabela de quantificação de DNA (Tabela 1), ao representarem as amostras com menores quantidades em nanograma de material genético por microlitro de amostra. As diferenças nas concentrações podem ser atribuídas ao fato de a extração de ser feita a partir de *swab*, já que são necessárias padronizações no protocolo do kit para extração de DNA de solos, para assim, acessar o material genético contido na ponta de algodão do swab.

No gel com o produto da PCR, foram amplificadas bandas correspondentes a ~1500 pares de bases, já que se trata de uma técnica mais sensível, já que sintetiza cópias de fragmentos específicos do DNA alvo e gerar até cem bilhões de moléculas iguais em uma reação (MULLIS, 1990)

O sequenciamento metagenômico do gene 16S rDNA, permite a identificação eficiente de bactérias em um ambiente específico. Os produtos de amplificação PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de 16S rDNA de amostras múltiplas, recolhidos em vários locais e condições, são sequenciados a fim de efetuar a comparação dos

perfis de microrganismos entre as amostras (HANDELSMAN et al., 1998) fornecendo ainda a composição taxonômica da comunidade microbiana.

O presente estudo visou caracterizar a microbiota bacteriana de serpentes mediante a uma condição enfrentada na natureza, devido ao seu hábito alimentar, o jejum. E avaliar se a diferença no escore da condição corporal, que sofre variação quando impostas ao cativeiro, faria diferença nesta composição.

A caracterização fornece os primeiros dados que podem dar origem a trabalhos complementares. Uma pesquisa no sul da China, utilizou o sequenciamento do gene 16S rDNA para melhorar o manejo de serpentes de criação ao comparar a diversidade microbiota intestinal de quatro espécies (*Naja atra*, *Ptyas mucosus*, *Elaphe carinata*, e *Deinagkistrodon acutu*) (ZHANG et al., 2018).

A microbiota de *Crotalus durissus* cativas no Biotério UCDB tem dominância do filo Proteobacteria, seguido de Bacteroidetes e Synergistes quando em sua condição de alimentação. Um estudo com objetivo de conhecer a microbiota associada a *Crotalus horridus* mostrou que a dominância no trato gastrointestinal é de Proteobacteria, assim como relatado neste estudo, seguido de Firmicutes e Bacteroidetes, em proporções menores (MC LAUGHLIN, 2015).

A hipótese que pode explicar esta diferença é que o animal utilizado na pesquisa foi recém capturado da natureza, portanto não tem alimentação controlada, já que foram encontrados traços de DNA de moluscos e artrópodes, além de serem de localidades diferentes, neste caso América do Norte. Diferentemente deste estudo em que os animais foram alimentados com camundongos de produção e esterilização controlada. Diferenças na comunidade bacteriana pode ser atribuída a vários fatores, como localidade, tipo de alimentação e até mesmo espécie, como avaliado em lagartos (JIANG et al., 2017; KOHL et al., 2017; BESTION et al., 2017) camundongos (SCHMIDT et al., 2019), tartarugas (PRICE et al., 2017), morcego (WU et al., 2017).

Ao avaliar a comunidade bacteriana de diferentes regiões do trato gastrintestinal de serpentes *Agkistrodon piscivorus* (boca de algodão), Colston e colaboradores (2015) relataram que em amostras de cloaca o filo dominante foi Proteobacteria, bem

como o filo Bacteroidetes também aparece entre os três filos dominantes, que corrobora com o resultado do presente estudo.

Após o período de jejum prolongado, os grupos experimentais de *Crotalus durissus* normais e magras demonstraram aumento na abundância relativa de Bacteroidetes e redução da abundância relativa do filo Proteobacteria, como pode ser visto nos gráficos de abundância relativa (Figura 13; Tabela 3) e nos dados estatísticos gerados pela análise discriminatória linear (LEfSe) (Figura 19) e STAMP (Figura 20).

A análise LEfSe permite identificar as características biológicas responsáveis pelas relações dos grupos, através da descoberta de biomarcadores em dados metagenômicos. Gerando assim uma análise discriminante linear (LDA) que fornece a lista de características que são diferenciais entre as condições de interesse com significância estatística e biológica, classificando-as de acordo com o tamanho do efeito; e também um cladograma que mostra as diferenças significativas em cada nível hierárquico

Neste sentido, levando em consideração o jejum, Costello e colaboradores (2010), avaliaram a remodelação da microbiota do trato gastrointestinal de *Python molurus* nascidas em cativeiro, após um período de 30 dias de privação de alimento e constataram que o jejum é associado ao aumento da abundância e dominância do filo Bacteroidetes e presença dos filos Firmecutes, Proteobacteria e Synergistes, havendo ainda e redução da diversidade de todos os outros grupos presentes na microbiota bacteriana deste animal. O que explica a mudança na configuração da microbiota bacteriana mediante o jejum prolongado apresentada nesta pesquisa. Este resultado pode ser visto também no ceco de camundongos privados de alimentação por 24 horas (CRAWFORD et al., 2009).

Além da diferença na composição da microbiota bacteriana, as amostras apresentaram redução no número de OTUs observados (Figura 16) e também compartilhados (Figura 14), reforçados pela alfa diversidade que apresentou índice Shannon menor nas amostras após o jejum (Figura 15), corroborando com o resultado encontrado em *Python morulus* (Costello et al., 2010).

Os resultados apresentados no presente estudo para o grupo experimental de serpentes obesas demostraram um padrão junto aos outros grupos antes do jejum, porém não houveram alterações significativas na composição da microbiota bacteriana após o jejum prolongado, mantendo praticamente a mesma configuração, resultado este que reflete na falta de resultados estatísticos e na proximidade das amostras nos gráficos de PCA (Figura 17) e ANOVA (Figura 18).

A maioria dos estudos relacionados a serpentes tem sido voltados para ecologia e prospecção do veneno e poucos são os direcionados para microbiota de serpentes. Mas avanço das ferramentas moleculares auxiliou Hill e colaboradores (2008) a determinarem, pela primeira vez, a diversidade bacteriana presente no intestino de *Crotalus horridus* e *Agkistrodon piscivorus*, utilizando técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) a partir de fragmento do gene 16s rDNA, resultando em dominância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes.

Outra pesquisa observou alterações na microbiota bacteriana e fúngica das escamas da serpente *Sistrurus catenatus* devido a infecção por fungos da espécie *Ophidiomyces ophiodiicola* a partir do sequenciamento de amostras coletadas da pele com auxílio de um swab, onde a dominância foi do filo Proteobacteria, que apesar de abrigar a maior parte das espécies patogênicas, também tem os maiores biocontroladores de fungos que causam doenças em serpentes e anfíbios (ALLENDER et al., 2018). E Hill et al. (2018) isolou da pele de serpentes *Crotalus horridus* e *Coluber constrictor* microrganismos capazes de inibir o crescimento *Ophidiomyces ophiodiicola*.

Estudos utilizando técnicas independente de cultivo permitem também inventariar as comunidades microbianas da cavidade oral de serpentes afim de identificar espécies responsáveis por infecções secundárias provenientes de acidentes ofídicos. Neste sentido, quando avaliada a cavidade oral de serpentes *Naja naja*, *Ophiophagus hannah* e *Python morulus*, o filo Proteobacteria também foi o filo dominante, porém sugere que a microbiota oral pode variar dependendo do indivíduo, da espécie e da localização geográfica (KRISHNANKUTTY et al., 2018). Enquanto isso, ao inventariar a comunidade bacteriana da cavidade oral de *Bothrops insularis*, também foi possível testar antibióticos contra os gêneros dominantes (*Aeromonas hydrophyla*, *Morganella morganii*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Bacillus* spp., e *Enterococcus* spp.), propondo uma terapia antibiótica preventiva com cephalosporin (RÉSIÈRE et al., 2018).

Ainda assim, não há estudos que relacionem a microbiota de serpentes com seu estado nutricional ou condição corporal em cativeiro ou na natureza, portanto ao extrapolar as comparações a outros grupos animais com estudos relacionados a obesidade, foram observados que existe uma sinergia entre a proporção dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (LEY et al., 2005; SILVA et al., 2013) que interferem na eficiência de absorção de energia.

O filo Firmicutes, que está relacionado com a obtenção de energia, é favorecido pela dieta rica em gorduras e possui espécies com genes associados ao transporte de membrana, transcrição e motilidade celular, por outro lado esse tipo de dieta causa o declínio do filo Bacteroidetes (HILDEBRANDT et al., 2009).

No caso das serpentes consideradas como obesas, após o jejum prolongado houve um aumento de 5,5% na proporção de Bacteroidetes e redução de 0,6% de Firmecutes, quando privadas de nutrientes. Vale a pena ressaltar que em todos os grupos experimentais a proporção de Bacteroidetes foi maior do que Firmecutes.

Porém o que chama atenção nestes resultados é que a proporção de Proteobacteria, que é um filo com uma grande variedade de espécies patogênicas como *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Brucella*, este último atuando como diferencial na análise discriminante linear do grupo experimental de serpentes magras, é que este filo obteve redução de 8,6% em sua proporção nas serpentes obesas após o jejum.

Neste ponto é importante salientar que as pesquisas que avaliaram amostras diretamente do trato gastrointestinal ou conteúdo fecal obtiveram como resultado a dominância dos filos Bacteroidetes e Firmecutes (COSTELLO et al., 2010; HONG et al., 2014; KOHL et al., 2017;), diferentemente dos estudos que trabalharam com amostras de cloaca que obtiveram dominância de Proteobacteria (COLSTON et al., 2015; JIANG et al., 2017). Sugerindo que a predominância deste filo em cloaca pode ser uma condição normal.

Porém a maioria dos estudos no sentido de entender o papel da microbiota e sua relação com a saúde do hospedeiro tem sido direcionados apenas para humanos ou camundongos para aplicação humana (ZHANG, et al., 2012; WANG, et al., 2015; EVERARD, et al., 2014; GU et al., 2019), neste sentido estas pesquisas indicam que a abundância de filo Proteobacteria no trato gastrointestinal é baixa em indivíduos saudáveis e que o aumento ou estabilidade deste filo, pode ser um indicativo de distúrbios metabólicos ou inflamação intestinal. Afirma ainda, que uma microbiota equilibrada possui boa interação simbiótica com o sistema imunológico do hospedeiro, o que confere a capacidade de suprimir a proliferação do filo Proteobacteria (SHIN et al., 2015).

Para que seja possível confirmar a hipótese de distúrbios metabólicos ou inflamação intestinal no grupo experimental de serpentes obesas, seriam necessárias pesquisas complementares afim de verificar se os resultados das pesquisas citadas são aplicáveis as serpentes.

Quanto ao gênero *Brucella* que aparece como um grupo diferencial no LDA do grupo experimental de serpentes normais, há apenas um relato deste gênero em répteis. Ali e colaboradores (2018) testaram a presença de anticorpos de *Brucella* em lagartos, serpentes e tartarugas (n=34) no Paquistão. Do total de répteis na amostragem, 10 tartarugas foram positivas para a presença do anticorpo de *Brucella*. Portanto, exames complementares necessitam ser feitos para completar os resultados encontrados no presente estudo, para que desta forma, os animais possam ser encaminhados para o devido tratamento. Vale ressaltar que este é o primeiro registro do gênero *Brucella* em serpentes.

7. CONCLUSÃO

Com a tabela de classificação de escore da condição corporal proposta pelo presente estudo, foi possível separar os grupos experimentais deste estudo de maneira que os resultados apresentaram resultados satisfatórios diante dos objetivos

que foram propostos. Além de, futuramente, se tornar uma ferramenta auxiliar no manejo de serpentes da espécie *Crotalus durissus* em cativeiro.

A composição da microbiota cloacal das serpentes *Crotalus durissus* com diferentes escore corporais cativas no Biotério UCDB tiveram dominância dos filos, Proteobacteria e Bacteroidetes antes do jejum com uma redução na proporção do filo Proteobacteria nos grupos de serpentes Magras e Normais após 50 dias de jejum e sem alterações significantes na proporção do filo Proteobacteria no grupo experimental de serpentes Obesas. Além da redução no número de OTUs presente nas amostras após o jejum prolongado.

Ao comparar os grupos experimentais quanto ao número de OTUs, as serpentes obesas demonstraram maior quantidade de OTUs observados do que as normais e as magras antes e após o jejum prolongado, o que não significou um diferencial na riqueza de espécies, já que foi também o único grupo que não obteve significância estatística.

Com este estudo foi possível concluir que o jejum prolongado pode ter influência sobre a microbiota cloacal de serpente *Crotalus durissus*, exceto sobre os espécimes considerados obesos, se fazendo necessário exames complementares para a sugestão de síndrome metabólica e inflamação intestinal.

Vale ressaltar ainda que o presente estudo, além de uma caracterização da microbiota bacteriana cloacal, é o primeiro a relacionar os resultados com o escore da condição corporal de *Crotalus durissus*.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Mediante os resultados apresentados nesta pesquisa, até o presente momento, foi possível observar que o trabalho proposto de caracterização e análise de bioinformática, forneceu dados que permitiram a comparação da composição das comunidades bacterianas presentes na cloaca de *Crotalus durissus* mediante a uma

condição de jejum prolongado, além de fazer uma associação com sua classificação por escore corporal.

Diante dos avanços dos estudos com microbiota intestinal, suas funções e relações com a fisiologia de seus hospedeiros, os resultados de caracterização deste trabalho abrirão fronteiras para pesquisas complementares nesta área. Uma delas é contribuir para iniciativas que visem promover mudanças e melhorias no manejo alimentar de *Crotalus durissus* em cativeiro intensivo. E mais do que isso, entender que cada grupo animal e indivíduo dentro desse grupo, possui microbiota com características particulares de acordo com o ambiente em que está inserido, o tipo de alimento a que ele é submetido e seu estado de saúde.

Além disso, esta pesquisa fornece dados iniciais para uma nova estratégia de rápida avaliação de serpentes em cativeiro, através da classificação por escore da condição corporal, se tornando uma ferramenta auxiliar no manejo de serpentes em cativeiros.

9. REFERÊNCIAS

ABARCA JG, ZUNIGA I, ORTIZ-MORALES G, LUGO A, VIQUEZ-CERVILLA M, RODRIGUEZ-HERNANDEZ N, VÁZQUEZ-SÁNCHEZ F, MURILLO-CRUZ C, TORRES-RIVERA EA, PINTO-TOMÁS AA AND GODOY-VITORINO F. Characterization of the Skin Microbiota of the Cane Toad *Rhinella cf. marina* in Puerto Rico and Costa Rica. **Front. Microbiol.** 2018.

ALLENDER, M. C.; BACKER, S.; BRITTON, M.; KENT, A. D. Snake fungal disease alters skin bacterial and fungal diversity in an endangered rattlesnake. **Scientific Reports.** V. 8. Article number: 12147. 2018.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica.** v. 24, n. 1, p. 58-65. 2009.

ALLSTEADT, J.; SAVITZKY, A. H.; PETERSEN, C. E.; NAIK, D.N. Geographic variation in the morphology of *Crotalus horridus* (Serpentes: Viperidae). **Herpetological Monographs**, v. 20, p. 1-63. 2006.

ALI, S.; SALEEM, S.; IMRAN, M.; RIZWAN, M.; IQBAL, K.; QADIR, K.; AHMAD, H.; KHAN, W. A.; KHAN, I.; NEUBAUER, H. Detection of Brucella antibodies in selected wild animals and avian species in Pakistan. **Indian J Anim. Res** B-799:1-4. 2018.

ANDERSEN, J. B.; ROURKE, B. C.; CAIOZZO, V. J.; BENNETT, A. F.; HICKS, J. W. Physiology: Postprandial cardiac hypertrophy in pythons. **Nature** v. 434, p. 37–38. 2005.

ASHTON, K. G. Body size variation among mainland populations of the western rattlesnake (*Crotalus viridis*). **Evolution**. V. 55, n. 12, p. 2523-2533. 2001.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. Acidente crotálico. In: SCHVARTSMAN, S. Plantas e Animais Peçonhentos. São Paulo, Brasil, **Sarvier**, p. 161-170. 1992.

BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc Natl Acad Sci.**, USA. 2004.

BARRAVIEIRA, B. **Venenos**: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. 1. ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. 411p.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Répteis Brasileiros – Lista de espécies. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. 2015. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2015-03-Repteis.pdf>>. Acesso em: 16 mar 2018.

BESTION, E.; JACOB, S.; ZINGER, L.; DI GESU, L.; RICHARD, M.; WHITE, J.; COTE, J. Climate warming reduces gut microbiota diversity in a vertebrate ectotherm. **Nature Ecology & Evolution**, 10.1038/s41559-017-0161, 1, 6, (0161). 2017.

BLAUT, M; COLLINS, M. D.; WELLING, G. W.; DORÉ, J.; VAN LOO, J.; DE VOS, W. Molecular biological methods for studuing the gut microbiota: the EU human gut flora Project. **British Journal of Nutrition**, v. 87, Suppl. 2, p. S203-S211, 2002.

BOURSIER, J.; MUELLER, O.; BARRET, M.; MACHADO, M.; FIZANNE, L.; ARAUJO-PEREZ, F.; GUY, C. D.; SEED, P. C.; RAWLS, J. F.; DAVID, L. A.; HUNAULT, G.; OBERTI, F.; CALÈS, P.; DIEHL, A. M. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. **Hepatology**, v. 63, p. 764–775. doi: 10.1002/hep.28356. 2016.

BREGGE-SILVA, C.; NONATO, M. C.; ALBUQUERQUE, S. de; AZEVEDO, I. L. J. de; DINIZ, M. R. V.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; DIAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ARANTES, E. C. Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, v. 60, p. 1263–1276. 2012.

BRUNKWALL, L.; ORHO-MELANDER, M. The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilite. **Diabetologia**, v. 60. 2017.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. **Comstock Publishing Associates**: Ithaca, London. 2004

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N. PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, MCDONALD, D.; MUEGGE; B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**. May; 7(5):335-6. 2010.

CASTAÑEDA L. E.; BARBOSA O. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. **Crandall K**, ed. PeerJ. 2017.

CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339. 2007.

CHANG, H. X.; HAUDENSHIELD, J. S.; BOWEN, C. R.; HARTMAN, G. L. Metagenome-Wide Association Study and Machine Learning Prediction of Bulk Soil Microbiome and Crop Productivity. **Frontiers in Microbiology**. 2017.

CLEMENTE, J. C.; URSELL, L. K.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, p. 1258–1270. 2012.

COLSTON, T. J.; NOONAN, B. P.; JACKSON, C. R. Phylogenetic analysis of bacterial communities in difrente regions of the gastrointestinal tract of *Agristron piscivorus*, the Cottonmouth snake. **Plos one**. Canada. 2015.

COSTELLO, E. K.; GORDON, J. I.; SECOR, S. M.; KNIGHT, R. Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons. **ISME**, v. 4, n. 11, p. 1375-1385. 2010.

CRAWFORD, P. A.; CROWLEY, J. R.; SAMBANDAM, N.; MUEGGE, B. D.; COSTELLO, E. K.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. L. Regulation of myocardial ketone body metabolism by the gut microbiota during nutrient deprivation. **Proc Natl Acad Sci**, v.106, p. 11276–81. 2009.

DETHLEFSEN, L.; ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; RELMAN, D. A.; Assembly of the human intestinal microbiota. **Trends Ecol Evol**. v. 21, p. 517–523. 2006.

DIAS, F. M. G. N. **Efeito da condição corporal, razão peso/altura e peso vivo sobre o desempenho reprodutivo pós-parto de vacas de corte zebuínas**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. pp. 100. 1991.

EVERARD, A.; LAZAREVIC, V.; GAÏA, N.; JOHANSSON, M.; STÅHLMAN, M.; BACKHED, F.; DELZENNE, N.M.; SCHRENZEL, J.; FRANÇOIS, P.; CANI, P.D. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesit.. **ISME J**. 8, 2116–2130. 2014.

FRYE, F. L. Reptile care: an atlas of diseases and treatments. **Neptune City**, pp. 633. 1991.

GAJARDO, K.; RODILES, A.; KORTNER, T. M.; KROGDAHL, A.; BAKKE, A. M.; MERRIFIELD, D. L.; SORUM, H. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research. **Sci. Rep.**, v. 6. 2016.

GRAY, M. W.; SANKOFF, D.; CEDERGREN, R. J. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 14, p. 5837–5852, apr. 1984.

GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. R.; KOLESNIKOVAS, C. K. M. **Squamata (Serpentes)**. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Org.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2015. 1 v. p. 186-218.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiol. Rev. Biol Mol**, v. 68, p. 669-685. 2004.

HANNING, I.; DIAZ-SANCHEZ, S. The functionality of the gastrointestinal microbiome in non-human animals. **Microbiome**, v. 3. 2015.

HARRIS, R. N.; BRUCKER, R. M.; WALKE, J. B.; BECKER, M. H.; SCHWANTES, C. R.; FLAHERTY, D. C.; LAM, B. A.; WOODHAMS, D. C.; BRIGGS, C. J.; VREDENBURG, V. T.; MINBIOLE, K. P. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. **ISME J.**, v. 3, p. 818–824. 2009.

HILL, J.G. III; HANNING, I.; BEAUPRE, S.J.; RICKE, S.C.; SLAVIK, M.M. Denaturing gradient gel electrophoresis for the determination of bacterial species diversity in the gastrointestinal tracts of two crotaline snakes. **Herpetological Review**, 39, 433–438. 2008.

HILL, A.J.; LEYS, J.E.; BRYAN, D.; ERDMAN, F.M.; MALONE, K.S.; RUSSELL, G.N.; APPLEGATE, R.D.; FENTON, H.; NIEDRINGHAUS, K.; MILLER, A.N. Common cutaneous bacteria isolated from snakes inhibit growth of *Ophidiomyces ophiodiicola*. **EcoHealth** 15:109–120. 2018.

HILDEBRANDT, M. A. et al. High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1716-1724, nov. 2009.

JIANG, H. Y.; MA, J. E.; LI, J.; ZHANG, X. J.; LI, L. M.; HE, N.; LIU, H. Y.; LUO, S. Y.; WU, Z. J.; HAN, R. C.; CHEN, J. P.; CHEN, J. P. Diets Alter the Gut Microbiome of Crocodile Lizards. **Frontiers in Microbiology**, v. 8. 2017.

KIM, M.; PARK, T.; YU, Z. Metagenomic investigation of gastrointestinal microbiome in cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 11, p. 1515-1528. 2017.

KLAUBER, L. M. Rattlesnakes, their habits, life histories and influence on mankind. **California**: Berkeley California Univ. Press. 1982

KOSIEWICZ, M. M.; ZIRNHELD, A. L.; ALARD, P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. **Front Microbial**. v. 2, p.1-11, 2011.

KRISHNANKUTTY, S. P; MURALEEDHARAN, M.; PERUMAL, R. C.; MICHAEL, S.; BENNY, J.; BALAN, B.; KUMAR, P.; MANAZHI, J.; KUMAR, B. D.; SANTHOSH, S.; THOMAS, G.; GUPTA, R. G.; ZACHARIAH A. Next-generation sequencing analysis reveals high bacterial diversity in wild venomous and non-venomous snakes from

India. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.** 24:41. 2018.

LAM Y. Y.; MAGUIRE, S.; PALACIOS, T.; CATERSON, I. D. Are the Gut Bacteria Telling Us to Eat or Not to Eat? Reviewing the Role of Gut Microbiota in the Etiology, Disease Progression and Treatment of Eating Disorders. **Nutrients.** v. 6.

LAMEU, C.; HAYASHI, M. A.; GUERREIRO, J. R.; OLIVEIRA, E. F.; LEBRUN, I.; PONTIERI, V.; MORAIS, K. L.; CAMARGO, A. C.; ULRICH, H. The central nervous system as target for antihypertensive actions of a proline-rich peptide from *Bothrops jararaca* venom. **Cytometry**, v. 3, p. 220-230. 2010.

LEE, M. L.; TAN, N. H.; FUNG, S. Y.; SEKARAN, S. D. Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 153, n. 2, p. 237-42. 2011.

LEY, R. E., BACKHED, F., TURNBAUGH, P., LOZUPONE, C., KNIGHT, R., GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 102, p. 11070–11075. 2005.

MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery.** Philadelphia: WB Saunders Company, 1996. 512 p.

MADER, D. R. **Reptile Medicine and Surgery.** 2. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. p. 608.

MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A.; SAZIMA, I. **Snakes of the Brazilian Atlantic forest:** an illustrated field guide for the Serra do Mar Range. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 182.

MARTIN, R.; MIQUEL, S.; LANGELLA, P.; BERMUDEZ-HUMARAN, L. G. The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. **Virulence**, v. 5, p. 413–423. 2014.

MAYER, J. Nutritional problems in reptiles: many ailments in herpetology are related to diet. In: **Veterinary Practice News.** California, USA 2008. Disponível em: <http://www.veterinarypracticenews.com/vet-dept/avian-exotic-dept/nutritional-relateddiseases-in-reptiles.aspx>. Acesso em: 22 mar 2018.

MCLAUGHLIN, R. W.; COCHRAM, P. A.; DOWD, S. E. Metagenomic analysis of the gut microbiota of the Timber Rattlesnake, *Crotalus horridus*. **Mol Biol Rep**, v. 42, p. 1187–1195. 2015.

MELGAREJO-GIMENEZ, A. R. Criação e manejo de serpentes. In: ANDRADE A.; PINTO S.R.; OLIVEIRA R.S. **Animais de laboratório - criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2002. p. 175-200.

MINISTERIO DA SAÚDE: **Acidentes por animais peçonhentos – Serpentes**. Disponível em: <http://portalsms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>. Acesso em: 20 mar 2018.

MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, 1 jul. 2013.

MOSMANN, M.N. **Guia das Principais Serpentes do Mundo**. Canoas, RS: Editora ULBRA, 2001. v. 1, p. 21.

MULLER, V. D.; RUSSO, R. R.; CINTRA, A. C.; SARTIM, M. A.; PAIVA, R. de M. A.; FIGUEIREDO, L. T.; SAMPAIO, S. V.; AQUINO, V. H. Crot toxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, p. 507–515. 2012

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990

NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R; MARTINS, M. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in Brazilian Cerrado. **J. Herpetol**, v. 37, n. 4, p. 653-659. 2003.

OLIVEIRA, M. E. E. S. **História natural de jararacas brasileiras do grupo *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae)**. Unpublished Ph. D. Thesis, Universidade Estadual Paulista. 2003.

OLAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMERAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G. A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPPOULOS, I. Metagenomics : Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. **Bioinformatics and Biology Insights**. p. 75–88, 2015.

PAIVA, R. de M. A.; FIGUEIREDO, R. de F.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; LOUDES, P. B. M. de; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.;

LINHARI, R. P. R. C.; MARTINS, C. H.; ALBUQUERQUE, S. de; SAMPAIO, S. V. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 941-7. 2011.

PAIVA, M. I. S. **Manejo de serpentes em cativeiro**: análise da infraestrutura, saúde animal e enfermidades virais e parasitárias. 2015. 95. Dissertação – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, 2015

PARANZINI, C. S.; TEIXEIRA, V. N.; TRAPP, S. M. Principais distúrbios nutricionais encontrados em répteis cativeiros – revisão bibliográfica. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 10, n. 2, p. 29- 38. 2008.

PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R.G. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, 30, 3123-3124. 2014.

PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN, P. A. den B.; SSTOBBERINGH, E. E. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, p. 511–521. 2006.

PRICE, J. T.; PALADINO, F. V.; LAMONT, M. M.; WITHERINGTON, B. E.; BATES, S.; SOULE, T. Characterization of the juvenile green turtle (*Chelonia mydas*) microbiome throughout an ontogenetic shift from pelagic to neritic habitats. **PLOS ONE**. 10.1371/journal.pone.0177642, 12, 5, (e0177642). 2017.

RÉSIÈRE, D., OLIVE, C., KALLEL, H., CABIÉ, A., NÉVIÈRE, R., MÉGARBANE, B., GUTIÉRREZ, J. M., MEHDAOUI, H. Oral Microbiota of the Snake *Bothrops lanceolatus* in Martinique. **International journal of environmental research and public health**, 15(10). 2018.

SALOMAO, M. da G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PUORTO, G. Activity pattern of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): feeding, reproduction, and snakebite. **Studies of Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, p. 101-106. 1995.

SANTAMARÍA, C.; LARIOS, S.; QUIRÓS, S.; PIZARRO-CERDA, J.; GORVEL, J. P.; LOMONTE, B.; MORENO, E. Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom lys49 phospholipase A2. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1340–1345. 2005.

SANTA RITA, P. H. **Determinação de parâmetros sanitários em serpentes peçonhentas mantidas em cativeiro intensivo**. 2018. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2018.

SANTOS, G. O.; GALLI, G. R. O. Afecções mais frequentes que acometem serpentes cativas. **Rev. Conexão Eletrônica**. Três Lagoas, MS, v. 14, n. 1. 2017.

SCHMIDT, E.; MYKYTCZUK, N.; SCHULTE-HOSTEDD, A. I. Effects of the captive and wild environment on diversity of the gut microbiome of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). **The ISME Journal**, 10.1038/s41396-019-0345-8. 2019.

SCOTT, P. W. Nutritional diseases. In: LAWTON, M. P. C.; COOPER, J. E. **Manual of reptile**. British Small Animal Veterinary Association. Poole, Dorset: J. Looker Printers. p. 138 – 152. 2002.

SECOR, S. M.; DIAMOND, J. A. Vertebrate model of extreme physiological regulation. **Nature**, v. 395, n. 6703, p. 659-62. 1998.

SECOR, S. M. Digestive physiology of the Burmese python: Broad regulation of integrated performance. **J Exp Biol**. 211:3767–3774. 2008.

SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; GEVERS, D.; MIROPOLSKY, L.; GARRETT, W.S.; HUTTENHOWER, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biol** 12.6 (2011): R60.

SERAPICOS, E. O.; CASAGRANDE, R. A.; MATUSHIMA, E. R.; MERUSSE, J. L. B. Alterações macro e microscópicas observadas em serpentes *Micrurus corallinus* mantidas em biotério (Reptilia – Ophidia – Elapidae). **Rev. Port. Cienc. Vet.**, v. 100, n. 554, p. 71-74. 2005.

SHIN, N.; WHON, T. W.; BAE, J. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. **Trends in Biotechnology**. vol. 33, No. 9. 2015.

SHUKLA, S. D.; BUDDEN, K. F.; NEAL, R.; HANSBRO, P. M. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. **Clinical & Translational Immunology**, v. 6. 2017.

SINAN. **Acidentes por animais peçonhentos – notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação**. SINAN net. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 09 fev 2018.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota-- masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 227- 238. 2013.

STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p. 105-111. 2005.

TANASOV, V. S.; FURTADO; M.F.D.; SALOMÃO, M.G. Avaliação dos impactos causados pelos procedimentos de permuta de serpentes no Brasil em cem anos do Instituto Butantan. **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural**. São Paulo, n. 6, p. 1-48. 2003

TANNOCK, G. W. New perceptions of the gut microbiota: implications on future research. **Gastroenterology Clinics of North American**, v. 34, p. 361-382. 2005.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**. v. 2, n. 1, p. 3, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science translational medicine**, v. 1, n. 6, p. 6-14. 2009.

UETZ, P.; FREED, P.; HOŠEK, J. **The Reptile Database**. Disponível em:<http://www.reptiledatabase.org>http://reptiledatabase.reptarium.cz/species?genus=Crotalus&species=durissus&search_param=%28%28search%3D%27crotalus%27%29%29. Acessado em: 12 mar 2018.

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Ecologia e nomes populares de *Crotalus durissus collilineatus* (Amaral, 1926) em áreas sob efeito antrópico do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 14, n. 1, 2, 3, p. 71 – 79. 2012.

WAITE D. W.; TAYLOR M. W. Exploring the avian gut microbiota: current trends and future directions. **Front. Microbiol**, v. 6, n. 673. 2015.

WANG, W. L.; XU, S. Y.; REN, Z. G.; TAO, L.; JIANG, J. W.; ZHENG, S. S. Application of metagenomics in the human gut microbiome. **World Journal of Gastroenterology**, v. 3, p. 803-814. 2015.

WANG, J.; TANG, H.; ZHANG, C.; ZHAO, Y.; DERRIEN, M.; ROCHER, E.; VAN-HYLCKAMA VLIEG, J.E.; STRISSEL, K.; ZHAO, L.; OBIN, M.; SHEN, J. Modulation

of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. **ISME J.** 9, 1–15. 2015.

WATANABE, M.; FONSECA, C. D.; VATTIMO, M. F. F. Aspectos instrumentais e éticos da pesquisa experimental com modelos animais. **Rev. Esc. Enferm.**, USP, v. 1. 2014.

WOESE, C.R., AND FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 74, p. 5088-5090. 1977.

WU, H.; XING, Y.; SUN, H.; MAO, X. Gut microbial diversity in two insectivorous bats: Insights into the effect of different sampling sources. **Microbiology Open**, e00670. 2018.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLÖCKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B.; EUZÉBY, J.; AMANN, R.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 635-645. 2014.

YING-XIA, L.; ZHI-YU, Z.; RUI, Z. Behaviroal and morfological evidence for the involvement of glial cells in the antinocicptive effect of najaanalgesin in a rat neuropathic pain model. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, n. 6, p. 850-854. 2012.

ZHANG, Y. J.; LI, S.; GAN, R. Y.; ZHOU, T.; XU, D. P.; LI, H. B. Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, n. 4, p. 7493–7519. 2015.

ZHANG, B.; REN, J.; YANG, D.; LIU, S.; GONG, X. Comparative analysis and characterization of the gut microbiota of four farmed snakes from southern China. **PeerJ Preprints** 6:e27193v1. 2018.

ZHANG, C.; ZHANG, M.; PANG, X.; ZHAO, Y.; WANG, L.; ZHAO, L. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. **ISME J.** 6, 1848–1857. 2012.

GU, Y.; LIU, C.; ZHENG, N.; JIA, W.; ZHANG, W.; LI, H. Metabolic and gut microbial characterization of obesity-prone mice under high-fat diet. **Journal of Proteome Research**. 2019. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.8b00945>> acesso em Março/2019.

ANEXO



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
COMISSÃO PARA USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Influência do jejum na modulação da microbiota cloacal de *Crotalus durissus* de diferentes escore corporais."**, registrada com o nº 022/2017, sob a responsabilidade de Alinne Pereira de Castro, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Católica Dom Bosco em reunião de 19/10/2017.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	19/10/2017 - 19/10/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Crotalus durissus</i>
Nº de animais	12
Peso/Idade	---
Sexo	Macho / Fêmea
Origem	Biotério UCDB