

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM**  
**CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA**

**Determinação de Parâmetros Sanitários em Serpentes**

**Peçonhentas Mantidas em Cativeiro Intensivo**

Autora: Paula Helena Santa Rita

Orientador: Professor Doutor Heitor Miraglia Herrera

Campo Grande - Mato Grosso do Sul

Fevereiro – 2018

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM**  
**CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA**

**Determinação de Parâmetros Sanitários em Serpentes  
Peçonhentas Mantidas em Cativeiro Intensivo**

Autora: Paula Helena Santa Rita

Orientador: Professor Doutor Heitor Miraglia Herrera

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva Aplicada ao Agronegócio e Produção Sustentável.

Campo Grande - Mato Grosso do Sul

Fevereiro – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

L533p Santa Rita, Paula Helena

Determinação de parâmetros sanitários em serpentes peçonhentas mantidas em cativeiro intensivo. / Paula Helena Santa Rita; orientador Heitor Miraglia Herrera.-- 2018.

96 f.+ anexos

Tese (doutorado em ciências ambientais e sustentabilidade agropecuária) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2018

1. Serpentes peçonhentas - Brasil. 2. Hematologia.
3. Bioquímica. 4. Termografia. I.Herrera, Heitor Miraglia. II. Título.

CDD: 597.9



**Avaliação de parâmetros sanitários em serpentes peçonhentas mantidas em cativeiro intensivo**

**Autor(a):** Paula Helena Santa Rita

**Orientador:** Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera

**TITULAÇÃO:** Doutor em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecúaria

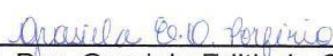
**Área de Concentração:** Sustentabilidade Ambiental e Produtiva.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera - UCDB

(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa - UCDB

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Grasiela Edith de Oliveira Porfírio - UCDB

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sávio Freire Bruno - UFF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Henrique Duarte Cançado - EMBRAPA

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS e seus mensageiros por me guiarem e ampararem em todos os meus minutos de vida.

Ao meu anjo da guarda “Toks”.

Ao meu saudoso avô Benedicto Hermínio Santa Rita, que sempre me dava a sua benção com as seguintes palavras: “ – Que DEUS sempre te abençoe com o mais valioso dom: o dom de receber o conhecimento e saber aplicá-lo para o bem! ”

A minha saudosa avó Laurinda Oliveira Santa Rita que não mediu esforços para proporcionar às filhas e netas a oportunidade de seguirem uma vida acadêmica.

A minha família: mãe (Glória Maria Santa Rita) e tias (Gilse Yara Santa Rita e Lucy Nélia Santa Rita), que de alguma forma sempre estiveram e se mantêm ao meu lado principalmente para me erguerem de meus tropeços e tombos, que não foram poucos, ao longo de toda minha jornada.

A Laura Urquiza, amiga e companheira de todas as horas.

Ao meu orientador, Dr. Heitor Miraglia Herrera pelo tempo dedicado e pelos ensinamentos valiosos, entre eles a humildade e o respeito aos seres humanos.

Ao amigo Dr. Júlio Souza pela paciência e tempo dispensados a mim e pelas contribuições estatísticas e bibliográficas.

A amiga Dr<sup>a</sup>. Magyda Dahroug Moussa pela paciência e pelos valiosos ensinamentos acadêmicos e de vida.

Aos meus amigos, Luan Figueiró, Herbert Patric Kellermann Cleveland e Marina Lima que acompanharam e desenvolveram esse experimento com dedicação e responsabilidade, e pela paciência em permanecer ao meu lado mesmo nos momentos críticos.

Aos estagiários do Biotério/UCDB.

A Universidade Católica Dom Bosco, pela bolsa excelênciа, pelo espaço físico e materiais que foram utilizados no presente trabalho.

A “todos aqueles” que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os animais que doaram muitos dias de suas vidas e de sua liberdade a serviço do conhecimento gerado neste estudo.

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>Serpentes peçonhentas no Brasil .....</b>	<b>19</b>
<b>A importância da pesquisa com venenos de serpentes.....</b>	<b>22</b>
<b>Fatores que afetam a produção e composição de veneno .....</b>	<b>23</b>
<b>Fisiologia do estresse em répteis.....</b>	<b>24</b>
<b>Hematologia no monitoramento da sanidade de serpentes cativas .....</b>	<b>29</b>
<b>Bioquímica no monitoramento da sanidade de serpentes cativas.....</b>	<b>39</b>
Ureia .....	39
Creatinina .....	41
Alanina Amino Transferase (ALT).....	41
Fosfatase Alcalina (FA).....	42
<b>Exame Clínico .....</b>	<b>42</b>
<b>Termografia em Serpentes.....</b>	<b>44</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
<b>Origem das serpentes .....</b>	<b>46</b>
<b>Animais .....</b>	<b>46</b>
<b>Manutenção dos animais .....</b>	<b>47</b>
<b>Manejo de higienização dos ambientes e de alimentação dos animais.....</b>	<b>47</b>
<b>O manejo para a colheita de material biológico .....</b>	<b>47</b>
<b>Hemograma .....</b>	<b>49</b>
<b>Exame Bioquímico .....</b>	<b>51</b>
<b>Exame Físico e Clínico dos animais.....</b>	<b>51</b>
<b>Mensuração da temperatura .....</b>	<b>54</b>
<b>Análise Estatística .....</b>	<b>55</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>

<b>Análises morfométricas .....</b>	<b>57</b>
<b>Análises clínicas .....</b>	<b>58</b>
<b>Análises hematológicas .....</b>	<b>59</b>
<b>Análises bioquímicas .....</b>	<b>64</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>

## LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Valores médios, desvios padrão e valores máximos e mínimos dos parâmetros morfométricos das serpentes <i>Bothrops alternatus</i> , <i>Bothrops mattogrossensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Crotalus durissus</i> .....	5
Tabela 2. Valores médios, desvios padrão e valores máximos e mínimos dos parâmetros clínicos das serpentes <i>Bothrops alternatus</i> , <i>Bothrops mattogrossensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Crotalus durissus</i> .....	5
Tabela 3. Valores médios, desvios padrão e valores máximos e mínimos dos parâmetros hematológicos das serpentes <i>Bothrops alternatus</i> , <i>Bothrops mattogrossensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Crotalus durissus</i> .....	6
Tabela 4. Diferenças entre os valores médios para heterófilos, linfócitos, monócitos e basófilos das espécies de serpentes peçonhentas <i>Bothrops alternatus</i> , <i>Bothrops mattogrossensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Crotalus durissus</i> , mantidas no Biotério da UCDB. ....	6
Tabela 5. Influência de espécie, subgrupo, sexo, condição corporal e período de coleta nos os valores hematológicos e bioquímicos. ....	6
Tabela 6. Valores médios, desvios padrão e valores máximos e mínimos dos parâmetros bioquímicos das serpentes <i>Bothrops alternatus</i> , <i>Bothrops mattogrossensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Crotalus durissus</i> .....	6
Tabela 7. Valores médios de hematócrito (%) das serpentes <i>Bothrops alternatus</i> , <i>Bothrops mattogrossensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Crotalus durissus</i> , descritos por três diferentes autores. ....	7
Tabela 8. Valores médios de eritrócitos ( $10^3$ células/mm $^3$ ) das serpentes <i>Bothrops alternatus</i> , <i>Bothrops mattogrossensis</i> , <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Crotalus durissus</i> , descritos por três diferentes autores. ....	7

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Exemplar de <i>Bothrops alternatus</i> .....	20
Figura 2. Exemplar de <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	21
Figura 3. Exemplar de <i>Bothrops moojeni</i> .....	21
Figura 4. Exemplar de <i>Crotalus durissus</i> .....	22
Figura 5. Eritrócitos em esfregaço sanguíneo de <i>B. alternatus</i> .....	31
Figura 6. Esfregaço sanguíneo de <i>C. durissus</i> evidenciando trombócito (seta vermelha), linfócito (seta preta), azurófilo (seta azul) e eritócito (seta cinza).....	32
Figura 7. Heterófilo em esfregaço sanguíneo de <i>B. alternatus</i> .....	33
Figura 8. Eosinófilo em esfregaço sanguíneo de <i>B. moojeni</i> .....	34
Figura 9. Basófilo em esfregaço sanguíneo de <i>B. mattogrossensis</i> .....	35
Figura 10. Linfócito de um testudine, <i>Gopherus agassizii</i> .....	36
Figura 11. Monócito de um lacertídeo, <i>Iguana iguana</i> . .....	37
Figura 12. Azurófilo de um boideo, <i>Python molurus bivittatus</i> .....	38
Figura 13. Procedimento de contenção da serpente.....	48
Figura 14. Procedimento de colheita de sangue utilizando a veia coccígea. ....	50
Figura 15. Representação da coloração da mucosa oral das serpentes. Sendo, A= Hipocorada; B= Normocorada; C= Hipercorada.....	52
Figura 16. Processo de auscultação para avaliação de parâmetros cardíaco e respiratório. .....	53
Figura 17. Imagens termográficas das serpentes antes de serem alocadas em um colchão térmico temperatura basal (T <sub>b</sub> ), e após serem retiradas do mesmo, temperatura secundária (T <sub>s</sub> ). Onde, A = T <sub>b</sub> , B = T <sub>s</sub> . .....	54
Figura 18. Regiões da superfície corpórea das serpentes que foram mensuradas as temperaturas. Onde RA= Região anterior, RM= Região mediana e RP= Região posterior. .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Adrenocorticotrófico
ALT	Alanina Amino Transferase
Azu	Azurófilo
<i>B. alternatus</i>	<i>Bothrops alternatus</i>
<i>B. mattogrossensis</i>	<i>Bothrops mattogrossensis</i>
<i>B. moojeni</i>	<i>Bothrops moojeni</i>
Bas	Basófilo
C°	Celsius
<i>C. durissus</i>	<i>Crotalus durissus</i>
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CEUA	Comitê de Ética e Utilização de Animais
CHR	Corticotrofina
CO2	Gás Carbônico
CREAT	Creatinina
CT	Comprimento total
Eos	Eosinófilos
Eri	Eritrócito
FA	Fosfatase Alcalina
FC	Frequência cardíaca

FR	Frequência respiratória
Het	Heterófilos
HPA	Hipotálamo-pituitário-adrenocortical
Ht	Hematócrito
IMASUL	Instituto do Meio Ambiente do Mato Grosso do Sul
Leu	Leucócito
Lin	Linfócitos
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro Cúbico
Mon	Monócitos
P	Peso
PMA	Polícia Militar Ambiental
PPT	Proteína Plasmática Total
RA	Região Anterior
RM	Região Mediana
RP	Região Posterior
SAS	Statistical Analysis System
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SP	São Paulo
Tb	Temperatura basal

Tro	Trombócitos
Ts	Temperatura secundária
UCDB	Universidade Católica Dom Bosco
Ven	Veneno
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro

## RESUMO

A hematologia, as análises bioquímicas e os índices de condição corporal, são ferramentas úteis para descrever a saúde em animais mantidos em cativeiro intensivo. O presente trabalho teve por objetivo determinar parâmetros que auxiliem no monitoramento da saúde de *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*, mantidas acondicionadas em quarentena e em cativeiro Intensivo no Biotério/UCDB. Foram avaliadas 95 serpentes em um prazo de 12 meses através do exame clínico, avaliações hematológicas, bioquímicas e termográficas. *B. alternatus* obteve o maior peso e comprimento,  $476,2 \pm 19,4$  g e  $105,3 \pm 1,7$  cm respectivamente. Para frequência cardíaca *B. mattogrossensis* foi o maior resultado sendo  $86,8 \pm 2,6$  batimentos por minuto. A espécie *B. moojeni* apresentou a maior frequência respiratória com  $22,2 \pm 4,4$  movimentos por minuto. A maior produção de veneno foi obtida por *B. alternatus* com a quantidade de  $565,5 \pm 39,2$  µl. Na hematologia, foi observada diferença significativa apenas para os valores de hematócrito entre as espécies amostradas. Nossos resultados mostraram que para viperídeos, os linfócitos são o segundo tipo celular mais abundante, ficando atrás dos heterófilos. Os resultados das médias para ALT apresentam-se mais altos para *B. moojeni* ( $12,42 \pm 1,69$ ), seguida de *C. durissus* ( $11,96 \pm 1,52$ ), *B. mattogrossensis* ( $11,45 \pm 2,56$ ) e *B. alternatus* com ( $10,4 \pm 1,79$ ). Já os valores de ureia, *B. alternatus* apresentou a maior média  $7,34 \pm 0,59$  seguida das demais espécies. A Fosfatase alcalina apresenta a média mais alta para *B. moojeni* ( $3,30 \pm 0,42$ ), enquanto *B. mattogrossensis* obteve a média mais baixa ( $2,38 \pm 0,72$ ) (Tabela 6). Não foram observados diferença significativa para essas variáveis em relação à espécie, sub-grupo, sexo e condição corpórea. As serpentes da quarentena obtiveram as maiores médias de temperatura  $30,5 \pm 0,43$  °C, em relação ao grupo de cativeiro intensivo,  $29,5 \pm 0,23$  °C sugerindo que uso da câmera termográfica como metodologia para a avaliação da temperatura corporal em serpentes pode ser importante instrumento na avaliação destes animais cativos.

**Palavras-chave:** Serpentes peçonhentas, Brasil, hematologia, bioquímica, termografia

## **ABSTRACT**

*Hematology, biochemical analyzes, and body condition indexes are useful tools for describing animal health in animals kept in intensive captivity. The objective of this work was to evaluate the health of *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* and *Crotalus durissus*, kept in captivity and in Intensive Captivity in the Biotério / UCDB. A total of 95 snakes were evaluated within 12 months through clinical examination, hematological and biochemical evaluations, and thermography. *Bothrops alternatus* obtained the highest weight and length,  $476.2 \pm 19.4$  g and  $105.3 \pm 1.7$  cm respectively. For heart rate *B. mattogrossensis* was the highest result being  $86.8 \pm 2.6$  beats per minute. *Bothrops. moojeni* presented the highest respiratory rate with  $22.2 \pm 4.4$  movements per minute. The highest production of venom was obtained by *B. alternatus* with the amount of  $565.5 \pm 39.2$   $\mu$ l. In hematology, a significant difference was observed only for hematocrit values among the species sampled. Our results showed that for viperids, lymphocytes are the second most abundant type of cell, behind the heterophiles. The results of the averages for ALT were higher for *B. moojeni* ( $12.42 \pm 1.69$ ), followed by *C. durissus* ( $11.96 \pm 1.52$ ), *B. mattogrossensis* ( $11.45 \pm 2.56$ ) and *B. alternatus* with ( $10.4 \pm 1.79$ ). The values of urea, *B. alternatus* presented the highest mean of  $7.34 \pm 0.59$  followed by the other species. Alkaline phosphatase showed the highest mean for *B. moojeni* ( $3.30 \pm 0.42$ ), while *B. mattogrossensis* had the lowest mean ( $2.38 \pm 0.72$ ) (Table 6). No significant difference was observed for these variables in relation to the species, subgroup, sex and body condition. The quarantine snakes obtained the highest temperature averages  $30.5 \pm 0.43$  °C, compared to the intensive captivity group,  $29.5 \pm 0.23$  °C suggesting that the use of the thermographic camera as a methodology for temperature evaluation body in snakes may be an important tool in the evaluation of these captive animals.*

**Key words:** Serpent venomous, Brazil, hematology, biochemistry, thermography.

## INTRODUÇÃO

A criação de serpentes peçonhentas no mundo vai além das questões conservacionistas. Hoje as técnicas de manejo e manutenção desses animais em cativeiro garante a produção de veneno para produção de antiveneno e estudos avançados em bioprospecção (BELLUOMINI, 1965; MURPHY e ARMSTRONG, 1978; CHANHOME, et al., 2001; PAIVA, 2015).

A as peçonhas produzidas por serpentes neotropicais apresentam variações individuais intraespecíficas, variações geográficas e ontogenéticas (MELGAREJO-GIMÉNEZ et al., 2006). Isso representa uma exigência na obtenção de peçonhas em um *pool* para a imunização dos equídeos, que são utilizados na produção dos soros antiofídicos (WHO, 1981). Ainda, a produção da peçonha visando o potencial farmacológico vem ganhando espaço (COSTA et al., 2005). Inúmeros trabalhos apontam o valor das biomoléculas presentes nas peçonhas dos ofídios, principalmente contra agentes patogênicos (STÁBELI et al., 2007). Além dessas aplicações, devemos destacar a produção de fármacos que apresentam como princípio ativo um ou mais análogos sintéticos elaborados a partir de moléculas purificadas dos venenos ofídicos, como medicamentos de combate à hipertensão, antiepilepticos, para a intolerância a lactose e cola cirúrgica, também, estudos vem sendo desenvolvidos para síntese de drogas utilizadas no tratamento de neoplasias malignas (BARRAVIERA, 1999) (MELGAREJO-GIMÉNEZ et al., 2006).

Pelo exposto, para se produzir veneno capaz de atender suficientemente a demanda, é necessária à manutenção de serpentes em cativeiro em boas condições sanitárias. Entretanto, ainda existem dificuldades em relação ao diagnóstico, prevenção e controle de doenças infecciosas e metabólicas em serpentes criadas em cativeiro utilizadas na produção de peçonha (KOLESNIKOVAS, 1997; MADER, 2006; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007). Acredita-se que estes problemas estão diretamente relacionados à dificuldade de adaptação destes animais ao cativeiro, visto que a maioria é proveniente da natureza e está amplamente sujeita a ação de agentes estressores (KOLESNIKOVAS, 1997).

Muitos fatores podem influenciar na saúde de serpentes mantidas em cativeiro, entre eles pode se citar: fotoperíodo, temperatura, idade, tamanho, fase de vida, duração do jejum, frequência do período entre extrações de veneno, infecções por agentes parasitários, cuidados no manejo e nível de estresse (JUNIOR, 1956; GLENN, et al., 1972; GRISOLIA et al., 1986; ROSENFELD, 1991; ZUG et al., 2001; CARDOSO et al., 2003).

Para proporcionar e manter uma melhor condição de bem-estar nas serpentes em cativeiro é necessário um maior entendimento dos fatores que influenciam a condição de saúde, incluindo técnicas que promovam melhorias de manejo. Entretanto as pesquisas que investiguem a relação entre as condições de cativeiro das serpentes, sanidade dos plantéis e/ou a produção de veneno são negligenciadas (DALTRY et al., 1997, MIRTSCHIM et al., 2002 e GREGO, 2006).

Estudos referentes à influência dos agentes estressores crônicos nos valores bioquímicos e hematológicos em um plantel de serpentes destinadas à produção de veneno são importantes para melhorarmos o entendimento sobre a fisiologia do estresse na saúde dos animais. Como resultado, podem-se melhorar as técnicas de manejo minimizando o impacto do cativeiro com consequente reflexo na qualidade de vida, sanidade, bem-estar e produção de veneno (GREGO, 2006).

Pertencendo à família Viperidae, os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* são os gêneros que possuem toxinas de largo interesse, tanto para a produção do soro antiofídico, quanto para estudos de bioprospecção no país e desenvolvimento de subprodutos biológicos (GLASER et al., 2013). Além disso, a criação em cativeiro contribui para o conhecimento da biologia dessas espécies (GREENE, 1992; SERAPICUS e MERUSSE, 2002; FONTEQUE et al., 2009)

Valores de referência para parâmetros bioquímicos têm sido relatados para algumas espécies de répteis. Entretanto, variações fisiológicas decorrentes do manejo, estado parasitário, sexo, estado nutricional e idade, muitas vezes não são levados em consideração no estabelecimento dos intervalos de referência (VIEIRA, 2015). Os métodos de coleta de amostras, manuseio assim como metodologia utilizada na análise laboratorial também podem causar variação nos valores de referência publicados (STHAL, 2006).

O monitoramento da saúde utilizando-se da hematologia torna-se fundamental uma vez que clinicamente a determinação do estado de saúde de um réptil baseada no exame físico pode ser subjetivo (HEARD, 2001). De fato, valores hematológicos e bioquímicos, podem auxiliar na detecção de condições como anemia, doenças inflamatórias, parasitemias, distúrbios hematopoeíticos e alterações hemostáticas. A hematologia também é considerada uma importante ferramenta para o monitoramento da resposta dos animais aos tratamentos. Ainda, é importante caracterizar valores hematológicos e bioquímicos regionais visto que as diferenças observadas no manejo a que as serpentes são submetidas influencia diretamente a fisiologia dos animais (ALMOSNY e SANTOS, 2000; ALMOSNY, 2007).

## OBJETIVOS

## Objetivo Geral

Avaliação da saúde de *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* mantidas cativas no Biotério/UCDB.

## Objetivos Específicos

- Estabelecer o padrão hematológico de *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro intensivo no Biotério/UCDB.
- Estabelecer o padrão bioquímico de *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro intensivo no Biotério/UCDB.
- Estabelecer o padrão termográfico de *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro intensivo no Biotério/UCDB.
- Estabelecer parâmetros clínicos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro intensivo no Biotério/UCDB.
- Relacionar as variáveis hematológicas, bioquímicas, termográficas e clínicas com o exame físico de *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro intensivo no Biotério/UCDB.

## REVISÃO DE LITERATURA

### **Serpentes peçonhentas no Brasil**

São conhecidas mais de 3.619 espécies de serpentes viventes no mundo (UETZ, 2016; SILVA, 2017). Para o Brasil atualmente a herpetofauna detalha 392 espécies de serpentes com 75 espécies de importância médica, representadas por duas famílias: (i) Elapidae composta pelas corais, sendo 3 espécies para o gênero *Leptomicrurus* e 36 espécies para o gênero *Micrurus*; e (ii) Viperidae, que compreendem quatro gêneros: as jararacas contendo duas espécies para o gênero *Bothrocophias* e 27 espécies para o gênero *Bothrops*, as cascavéis com seis subespécies para o gênero *Crotalus*, e a surucucu-pico-de-jaca contendo uma única espécie para o gênero *Lachesis* (BÉRNILS e COSTA, 2015). No Mato Grosso do Sul temos um número de 113 espécies de serpentes contabilizadas até o presente momento, representadas por 8 famílias, 46 gêneros. Os animais de interesse médico que são estudadas no presente trabalho incluem *Bothrops alternatus*, *Bothrops matogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* (FERREIRA, et al, 2017).

A *B. alternatus* (figura 1) é uma das serpentes peçonhentas mais temidas pela população nacional, ela é estigmatizada por ter no dorso da cabeça um desenho que se assemelha ao formato de uma cruz daí o nome popular de urutu cruzeiro. O animal possui manchas dorsais ao longo do corpo em forma de ferradura (BERNARDE, 2014). Mede entre 80 cm e 120 cm e habitam áreas abertas, banhados, brejos, matas de galeria, matas ciliares e podendo estar presente em áreas alteradas como pastagens e culturas como a de cana de açúcar, milho e hortaliças. Ela está distribuída desde as áreas de cerrado das regiões Centro-Oeste e Sudeste e também em florestas semidecíduas e campos da região Sul do Brasil (CAMPBELL e LAMAR, 2004). A *B. alternatus* tem preferência alimentar por roedores (MARQUES, et al., 2001; SAWAYA et al., 2008).

A serpente *Bothrops matogrossensis* (figura 2), popularmente conhecida como boca-de-sapo, é pertencente à família Viperidae, subfamília Crotalinae (Figura 2) (BERNARDE, 2014). Sua distribuição geográfica abrange o sul do Peru, Bolívia,

Paraguai, norte da Argentina, sudeste e centro-oeste do Brasil. Habitam regiões de Savana (Cerrado), Pantanal, Chaco e pastagens de palmas alagadas (FENWICK, 2009). *Bothrops matogrossensis* alimenta-se tanto de presas poiquilotérmicas quanto endotérmicas. Os anuros são os principais alimentos dessa espécie, refletindo seu habitat alagado (MONTEIRO et al., 2006).

Caiçaca ou jararaca é o nome popular atribuído a *B. moojeni* (figura 3) é a principal causadora de acidentes ofídicos em áreas de cerrado. Está distribuída na região Centro-Oeste, Sudeste, Nordeste e no Sul na porção noroeste do Paraná (CAMPBELL e LAMAR, 2004). Tem uma alimentação generalista alimentando-se de roedores, anfíbios, anuros, lagartos, outras serpentes, pássaros e centopeias (BERNARDE, 2014).

No Brasil o gênero *Crotalus* (figura 4) está representado por uma única espécie, *C. durissus*, que tem ampla distribuição geográfica no território, sendo encontradas no Cerrado, regiões áridas e semiáridas do Nordeste, campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte (MELGAREJO, 2003). São animais robustos e podem medir até 180 cm e sua preferência alimentar são roedores e marsupiais, podendo também predar lagartos (CADLE, et al., 1987; LEMA, 2002; BERNARDE, 2014).



Figura 1. Exemplar de *Bothrops alternatus*.

Fonte: Marina Lima/2017.



Figura 2. Exemplar de *Bothrops matogrossensis*.

Fonte: Marina Lima/2017.



Figura 3. Exemplar de *Bothrops moojeni*.

Fonte: Marina Lima/2017.



Figura 4. Exemplar de *Crotalus durissus*.

Fonte: Marina Lima/2017.

## A importância da pesquisa com venenos de serpentes

Colônias de serpentes voltadas para a produção de veneno começaram a ser criadas entre o final do século XIX e início do século XX em vários países, com a finalidade de um melhor entendimento das toxinas produzidas por esses animais (ASHLEY e BURCHFIELD, 1968 e CALLEFFO e BARBARINI, 2007). O Brasil é considerado um dos países pioneiros na criação de serpentes, tendo o início da produção de soro antiofídico ocorrido em 1901, com Vital Brazil (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002).

Inicialmente, a produção de veneno tinha por objetivo a produção do soro antiofídico (SANT'ANNA, 1999; MARQUES, et al., 2009b). Entretanto, com os avanços da biotecnologia, as recentes descobertas dos benefícios encontrados nos componentes de venenos de serpentes, os quais são fontes de moléculas de interesse na síntese de fármacos vem ganhando espaço na comunidade científica. Recursos significativos são investidos na bioprospecção de novas moléculas para uso farmacêutico a partir do veneno de serpentes, principalmente na forma de estruturas moleculares moldes para a realização de sínteses orgânicas (BARRAVIERA, 1999). Portanto, a manutenção e a criação de serpentes em

cativeiro, particularmente as venenosas, têm papel importante na eficiência da produção de imunobiológicos (COSTA et al., 2005).

As descobertas de potenciais novos usos para o veneno das serpentes induzem a necessidade de estudos que investiguem os efeitos das condições de criação sobre a produção e a composição do veneno, além disso, estes estudos são fundamentais na melhoria das técnicas de manejo, as quais devem prolongar a vida produtiva dos animais (PAL et al., 2002; COSTA et al., 2005; FERREIRA, 2017).

Peçonhas de serpentes podem ser utilizadas na terapia de doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos e contra o câncer (PAL et al., 2002; FERREIRA, 2017). Ainda, proteínas isoladas e seus derivados podem ser utilizados no tratamento de distúrbios hemostáticos, como a coagulação, alterando a função fibrinogenolítica ou plaquetária (SAJEVIC et al., 2011; FERREIRA, 2017). Diversos componentes das peçonhas ofídicas já foram utilizados no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças tromboembólicas. A Defibrase® é um fármaco que tem como princípio ativo a batroxobina, uma serinoprotease isolada da peçonha de *B. moojeni*. Esse medicamento converte fibrinogênio em fibrina e é utilizado em casos de acidente cerebral agudo, angina pectoral inespecífica e surdez súbita. A Hemocoagulase®, medicamento utilizado na prevenção e tratamento de hemorragias, possui atividade de tromboplastina e trombina, sendo seus componentes enzimáticos isolados de *Bothrops atrox* (SAJEVIC et al., 2011). O captoril®, um dos fármacos mais vendidos do mundo, é derivado de um oligopolipeptídeo isolado de *B. jararaca*. Esse medicamento é um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), sendo utilizado no tratamento de hipertensão arterial (HAYASHI; CAMARGO, 2005; KOH, 2006).

## Fatores que afetam a produção e composição de veneno

GLENN et al., (1972) e COSTA et al., (2005) observaram uma ampla variação na composição química de veneno nos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. Os fatores apontados como responsáveis pela maior parte da incluem espécie, tamanho corporal, distribuição geográfica, tamanho da cabeça (e

consequentemente da glândula venenífera), sexo e sazonalidade (MIRTSCHIN et al., 2002), além da idade, condição de saúde e estado fisiológico (JUNIOR, 1956).

Segundo Barravieira, (1999) relataram diferenças interespecíficas na característica composicional da peçonha são fatores a serem considerados. A distribuição geográfica é um dos fatores que mais influenciam na diferença entre a composição das toxinas dentro de uma mesma espécie (COSTA, et al., 2005; FURTADO, 2006; BOLDRINI-FRANÇA, et al., 2010). Estudos com *Micrurus frontalis* mostraram que o veneno de animais procedentes do estado de São Paulo induziu o bloqueio neuromuscular irreversível nas preparações nervofrênico diafragma isolados de ratos, enquanto que as toxinas das serpentes de mesma espécie oriundas do sudoeste do estado do Mato Grosso promoveram bloqueio reversível (Da SILVA Jr. e SITE Jr., 1999; FURTADO, 2006).

Estudos apontam ainda diferenças intraespecíficas nas características moleculares e na quantidade da secreção de veneno em filhotes de uma mesma ninhada, bem como para o tamanho corporal do animal. Filhotes secretam uma menor quantidade de toxina, devido ao tamanho da glândula, no entanto, estudos mostram diferença na quantidade de componentes que constituem o veneno de filhotes e adultos, evidenciando um alto número de bioativos na toxina dos filhotes em relação aos adultos (GLENN, et al., 1972; CHIPPAUX, et al., 1991; COSTA, et al., 2005; Pla, et al., 2017). De fato, estudos com *B. mattogrossensis* apontam em seus resultados que o veneno de fêmeas da espécie apresentou um maior percentual hemolítico em eritrócitos em biotestes, em relação à peçonha de machos. Enquanto, o tempo para a formação do coágulo plasmático e maior potencial coagulante apontou para o veneno dos machos de *B. mattogrossensis* (FERREIRA, 2017).

## **Fisiologia do estresse em répteis**

O estresse é uma resposta resultante da interação do animal com o ambiente em que vive naturalmente ou a qual é artificialmente submetido quando em cativeiro (FOWLER, 1986; PACHALY, et al., 1993). SEYLE (1950) caracterizou o estresse como uma síndrome adaptativa geral equivalente à inflamação, sendo que

nesta última haveria uma resposta local ao trauma e no estresse uma reação generalizada. As causas de estresse podem ser psicológicas, injuriosas, doenças ou exposições a condições adversas de temperatura e umidade.

Geralmente, animais bem-nutridos e não submetidos a situações adversas vivem em aparente condição de harmonia e higidez. Estes animais, quando expostos a condições estressantes, como o cativeiro, podem perder este delicado equilíbrio (GRECO, 2000). De fato, a situação de privação da liberdade, provavelmente é uma das condições mais estressante a que um animal selvagem possa estar exposto (BARNARD, 1986). A resposta orgânica ao estresse está altamente correlacionada ao tipo de estímulo, ao modo de percepção e as características psicológicas do animal (FERREIRA et al., 2002; GREGO, 2006).

Na natureza, os animais se deparam com perturbações sociais e físicas que podem ameaçar não só a sua sobrevivência imediata, mas outros fatores fisiológicos, como a reprodução e a produção de veneno (GREGO, 2006; SANTA RITA, 2011). Muitas vezes, o indivíduo precisa responder a desafios similares com diferentes estratégias dependendo do contexto social e ambiental (GREGO, 2006). O sistema nervoso central avalia se um estímulo ou um grupo de estímulos é visto como uma ameaça significativa para o animal.

Se o estímulo é ameaçador, três tipos de respostas biológicas podem ocorrer (MOBERG, 1985). O primeiro é a resposta comportamental, mais econômica para o animal, onde este apenas se afasta da ameaça (MOBERG, 1985; GREGO, 2006; MADER, 2006). A segunda resposta é a autonômica, caracterizada por uma resposta específica rápida. No estresse agudo, os ramos parassimpáticos e simpáticos do sistema nervoso autônomo alteram os batimentos cardíacos, resistência vascular, secreção das glândulas exócrinas, contração dos músculos lisos do sistema digestório e secreção das catecolaminas pela glândula adrenal e pelos terminais nervosos noradrenérgicos, para que o animal consiga fazer ajustes fisiológicos rápidos em resposta ao estresse (MOBERG, 1985; SAPOLSKY, 1996; MOORE, et al., 2001; GREGO, 2006; MADER, 2006). E a última resposta é a neuroendócrina que modula a função de quase todos os sistemas fisiológicos. Os hormônios neuroendócrinos regulam a reprodução, o metabolismo, o crescimento e

têm a capacidade de influenciar, direta ou indiretamente, o sistema imunológico e o comportamento (MOBERG, 1985; GREGO, 2006; MADER, 2006).

Como em outros vertebrados, répteis também exibem uma resposta bem desenvolvida ao estresse, que o permite modificar o comportamento, a atividade reprodutiva, a resposta do sistema imune, e o metabolismo intermediário (GUILLETTE et al., 1995). Muitas destas modificações estão correlacionadas com níveis elevados de concentrações de corticosterona plasmática e consequente imunossupressão (GREGO, 2006). A síntese de corticosteroídes pelo tecido interrenal está sob controle de um hormônio pituitário anterior, o adenocorticotrófico (ACTH). O ACTH é, por sua vez, regulado pelo hormônio corticoliberina, que é sintetizado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (WIEGFIELD, et al., 1982; SALPOSKY, 1996; GREGO, 2006).

Vários fatores influenciam a concentração de corticosteroídes plasmáticos incluindo variabilidade genética, idade, sexo, estado nutricional, o tipo de agente estressor e a frequência de apresentação do agente estressor (SELYE, 1973; GREGO, 2006).

O eixo hipotálamo-pituitário-adrenocortical (HPA) é visto como um sistema fisiológico complexo que pode mediar grandes variações nas respostas fisiológicas e comportamentais a agentes estressores (SALPOSKY, 1996; GREGO, 2006). Perturbações ambientais capazes de desfazer a homeostasia do organismo engatilham a cascata neurohormonal resultando na elevação de glicocorticosteroídes, catecolaminas e glicose, entre outros fatores sanguíneos (CHROUSOS e GOLD, 1992) necessários para restaurar a homeostasia (GREGO, 2006). Uma das funções principais do eixo HPA e, em particular, da resposta adrenocortical ao estresse agudo, é o de eliminar ou reduzir fisiológica ou comportamentalmente o impacto de potenciais estressores em um animal e, assim, promover a sua sobrevivência (BALM, 1999).

Os esteroides atuam em diversos tecidos e sua ação depende da quantidade de receptores presentes nas células alvo. O órgão com maior número de receptores e, portanto, principal alvo dos glicocorticosteroídes durante o estresse é o fígado, seguido das células linfoides, timo e rim (FERREIRA et al., 2002). A concentração de corticosterona sérica oferece um indicativo de estresse e, portanto, da

susceptibilidade a doenças. Existem evidências de que níveis elevados de corticosterona podem romper a função fisiológica dos répteis (GUILLETTE et al., 1995) causando múltiplos problemas como inibição das funções normais dos hormônios reprodutivos (NIJAGAL e YAJURVEDI, 1999), morte neuronal (SALPOLSKY, 1996), inibição da função imune e do crescimento (MORICI et al., 1997) e dificuldades de resistir a patógenos (DUNLAP e SCHALL, 1995; GREGO, 2006).

Selye (1936) descreveu uma série de modificações anatômicas e fisiológicas não específicas, característica de animais expostos a vários agentes estressantes e denominou este processo de “Síndrome da má Adaptação”, definindo três estágios: alarme, adaptação e exaustão.

O estágio de alarme é tido geralmente como uma resposta aguda ao estresse e pode ser detectado minutos depois a exposição ao agente estressor, como é o exemplo da captura, onde o tempo de resposta e liberação de corticosterona fica em torno de 3 minutos a 6 horas (SILVESTRE, 2014). Neste primeiro estágio as glândulas adrenais passam a produzir e liberar os hormônios do estresse que aceleram o batimento cardíaco, dilatam as pupilas, aumentam a sudorese e os níveis de açúcar no sangue, reduzem a digestão e contraem o baço, que libera mais hemácias para a circulação sanguínea, o que amplia o fornecimento de oxigênio aos tecidos. A função dessa resposta fisiológica é preparar o organismo para a ação, que pode ser de luta ou de fuga (SELYE, 1936; GREGO, 2006; SILVESTRE, 2014; PAIVA, 2015).

O segundo estágio, adaptação, ocorre quando o agente estressor é mantido (SELYE, 1959) e o sistema nervoso autônomo entra em hiperatividade e ocorre liberação de glicocorticoides pelo córtex adrenal e sua resposta frente ao estressor encontra-se diminuída (DANTZER e MORMEDE, 1984, GREGO, 2006; PAIVA, 2015). No estágio de exaustão, o agente estressor é mantido até que o animal não tenha mais a capacidade de se adaptar, não ocorrendo descanso nem volta à homeostasia (SELYE, 1959), as reservas energéticas vão se esgotando e o processo evolui até o óbito do animal por falência múltipla de órgãos (DANTZER e MÓRMEDA, 1984; PAIVA, 2015).

A manutenção do equilíbrio em resposta resultante da interação do animal com o ambiente em que vive, seja na natureza ou cativo, é denominado homeostasia (GUILLETTE et al., 1995), e qualquer estímulo que a altere, seja interno, ou externo, torna-se um agente estressor, e as diversas reações do corpo para combater esta alteração compõe a resposta ao estresse (SPRAKER, 1993).

Uma alteração em comum as espécies animais a um agente estressor envolve a ativação do sistema límbico, que regula os comportamentos víscero-somático, sexual, defensivo, agressivo, irracional e instintivo (ROITIMAN, 1989), além de ser regulador neuroendócrino, induzindo o hipotálamo a produzir o hormônio liberador de corticotrofinas (CHR). Este último é um peptídeo que regula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual irá atuar no córtex adrenal, resultando em um aumento da síntese e liberação de corticosterona (PACHALY et al., 1993; GREKIN, 1986; BREAZILE, 1987; COOK et al., 1996; MADER, 2006).

Isso explica porque animais estressados tornam-se susceptíveis a enfermidades, pois uma das ações dos glicorticóides é interferir na resposta imune. Sabe-se que estes esteroides induzem neutrofilia, lise e marginalização de linfócitos T, de monócitos e eosinófilos, e diminuem a proliferação de células linfoides (FOWLER, 1986; BREAZILE, 1987; SPRAKER, 1993; GREGO, 2006).

Uma vez que o réptil percebe o estímulo como ameaça, seu cérebro libera uma resposta neuroendócrina que consiste em fase aguda e crônica. A fase aguda é regulada pelo sistema nervoso simpático, o qual é imediatamente, ativado e tem efeito direto em diversos tecidos do corpo (CABANAC e BERNIERI, 2000).

O cativeiro é um fator limitante ao animal, e em algumas espécies a adaptação à vida cativa não ocorre, desenvolvendo a chamada “Síndrome da Má Adaptação”, onde os animais iniciam um processo de anorexia que pode resultar em morte (FUNK, 2000; SANTOS, 2005).

Esta síndrome é uma enfermidade causada por consequências patológicas ao estresse, onde os tecidos tendem a perder a integridade estrutural e diversas enfermidades começam a se manifestar tais como, ulcerações da mucosa oral e entérica, debilidade alimentar e um aumento dos efeitos do parasitismo (COWAN, 1968).

Em vista ao prognostico desfavorável e a ineficiência dos tratamentos disponíveis, a prevenção é a principal medida de controle das consequências danosa do estresse e da síndrome da má adaptação (SONODA et al., 1996).

## **Hematologia no monitoramento da sanidade de serpentes cativas**

A história dos estudos hematológicos dos répteis, data por volta de 1842 (KNOTKOVÁ et al., 2002). Coletivamente há um número considerável de estudos hematológicos e bioquímicos em uma variedade de serpentes (SYKES e KLAPHAKE, 2008; GÓMEZ et al., 2016; DISSANAYAKE et al., 2017). No entanto, a maioria dos estudos baseou-se apenas na contagem de células sanguíneas e morfologia (HARTMAN e LESSLER, 1964; SZARSKI e CZOPEK, 1966; ARIKAN et al., 2004; DISSANAYAKE et al., 2017), ficando a necessidade de correlacionar os parâmetros determinados com o estado de saúde do réptil.

Nos dias de hoje, a hematologia, análises bioquímicas e os índices de condição corporal são ferramentas úteis para descrever a saúde animal (LA GRANGE et al., 2014), estado reprodutivo, estado de doença e na diferenciação de fatores de processos fisiológicos (CRISTOPHER et al., 1999; LISIČIC et al., 2013; DISSANAYAKE et al., 2017). Especialmente para animais mantidos em cativeiro intensivo, onde as alterações no ambiente, manejo e doenças podem desencadear estresse, as informações hematológicas (OPPLIGER et al., 1998) propiciam o monitoramento da saúde dos plantéis de serpentes cativas. Além disso, exames bioquímicos e análises hematológicas constitui uma excelente ferramenta de diagnóstico não invasivo em serpentes cativas (THRALL et al., 2006; THRALL, 2007; CAMPBELL, 2015; GILLETE et al., 2015).

As alterações morfológicas nas células do sangue periférico podem indicar processos patológicos, ajuda a estabelecer uma lista de diagnósticos diferenciais e auxilia no monitoramento do estado de saúde de um paciente durante o curso da doença ou resposta à terapia. Devido à sua fisiologia poiquilotérmica e comportamento únicos, onde o animal não demonstra a sintomatologia, muitos estados de doença crônica em répteis não são detectados até os estágios avançados (SAGGESE, 2009).

As células do sangue dos répteis são compostas por eritrócitos, trombócitos e leucócitos, sendo este último classificado em granulócitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos) e células mononucleares (linfócitos, monócitos e azurófilos), variando em número e morfologia de grânulos, padrões de coloração citoquímica e concentração no sangue periférico de acordo com espécies e gêneros (ALLEMAN et al., 1999). Eritrócitos de répteis são semelhantes em morfologia microscópica e ultraestrutural aos de outros vertebrados não mamíferos. Os eritrócitos desses animais são nucleados e, portanto, maiores do que os seus homólogos de mamíferos (CAMPBELL, 2007; STACY et al., 2011). A vida média dos eritrócitos em répteis varia de 600 a 800 dias em virtude da baixa taxa metabólica desses animais. Quando corados com corante do tipo Romanowsky, o eritrócito maduro dos répteis apresenta-se elíptico e tem abundante citoplasma. O núcleo está centralmente posicionado, é irregular e elíptico, e a cromatina condensada apresenta-se basofílica (figura 1) (STACY et al., 2011). Em condições normais, os eritrócitos respondem por aproximadamente 40% de todo volume sanguíneo (RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007). Este grupo de células é produzido na medula a partir de células da linhagem eritróide (eritroblastos), mas, diferentemente dos mamíferos, estas podem ser geradas a partir de outras fontes. Neste caso, o fígado e o baço são apontados como importantes sítios hematopoiéticos secundários. Alguns estudos têm demonstrado que eritrócitos maduros podem se dividir por mitose dentro da corrente sanguínea e também dentro da medula. Está descrito que tais eritrócitos também podem se multiplicar por divisão amitótica, podendo eventualmente gerar hemácias anucleados (GOULART, 2004; FALCE, 2009).

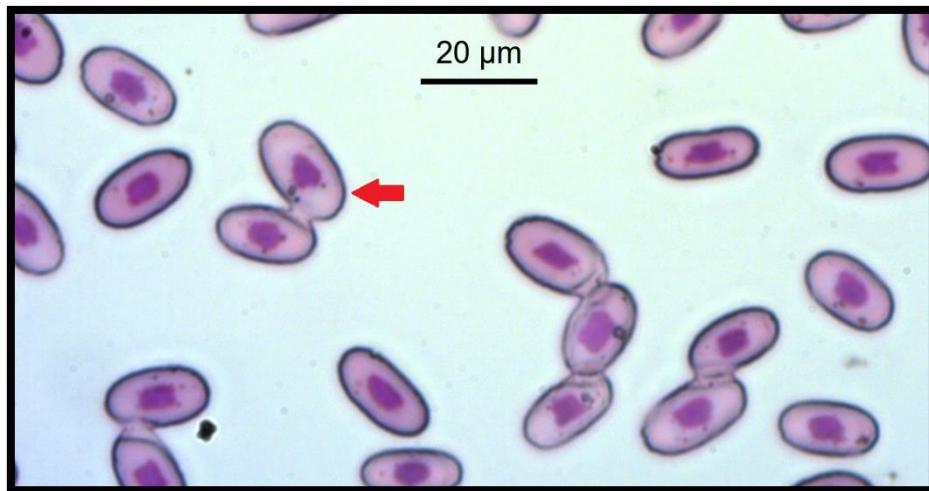


Figura 5. Eritrócitos em esfregaço sanguíneo de *B. alternatus*.

Fonte: Luan Figueiró e Wanessa Barreto/2018.

O número de eritrócito em répteis pode variar intraespecífica e interespecificamente, com a idade, sexo, estado nutricional e ocorrência de doenças (JACOBSON, 1984; GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994). Répteis, quando comparados às aves e mamíferos, possuem um número menor de eritrócitos circulantes. Existe uma relação inversa entre o tamanho do eritrócito e o número total de células circulantes. Enquanto o volume corpuscular médio diminui, o número total de células circulantes aumenta (MADER, 2000).

Diferentemente das plaquetas de mamíferos, que são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos (HARVEY, 2001), os trombócitos de répteis, aves, anfíbios e peixes são nucleados e representam uma linha celular distinta que provavelmente originou-se do tromboclastos em tecidos hematopoiéticos, daí a origem do nome trombócito (STACY et al., 2011). Estudos mostram que em répteis os trombócitos, podem sofrer alterações e gerar células equivalentes a eritrócitos, funcionais e muito semelhantes aos eritrócitos de linhagem eritróide, o que é denominado metaplasia eritrogênica (GOULART, 2004).

Os trombócitos funcionam de forma semelhante às plaquetas de mamíferos, incluindo envolvimento em hemostasia e cicatrização de feridas (SYPEK e BORYSENKO, 1988). Os trombócitos também podem ter capacidades fagocíticas (DIETERLEN-LIEVRE, 1988). Os trombócitos quando ativados, podem fagocitar

bactérias, detritos celulares de nucleados, eritrócitos, hemosiderina e melanina (FRYE, 1991; STACY et al., 2011).

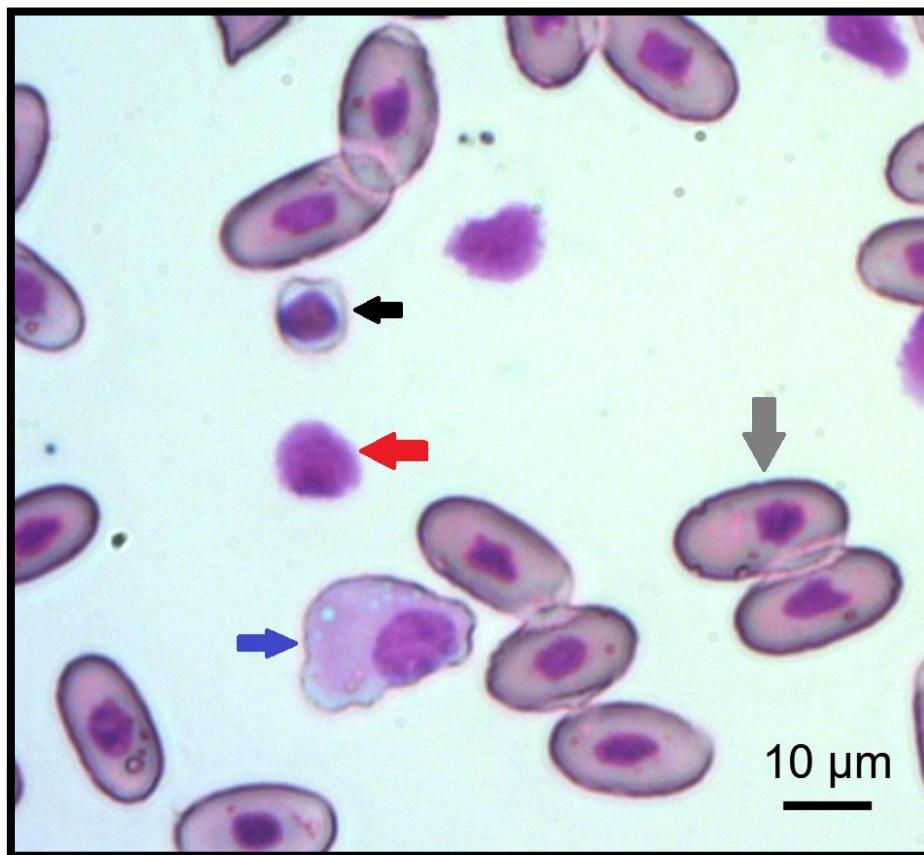


Figura 6. Esfregaço sanguíneo de *C. durissus* evidenciando trombócito (seta vermelha), linfócito (seta preta), azurófilo (seta azul) e eritócito (seta cinza).

Fonte: Luan Figueiró e Wanessa Barreto/2018.

As características morfológicas dos trombócitos são semelhantes às de linfócitos pequenos, e sua diferenciação pode ser um desafio (STACY et al., 2011). Os trombócitos dos répteis são células nucleadas, com formato que varia de elíptico a fusiforme. O núcleo, centralmente posicionado, possui uma cromatina nuclear densa, que se cora em roxo, enquanto que o citoplasma tipicamente é menos corado e contém poucos grânulos azurofílicos. Trombócitos ativos são comuns e aparecem como agrupamentos de células com citoplasmas irregulares e vacúolos (HAWKEY & DENNET, 1989).

O desenvolvimento dos granulócitos dos répteis é semelhante ao dos mamíferos e são associados a espaços extravasculares do estroma reticular da

medula óssea. Granulócitos maduros migram para o endotélio celular dos sinusóides para entrar na corrente sanguínea. Os estágios de maturação são semelhantes aos que ocorrem nas aves. As células maduras diminuem em tamanho, e o citoplasma torna-se menos basofílico. Especificamente, grânulos característicos aparecem nos mielócitos e metamielócitos, e aumentam de número durante a maturação. A cromatina nuclear torna-se intensamente condensada com a maturidade, e nas células em que o núcleo é lobulado, ele passa de arredondado para segmentado (HAWKEY & DENNET, 1989).

Os heterófilos dos répteis são células redondas grandes (10-23 µm) com citoplasma transparente preenchido com grânulos de cor-de-rosa-laranja brilhante (SAINT GIRONS, 1970). Crocodilianos e quelônios possuem distintos grânulos fusiformes, enquanto os squamatas (lagartos e serpentes) têm grânulos angulares, pleomórficos e densamente embalados (MONTALI, 1988; CAMPBELL, 2004). Os núcleos dos heterófilos são excêntricos e variam de redondo a oval, na maioria das serpentes, quelônios e Crocodilianos, para bi ou multilobado em lagartos (Figura 3) (SAINT GIRONS, 1970; MONTALI, 1988).

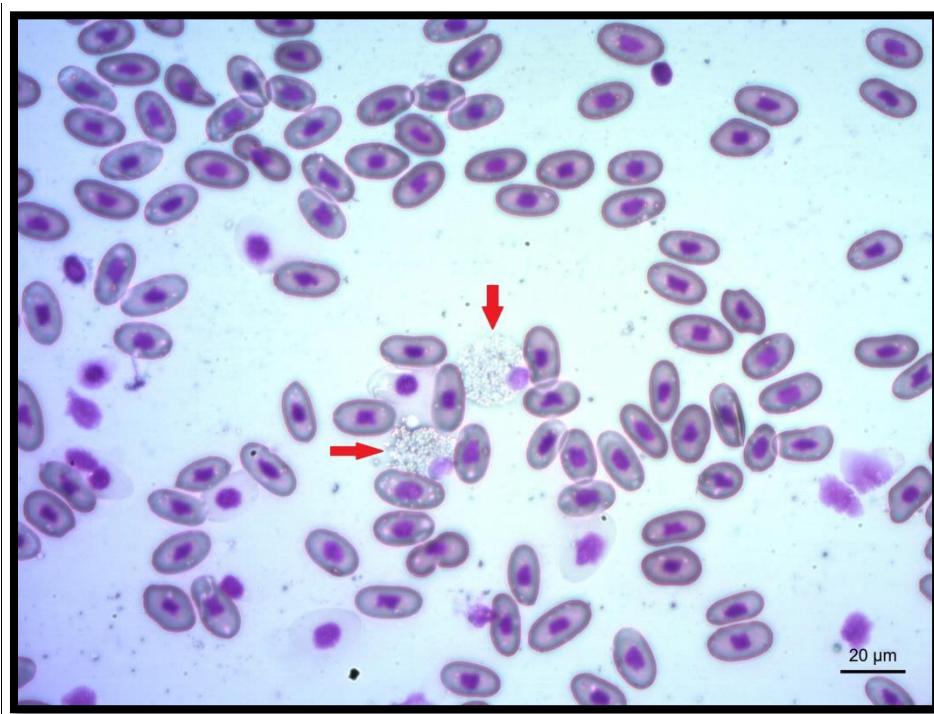


Figura 7. Heterófilo em esfregaço sanguíneo de *B. alternatus*.

Fonte: Luan Figueiró e Wanessa Barreto/2018.

Os heterófilos na maioria das espécies de répteis compõem 30% a 45% dos leucócitos no sangue periférico (DUGUY, 1970; SYPEK e BORYSENKO, 1988; WRIGHT e SKEBA, 1992; FRYE, 1999;). Em espécies de quelônios e crocodilos, eles representam mais de 50% (MATEO et al., 1984; MONTALI, 1988; ALLEMAN et al., 1992; CHRISTOPHER et al., 1999).

Com base em estudos citoquímicos e ultraestruturais, heterófilos aparecem semelhantes aos neutrófilos de mamíferos, provavelmente funcionando a fagocitose bactérias e materiais estranhos. Eles desempenham um papel importante na imunidade inata em resposta a vários estímulos inflamatórios (DUGUY, 1970; MATEO et al., 1984; SYPEK e BORYSENKO, 1988; MONTALI, 1988; ALLEMAN et al., 1992; AZEVEDO e LUNARDI, 2003; MOTTA, 2005), especialmente bactérias e parasitas ou lesão tecidual (PAIVA, 2015).

Os eosinófilos compõem 7% a 20% de leucócitos em répteis saudáveis. A morfologia dos eosinófilos em répteis é semelhante à dos mamíferos. Os eosinófilos variam de 9 a 20 µm de diâmetro entre e dentro das espécies. Os eosinófilos têm um citoplasma claro e grânulos rosa redondo. Os núcleos são centrais ou excêntricos e redondos, ovais, alongados ou bilobados (MONTALI, 1988; CAMPBELL, 2004).

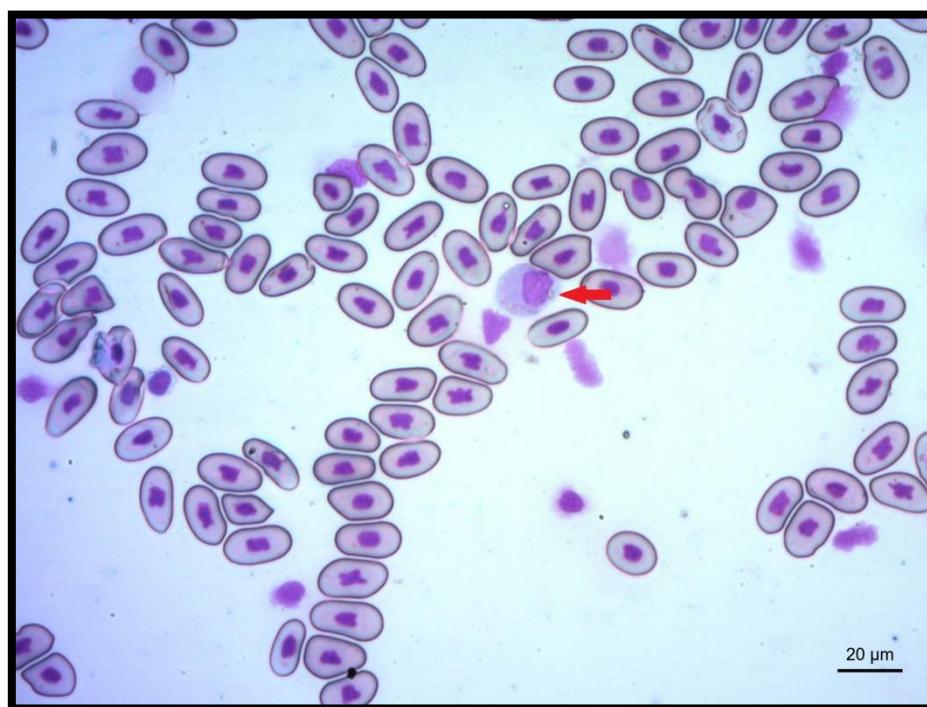


Figura 8. Eosinófilo em esfregaço sanguíneo de *B. moojeni*.

Fonte: Luan Figueiró e Wanessa Barreto/2018.

Admite-se que os eosinófilos fagocitem e destruam determinados complexos antígeno-anticorpo, limitando e circunscrevendo o processo inflamatório (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Números de eosinófilos anormalmente elevados foram associados a infecções parasitárias, por exemplo, protozoários e helmintos (MEAD e BORYSENKO, 1984; CAMPBELL, 2004).

Os basófilos possuem contagem de 0 a 40% das células brancas (RASKIN, 2000). Os basófilos em répteis são geralmente células pequenas (7-12 µm), mas podem atingir 20 µm em algumas espécies. Os basófilos contêm numerosos pequenos grânulos metacromáticos, redondos, purpura escuras que frequentemente obscurecem o núcleo redondo (Figura 5) (MONTALI, 1988; FRYE, 1991; STACY et al., 2011).

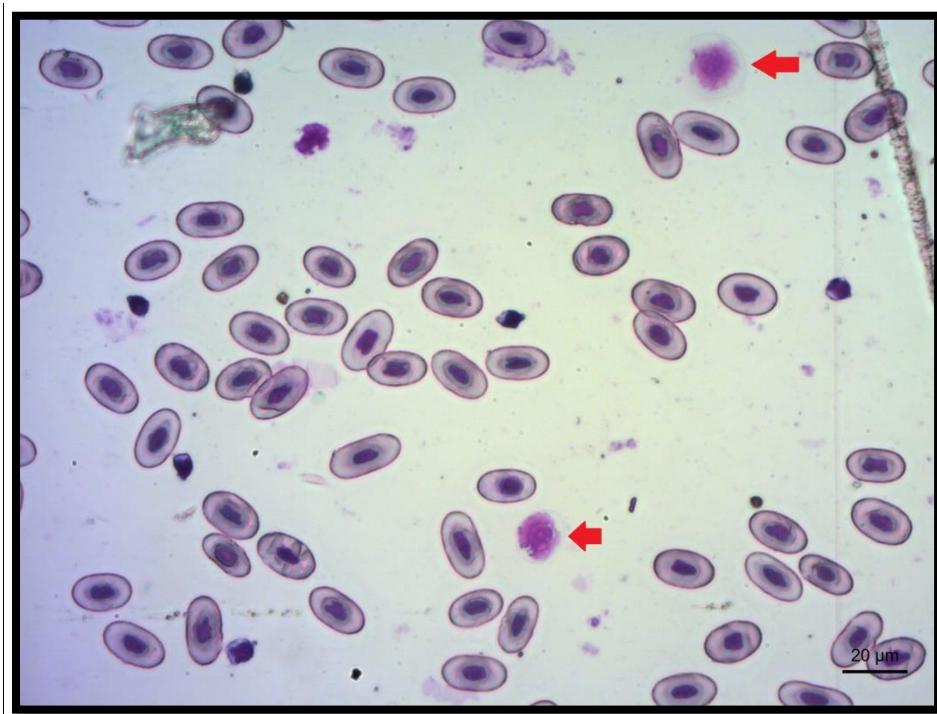


Figura 9. Basófilo em esfregaço sanguíneo de *B. matogrossensis*.

Fonte: Luan Figueiró e Wanessa Barreto/2018.

Os basófilos de répteis podem degranular durante a coleta de sangue, processamento de amostra ou demora na preparação do esfregaço (RASKIN, 2000;

STACY et al., 2011). Assim como nos mamíferos, possuem imunoglobulinas de superfície e liberam histamina por degranulação (RASKIN, 2000).

A taxa de linfócitos pode chegar a 80% no diferencial leucocitário, e assim como as demais células brancas nos répteis, é altamente influenciada pela sazonalidade e o ambiente (CAMPBELL, 2006; PAIVA, 2015). A linfopoiese nos répteis é semelhante à dos mamíferos e aves. Os linfoblastos, prolinfócitos e linfócitos maduros aparecem igualmente ao dos mamíferos e aves, e eles podem ser encontrados em órgãos linfopeíticos, como o baço (HAWKEY & DENNET, 1989).

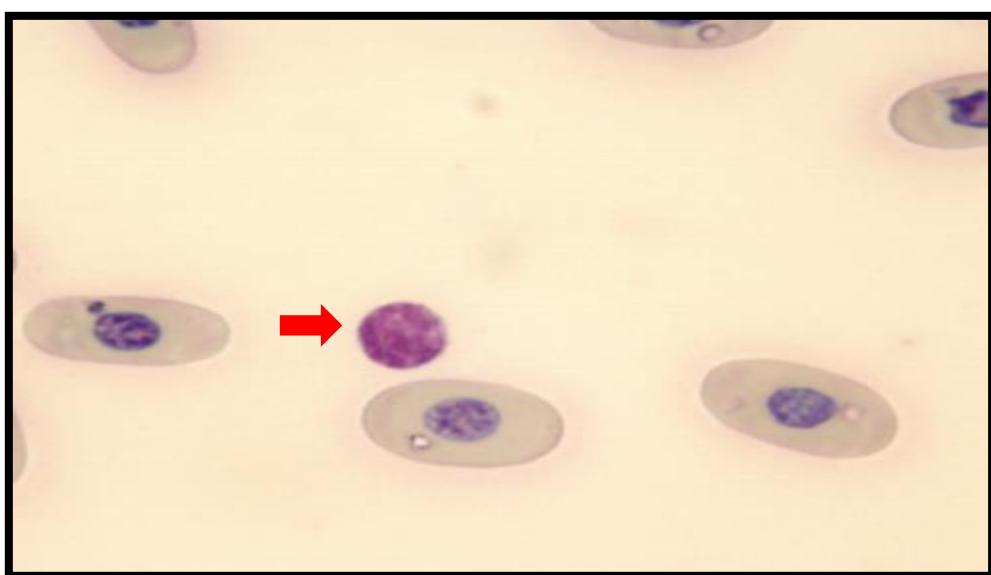


Figura 10. Linfócito de um testudine, *Gopherus agassizii*

Fonte: Jacobson/2007.

Os linfócitos são células com tamanho variado (5,5 a 14,5 $\mu\text{m}$ ) e se assemelham ao dos mamíferos. O citoplasma, geralmente, é levemente basofílico. Os linfócitos podem conter pequenos grânulos azurófilos citoplasmático. Sua prevalência é variada, mas freqüentemente maior que 50% do total de leucócitos. O núcleo é compacto e circular, semelhante aos trombócitos (RASKIN, 2000). Estão divididos em linfócitos B e T e a função são similares aos dos mamíferos, incluindo a produção de imunoglobulinas e mediação na resposta imunológica celular (ROSSKOPF, 1999).

Os monócitos geralmente são as maiores células da periferia sanguínea dos répteis, são de tamanho variável de 8 a 25  $\mu\text{m}$  (STACY et al., 2011) e eles se

assemelham aos monócitos dos mamíferos. Possuem formas que variam de circular à amebóide. O núcleo também varia em forma, estando entre oval e lobulado. A cromatina nuclear dos monócitos é menos condensada e relativamente mais pálida, quando comparado ao núcleo dos linfócitos. O abundante citoplasma dos linfócitos cora-se em azul acinzentado, e pode aparecer levemente opaco, e conter vacúolos (HAWKEY & DENNET, 1989).

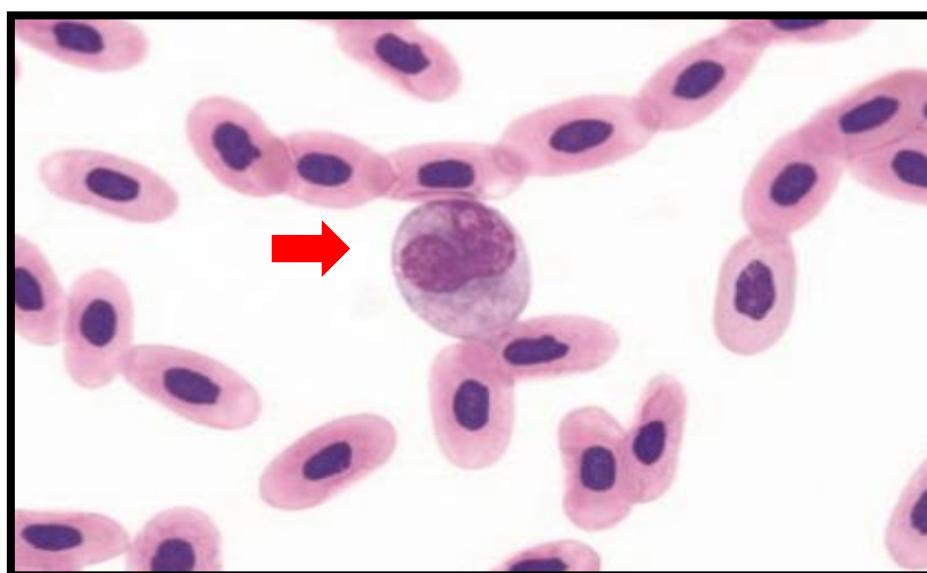


Figura 11. Monócito de um lacertídeo, *Iguana iguana*.

Fonte: Jacobson/2007.

Eles possuem a função de fagocitose e são importantes na resposta granulomatosa de infecções microbianas (ROSSKOPF, 1999). Os monócitos geralmente compõem 0% a 10% dos leucócitos (DUGUY, 1970; SYPEK e BORYSENKO, 1988), no entanto, algumas espécies de répteis têm até 20% de monócitos (PIENAAR UDE, 1962).

Os monócitos se desenvolvem em macrófagos após deixando o sangue periférico para adentrar nos tecidos. São essenciais para o granuloma e formação de células gigantes, uma resposta comum a infecções microbianas em répteis (STACY e PESSIER 2007).

O azurofilo é exclusivo das espécies de répteis. Os azurofilos são comumente observados em squamatas e crocodileanos, e ocasionalmente quelônios, e são

morfologicamente e possivelmente funcionalmente, semelhante aos granulócitos e monócitos (MONTALI, 1988; DOTSON et al., 1995; STACY et al., 2011).

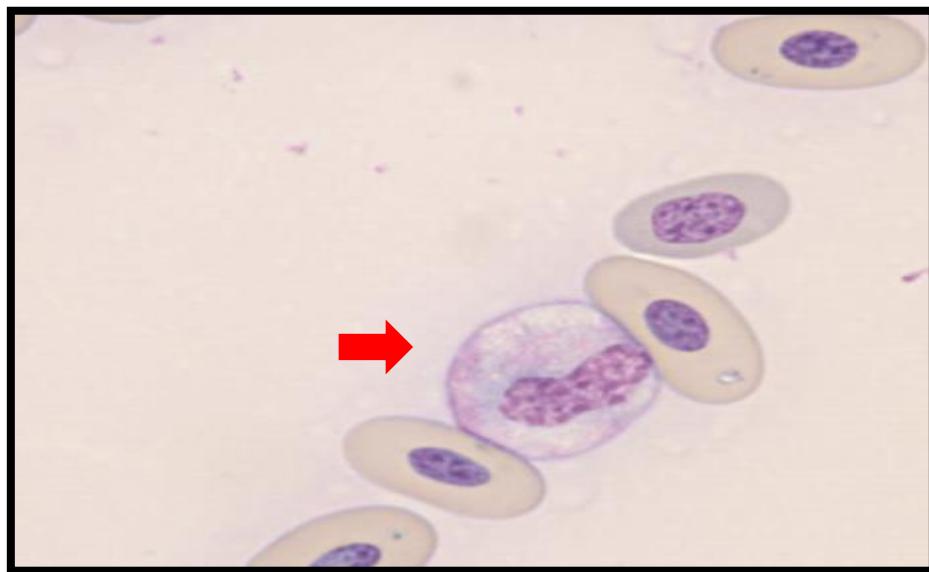


Figura 12. Azurofilo de um boideo, *Python molurus bivittatus*.

Fonte: Jacobson/2007.

Os azurofílos são células redondas com bordas citoplasmáticas distintas e citoplasma azul-cinza pálido que contém inúmeros grânulos azurofílicos em roxo e às vezes alguns claros e pontuais vacúolos. Os núcleos são geralmente redondos ou ovais, excêntricos e têm cromatina aguda (Fig. 12) (CAMPBELL, 2004). Os azurofílos nas serpentes são semelhantes aos neutrófilos de mamíferos, enquanto os azurofílos dos lagartos são semelhantes aos monócitos de mamíferos (STACY et al., 2011).

Os azurofílos são o segundo tipo de leucócito mais comum em serpentes e normalmente pode representar até 35% de leucócitos circulantes em algumas espécies (DOTSON et al., 1995; STACY et al., 2011).

A contagem total e relativa de células sanguíneas no hematócrito de répteis pode variar em função de diversos fatores, tais como: o tamanho da célula, a idade do animal, o sexo, o período do ano (sazonalidade), além dos fatores patológicos, nutricionais e ambientais. Desta forma, pode ocorrer uma maior dificuldade para interpretação dos dados hematológicos (GREGORY, et al., 2004; GOULART, 2004;

MADER, 2006). A contagem total de células sanguíneas em répteis é menos numerosa do que em aves e mamíferos de mesmo peso corporal, requerendo dessa forma, uma avaliação mais criteriosa para caracterizar um quadro de anemia em um exemplar reptiliano (GOULART, 2004).

A identificação de células sanguíneas consistente ainda em um desafio na hematologia dos répteis (DOTSON et al., 1995; GREGO; 2006; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007; ALVES et al., 2014; PAIVA, 2015), bem como a interpretação de dados hematológicos, quando comparados aos animais domésticos, devido ao baixo número de trabalhos nesta área e a divergência de valores de referência para a maioria das espécies. Esta variabilidade nos parâmetros hematológicos está envolvida com as diferentes condições fisiológicas e adaptações ao ambiente destes animais, dificultando o estabelecimento de um diagnóstico clínico (WOZNIAK, 1994; NARDINI et al., 2013).

## **Bioquímica no monitoramento da sanidade de serpentes cativas**

Os parâmetros bioquímicos auxiliam no diagnóstico acerca do funcionamento hepático e renal, metabolismo e fisiologia geral dos animais (MADER, 2006; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007). Portanto a determinação de parâmetros bioquímicos de uma população saudável mantida em cativeiro é fundamental para o manejo de um serpentário, servindo de indicador de saúde dos animais (SILVA, et al., 2010).

### **Ureia**

A uréia é um subproduto do metabolismo muscular esquelético (FRANDSON et al., 2011), sendo o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas pelo organismo animal, 90% são excretados pelos rins e o restante eliminado pelo trato gastrintestinal e pela pele. A ureia é considerada um preditor fraco da filtração glomerular, pois 40% a 70% retornam para o plasma por um

processo de difusão passiva tubular, que é dependente do fluxo urinário (JOHNSON, 2008).

Vários fatores podem mudar significativamente os valores séricos da ureia sem terem relação com a função renal, como a dieta, a taxa de produção hepática, desidratação, trauma, insuficiência cardíaca congestiva, infecção, depleção de sódio e uso de corticosteroides, diuréticos ou tetraciclínas. Embora apresente estas limitações, alterações nos níveis plasmáticos da ureia decorrentes de insuficiência renal surgem mais precocemente quando comparado à creatinina (STEVENS; LEVEY, 2005).

Na rotina clínica, a principal utilidade da determinação da ureia consiste na avaliação da razão ureia:creatinina séricas. Essa relação pode ser útil quando se avaliam pacientes com quedas rápidas da taxa de filtração glomerular, podendo apresentar-se alterada em estados patológicos diferentes, como também na discriminação da azotemia pré e pós-renal (BASTOS et al., 2007).

Em serpentes, a concentração plasmática de uréia pode ser causada por vários fatores diferentes, como fatores alimentares, efeitos metabólicos causados por patologias como septicemia grave, alterações hormonais, estado catabólico, falhas no ciclo metabólico (hiperamoniemia) e insuficiência renal (KERR, 2003).

Os métodos laboratoriais mais usados para a dosagem de ureia baseiam-se em técnicas enzimáticas colorimétricas. A maioria dos reagentes empregam a enzima urease, que degrada a ureia em íons amônio e CO<sub>2</sub>, seguida de um processo analítico de quantificação do íon amônio. É nessa fase que há o monitoramento da variação cromática para a determinação dos valores de ureia (RULE et al., 2004).

Os valores observados para a concentração sérica de ureia em répteis é inferior a 15 mg/dL, pois estes animais são uricotélicos(CAMPBELL, 2007). Acredita-se que esses valores estão associados a um tipo de mecanismo que visa aumento de osmolaridade plasmática, com a finalidade de minimizar a perda de água do organismo.

## Creatinina

A creatinina é um produto residual da creatina e da fosfocreatina oriunda do metabolismo muscular e da ingestão de carne. Aproximadamente 98% da creatina é mantida no músculo e 1,6% a 1,7% desta é convertida em creatinina por dia, que é rapidamente excretada pelo rim. Dessa forma, a produção e liberação de creatinina pelo músculo são praticamente constantes. A geração é diretamente proporcional à massa muscular, que varia de acordo com a idade, sexo e etnia e é afetada por condições que causam perda muscular (JONHSON, 2005).

Aproximadamente 25% da creatinina urinária é proveniente da secreção tubular, sendo esta mais significativa quanto menor for a TFG (JONHSON, 2005). A creatinina é livremente filtrada pelo glomérulo e não é reabsorvida nem metabolizada pelo rim. Entretanto, A eliminação extrarenal de creatinina através do trato gastrointestinal, em particular na insuficiência renal avançada, contribui também para uma superestimação da TFG.

## Alanina Amino Transferase (ALT)

A ALT é uma enzima de extravasamento que está livre no citoplasma dos hepatócitos. O aumento da atividade sérica dessa enzima indica lesão celular e esta é liberada na circulação. Dentre todos os testes de função hepática, a ALT é a detecção mais comum e melhor para diagnosticar lesão no fígado (THRALL, 2006).

No entanto para répteis, considera-se que a massa muscular total é maior que a hepática, constituindo uma fonte significativa de extravasamento da ALT. Com isso a ALT não é um biomarcador sensível para doenças hepáticas nestas espécies (CAMPBELL, 2007; ALMONSNY; MONTEIRO, 2007).

## Fosfatase Alcalina (FA)

A fosfatase alcalina é uma enzima que tem a capacidade de hidrolisar uma variedade de monofosfatos ou pirofosfatos em pH alcalino, bem como a um pH fisiológico, embora em menor taxa (HOFFMANN; SOLTER, 2008).

De acordo com Gonzalez e Silva (2006), a FA promove a catalisação da hidrolise de ésteres do ácido fosfórico sob condições alcalinas, tendo um pH de ótima atividade in vitro em torno de 10, existindo isoenzimas de FA na membrana celular de vários tecidos. Os órgãos como fígado, rins, intestinos, pâncreas, ossos, e a placenta, tem maiores concentrações de FA nas membranas celulares; são duas formas de isoenzimas produzidas a partir de dois genes diferentes, uma intestinal e uma tecidual inespecífica, esta última pode sofrer alteração pós-translacional adicional nos diferentes tecidos, formando diferentes isoformas nos ossos, rins, placenta e fígado. No entanto, a maior parte de FA de origem sérica é hepática, onde está presente nas células do epitélio biliar e nas membranas caniculares dos hepatócitos. Além disso, deve se levar em consideração a possibilidade do aumento de FA não ser de origem hepática, mas sim das outras isoformas, como por exemplo a óssea ou renal.

Existem poucas informações sobre interpretações de exames que demonstram aumento da atividade sérica da fosfatase alcalina em répteis (CAMPBELL, 2007; ALMOSNY; MONTEIRO, 2007).

## Exame Clínico

É de fundamental importância às observações clínicas minuciosas do animal das serpentes pois como na maioria dos animais silvestres, esses répteis demoram a exteriorizar sinais e sintomas, e quando isso ocorre, a patogêneses já está em processo avançado.

Os exames clínicos iniciam-se pela observação cuidadosa da cavidade oral, narinas, olhos, palpação da musculatura e pele, com intuito de identificar ectoparasitas, escore corporal, bem como qualquer aumento de volume que indique uma possível enfermidade (MEREDITH e JOHNSON-DELANEY, 2010).

As técnicas utilizadas na avaliação incluem a auscultação, transiluminação quando possível, palpação, exame da cavidade oral, comprovação de tônus muscular e inspeção oftalmológica (VARELA, 2002). Os exames clínicos iniciam-se pela inspeção geral visualizando primeiro a pele: a muda da pele nas serpentes ocorre por inteiro, começando pela cabeça. Deve-se reparar se houve muda completa ou o animal sofre disecdisse. A muda do epitélio ocorre inclusive na língua, portanto, podem ser vistos fragmentos de pele na cavidade bucal, que não devem ser confundidos com parasitas. A avaliação das escamas dorsais e ventrais deve ser realizada buscando alterações que estejam fora dos padrões de um animal hígido, observar se existe perda irregular das escamas; mudança de cor principalmente nas bordas das escamas pode indicar infecções fúngicas (WERTHER, 2004). Observar ectoparasitas entre as escamas seguido pela palpação da musculatura e pele, com o intuito de se avaliar o escore corporal, bem como qualquer aumento de volume que indique uma possível enfermidade (MEREDITH e JOHNSON-DELANEY, 2010).

Em serpentes é possível visualizar a coloração da mucosa oral e cloacal, podendo se apresentar amarelada (icterícia), vermelha (hipercorada), roxa (cianótico), pálida ou rosada, que é a coloração desejada em um animal sadio. Ainda, podemos observar a presença de placas diftéricas, áreas de necrose, deposição de muco, descamação de epitélio e presença de parasitas. Na cloaca deve ser avaliada a presença de prolapso de hemipênis, oviduto ou intestino (WERTHER, 2004).

Na avaliação oftalmica deve-se observar olhos brilhantes, com presença de reflexos pupilares e apresentar a pigmentação característica da espécie. Por ocasião da muda de pele, as serpentes podem apresentar olhos opacos, pois a escama ocular também passa por ecdise. A ausência do reflexo pode indicar alterações graves neurológicas. Ao redor dos olhos é comum encontrar pequenos ácaros que podem provocar anemia das serpentes (WERTHER, 2004). Na avaliação clínica a propriocepção do animal é analisada indicando o estado de alerta em que esse animal se encontra, a propriocepção adequada ocorre quando o animal é colocado em decúbito dorsal e retorna ao decúbito ventral imediatamente (GOULART, 2004). A aferição das constantes fisiológicas também faz parte da avaliação física, sendo

elas frequência de movimentos respiratórios por minuto, frequência de batimentos cardíacos por minuto e temperatura corpórea (MADER, 2006).

## **Termografia em Serpentes**

Ao contrário do que proponha Brattstrom (1965), que os répteis tentassem manter sua temperatura corporal em uma temperatura ótima fixa, hoje é observado que ocorrem diferentes “temperaturas ótimas” e que isso varia de acordo com a atividade realizada (AVERY, 1982). Com essa nova perspectiva de um limiar mais amplo da temperatura ótima, nos quais demonstram que esses animais tentam manter-se dentro de um intervalo de temperatura ótima durante seu período de atividade (BARBER e CRAWFORD, 1977, BARTHOLOMEW, 1982; HUEY, 1982; HUEY & HERTZ, 1984).

A faixa térmica ótima é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos, como a sazonalidade, distribuição geográfica, variação ontogenética, sexo, além dos diferentes estados fisiológicos (WITHERS e CAMPBELL, 1985; VAN DAMME et al., 1986; GIBSON et al., 1989; GVOZDIK, 2002).

As serpentes utilizam do calor do meio ambiente e de diferentes comportamentos (VEGA, 2012), como enrodilhamento ou achatamento do corpo (BERNARDE, 2014), para manter a sua temperatura corpórea dentro de um espectro relativamente estreito e próximo aos diferentes ótimos de atividade enzimática, já que a temperatura influência diretamente em todas as atividades metabólicas do organismo, uma vez que a maior parte das reações bioquímicas é mediada por enzimas e estas são temperatura-dependentes. Portanto, se a temperatura do corpo de um animal não estiver dentro de uma zona ideal, podemos verificar significativas disfunções que podem mesmo culminar com a morte do indivíduo (GOULART, 2004).

A percepção nos órgãos de sentido, a locomoção, a produção e excreção de veneno, a produção espermática e a digestão são exemplos de atividades das serpentes que estão em algum nível ligadas à temperatura e, por sua vez, diferentes atividades requerem diferentes temperaturas. Desta forma, as serpentes tentam manter-se dentro de um intervalo ótimo de temperatura, sendo esta faixa térmica

ótima influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos, referentes à sazonalidade, distribuição geográfica, variação ontogênica, sexo, além dos diferentes estados fisiológicos (STUGINSKI, et al., 2011).

Em animais silvestres de cativeiro, a termografia, vem sendo utilizada em jardins zoológicos e aquários de todo o mundo, para se chegar a diagnósticos de prenhes, infecção ou detectar a presença de tecido necrótico, sem a necessidade de recorrer a sedação. O interesse pela termografia e seus possíveis usos no campo da medicina veterinária, teve início por volta de 1963, para o estudo de doença que afetam o sistema locomotor e, em seguida, os ossos, ligamentos, tendões, articulações e musculatura, de cavalos. Desde então, a termografia, percorreu um longo caminho e tem sido utilizada como uma ferramenta de diagnóstico em muitas espécies (MARTIN, 2013).

## MATERIAL E MÉTODOS

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 número 027/2015.

### Origem das serpentes

As serpentes são provenientes de diferentes localizações do Estado do Mato Grosso do Sul que chegam ao Biotério/UCDB através de resgates feitos pela equipe do Setor ou são entregues pela Polícia Militar Ambiental (PMA), Corpo de Bombeiros, Exército, Aeronáutica, Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Centro de Reabilitação de Animais e por doações de populares. Especificamente para *B. alternatus*, todos os indivíduos mantidos no Biotério/UCDB foram oriundos da reserva urbana de aproximadamente 76 hectares, da Base Aérea de Campo Grande.

### Animais

O trabalho foi iniciado com 95 serpentes, sendo 24 *Bothrops alternatus*, 15 *Bothrops mattogrossensis*, 27 *Bothrops moojeni* e 29 *Crotalus durissus*, compreendendo animais recém-chegados (quarentena) e aquelas que se apresentavam saudáveis que já estavam acondicionados na sala de produção de veneno (cativeiro intensivo) do Biotério/UCDB.

As coletas foram realizadas bimestralmente durante 12 meses de maneira que cada animal pudesse ser monitorado por até seis coletas. A cada período de coleta os animais que vieram a óbito não foram substituídos, totalizando, ao final de 12 meses, 56 serpentes, sendo 08 *Bothrops alternatus*, 09 *Bothrops*

*mattogrossensis*, 09 *Bothrops moojeni* e 13 *Crotalus durissus*.

## **Manutenção dos animais**

Todas as serpentes, tanto as de quarentena, quanto as do cativeiro eram mantidas no sistema intensivo conforme sugerido por Melgarejo, 2003. As serpentes, tanto as da quarentena, quanto as do cativeiro, foram mantidas em salas do Biotério, alojadas em caixas de polietileno (39 cm x 59 cm x 31 cm), com tampas e perfurações nas laterais. Todas as caixas recebiam um substrato de papelão ondulado (corrugado) e um recipiente de alumínio com base de ferro para fornecimento de água. As serpentes foram mantidas, em ambiente com temperatura controlada de  $30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de 40-45%. Receberam alimentação uma vez ao mês e água *ad libitum*.

## **Manejo de higienização dos ambientes e de alimentação dos animais**

O manejo de higienização das caixas dos animais ocorria três vezes por semana, sendo água obrigatoriamente trocada durante este procedimento.

A alimentação dos animais ocorria mensalmente em datas pré-determinadas, sendo sempre no sétimo dia após os procedimentos de colheita das amostras. As serpentes eram pesadas um dia antes da oferta de alimento. Calculava-se 15% a 20% de peso total da serpente, afim determinar a quantidade de alimento em gramas que seria ofertada. Todos os animais eram alimentados com camundongos Swiss (*Mus musculus*), heterogênicos, fêmeas e machos de padrão sanitário convencional, provenientes do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

## **O manejo para a colheita de material biológico**

Todos os procedimentos foram realizados com auxílio do gancho herpetológico (Imagen 1), o animal era encaminhado para pesagem em uma balança da marca Marte® Modelo LS 500, o peso era registrado em gramas e

utilizado para auxiliar na avaliação nutricional. Nesse momento ocorria a conferência do número do chip do animal com auxílio de um sensor de leitura.

Para o procedimento de colheita das amostras biológicas a serpente era colocada em uma placa aquecedora com temperatura média de  $30 \pm 2$  °C, onde era mantida por 10 minutos com a finalidade de elevar a temperatura corporal do animal, dessa forma aumentando o calibre dos vasos sanguíneos. Em seguida a serpente era retirada da placa aquecedora introduzida em um tubo acrílico de PVC transparente (figura 13) e encaminhada para a mesa de colheita, onde eram aferidos os dados biométricos. De onde era retirada e contida na região posterior da caixa craniana, utilizando o dedo indicador e médio para a contenção direta do animal. Realizava-se a medição total do corpo da serpente, com auxílio de uma fita métrica e aferia-se o comprimento de cauda (CC) e o comprimento total (CT) de cada animal ( $\pm 0,1$  cm).

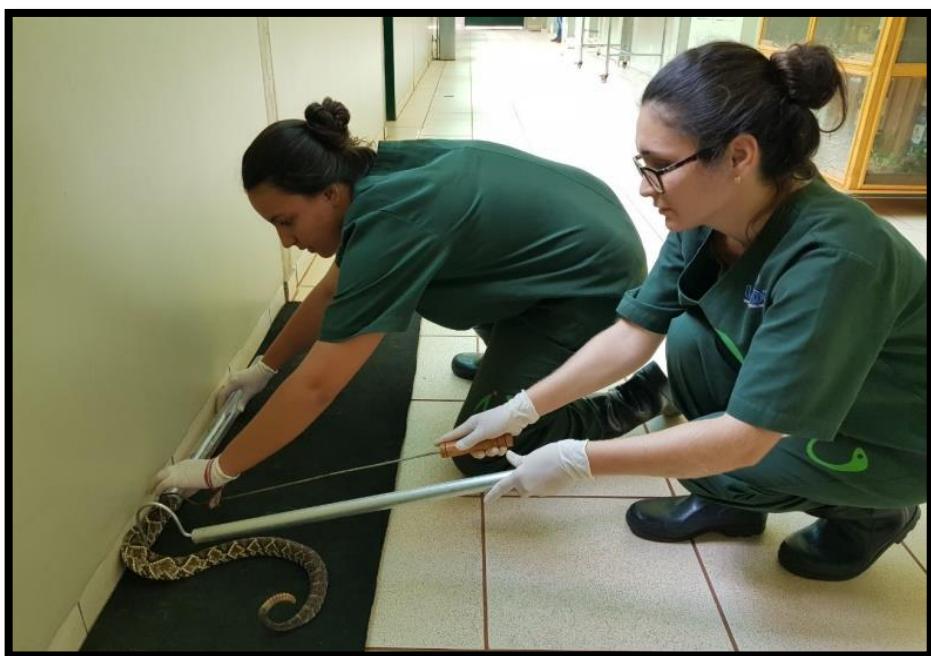


Figura 13. Procedimento de contenção da serpente.

Fonte: Luiz H. Riquelme Junior/2018.

## Hemograma

Uma vez que um réptil saudável pode tolerar uma perda aguda de até 10% do volume total de sangue (REDROBE e MacDONALD, 1999), foi coletado de cada espécime, cerca de 1,0 a 1,5 ml de sangue.

- I. A serpente era pesada;
- II. Acondicionada a serpente em uma placa aquecedora com temperatura média de 30 +- 2°C, onde será mantida por 10-15 minutos;
- III. Para limpar e desengordurar as lâminas aspergiu-se uma solução de álcool etílico mais éter (v:v);
- IV. Coletado o sangue por punção da veia caudal (CAMPBELL, 2006) com seringas de 1 mL com agulha (13x0,45mm-26G) (Figura 14);
- V. Foi dispensado 0,5 ml de sangue em um tudo coletor com 0,3 µl de heparina sódica, para exame hematológico e o restante do sangue em um tubo coletor sem anti-coagulante, para exame bioquímico;
- VI. Foi pipetado 1990µl de diluente Natt & Herrick e adicionado 10µl de sangue (Diluição 1:200), homogeneizado a mistura e colocado na câmara de Neubauer, deixado em repouso por alguns instantes. Levado ao microscópio e contado cinco quadrantes para eritócitos e multiplicado por 10.000. Utilizado a mesma diluição para hemácias, contado os quatro quadrantes para leucócitos (externos) e multiplicado por 500.
- VII. Colocado uma gota de sangue, coletado por punção da veia caudal, na extremidade da lâmina. Trocado a gota de sangue com a borda estreita da lâmina sem canto (lâmina extensora), formando um ângulo de 45° com a face superior da lâmina; feito com a lâmina extensora um ligeiro movimento para trás, até encostar-se à gota de sangue. Até que a gota se difundiu uniformemente, ao longo da borda da lâmina extensora, por capilaridade; levado a lâmina para frente, de forma que ela carregue a gota de sangue que se quer estender numa camada delgada e uniforme. É essencial escorregar a lâmina extensora de uma vez só, sem deter-se. O movimento de extensão foi sempre uniforme. O sangue deve ser puxado pela lâmina e

não ser empurrado pela mesma (movimento suave); fixada as lâminas com acetona durante 1 minuto à temperatura ambiente; corado as distensões com solução de Giemsa modificado 10% por 2 minutos; lavar a lâmina em água corrente (fluxo fino); escorrer a água e deixar secar; levar ao microscópio e fazer a leitura. O material testemunho encontrara-se depositado no Laboratório de Patologia da Universidade Católica Dom Bosco UCDB, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

**VIII.** Preenchido dois terços de um tubo capilar com sangue e foi acomodado o tubo em uma centrífuga de microcapilar, centrifugado por 5 min a 12000 rpm e verificar a porcentagem no cartão-consulta.

**IX.** Quebrado o microcapilar centrifugado e dispensar o soro sanguíneo no refratômetro e observado os valores de proteínas totais.

Todos os testes eram realizados imediatamente após a colheita do sangue.

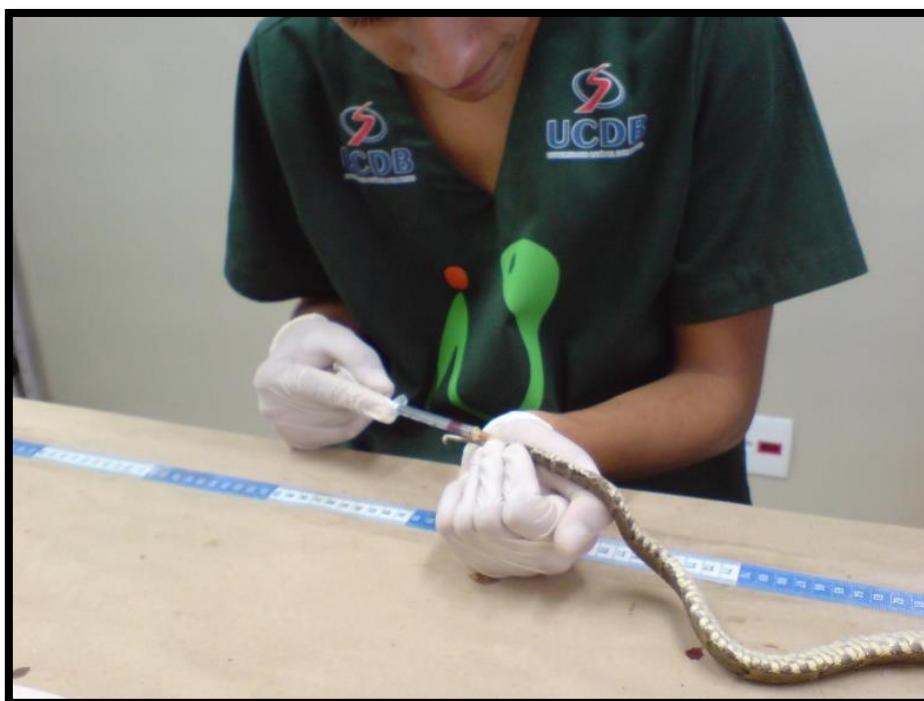


Figura 14. Procedimento de colheita de sangue utilizando a veia coccígea.

Fonte: Larissa Venier/2016.

## Exame Bioquímico

Os testes bioquímicos foram realizados através do plasma extraído da amostra de sangue total coletado do animal. Para a obtenção do plasma houve a centrifugação do tubo a 2500rpm por 10 minutos.

Os testes bioquímicos realizados foram: Uréia, Creatinina, alamina aminotransferase, aspartatoaminotransferase e fosfatase alcalina.

O mecanismo de funcionamento do aparelho bioquímico utilizado é por citometria de fluxo e o reagente utilizado para determinar a creatinina foi da marca Dialab® e dos demais testes utilizando reagentes da marca Analisa®. Os resultados das análises bioquímicas obtidos foram anotados manualmente como também arquivados no programa instalado do próprio aparelho.

## Exame Físico e Clínico dos animais

O exame físico foi realizado de acordo com Meredith e Johnson, 2010 avaliando-se as condições macroscópicas como, (i) avaliação da condição corporal, (ii) nível de hidratação, (iii) testes de propriocepção, (iv) condições da mucosa oral e cloacal, (v) avaliação das presas inoculadoras e integridade oral, (vi) reflexo pupilar, (vii) auscultação cardíaca e respiratória, (viii) secreção de veneno.

- (i) Eram avaliadas as condições de integridade das escamas ventrais e dorsais, bem como a observação do escore corporal para espécie comparando com o peso. Para a avaliação do índice corpóreo, foi feita a relação entre comprimento total sobre o peso do animal.
- (ii) Para a verificação do nível de hidratação da serpente era avaliado dobras de pele ao logo do corpo e era empregado o teste de tugor cutâneo.
- (iii) Os testes de propriocepção foram realizados observando-se a postura do animal e o comportamento de contato inicial da serpente. Após a verificação do movimento de deslocamento, bote, dardejar de língua e bater de cauda, com o gancho herpetológico o animal era colocado no solo para avaliação do nível de consciência e propriocepção através a

colocação do animal em decúbito dorsal para avaliar o tempo de retorno para a postura padrão em decúbito ventral.

- (iv) As condições da mucosa oral e cloacal foram avaliadas através da coloração em: hipercorado , hipo e normocoradas de acordo com a Figura 15.

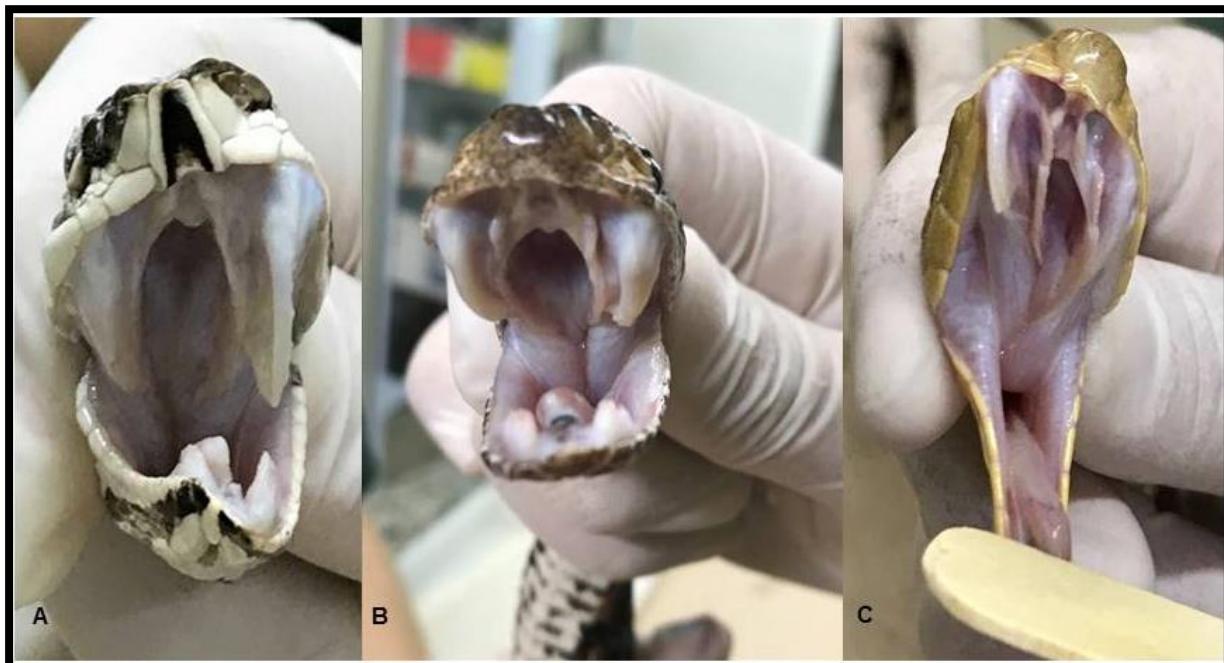


Figura 15. Representação da coloração da mucosa oral das serpentes. Sendo, A= Hipocorada; B= Normocorada; C= Hipercorada.

Fonte: Marina Lima/2018.

- (v) As presas inoculadoras eram avaliadas juntamente com a inspeção da cavidade oral do animal, onde era verificada presença de secreções na glote, duplicitade, obstrução ou ausência de presas inoculadoras de veneno, presença de edemas, hemorragias e exsudato nas gengivas.
- (vi) O reflexo pupilar era estimulado com auxílio de uma lanterna clínica para observar se as reações eram bi ou unilaterais, bem como se havia ausência de reflexos pupilares.
- (vii) A auscultação cardíaca procedeu com a localização através da palpação e observação do choque precordial (STUGINSKI et al.,

2011), em seguida fez-se o uso de estetoscópio LittmannCardiology® (Figura 16). A frequência respiratória foi obtida por visualização directa dos movimentos respiratórios (FERNANDES, 2011).

- (viii) Extração do veneno: Para proceder a extração de veneno era feita uma leve pressão para provocar a abertura da boca do animal e a exposição das presas, essas eram então introduzidas na membrana do coletor.

Logo após cada extração, a produção de veneno *in natura* de cada animal era medida ( $\pm 0,01$  ml), sendo o veneno em seguida acondicionado em ependorf de 2 ml envolto em papel alumínio e devidamente identificado com o número do animal. A produção de cada serpente era imediatamente após a extração congelada e desidratada em um liofilizador de bancada do fabricante LIOBRAS, marca Liotop®, modelo L101. Em seguida, o veneno liofilizado era pesado em uma balança analítica da marca GEHAKA, modelo AG 200 ( $\pm 0,0001$  g).



Figura 16. Processo de auscultação para avaliação de parâmetros cardíaco e respiratório.

Fonte: Marina Lima/2018.

## Mensuração da temperatura

As imagens térmicas foram obtidas utilizando-se de uma câmera termográfica Flir SC 620®, a uma distância focal de 100 cm, antes das serpentes serem inseridas em um colchão térmico à 30º C por 15 minutos, temperatura basal ( $T_b$ ), e após serem retiradas do mesmo, temperatura secundária ( $T_s$ ) (Figura 17). Considerou-se a umidade relativa e a temperatura do ambiente obtidas por meio de um termohigromômetro instalado no local de captura das imagens; a temperatura refletida do papel alumínio e a emissividade da pele humana (0,95). As análises de temperatura corpórea foram realizadas no software FLIR QuickReport 1.2 SP2 (FLIR Systems, 2009) da câmera termográfica.

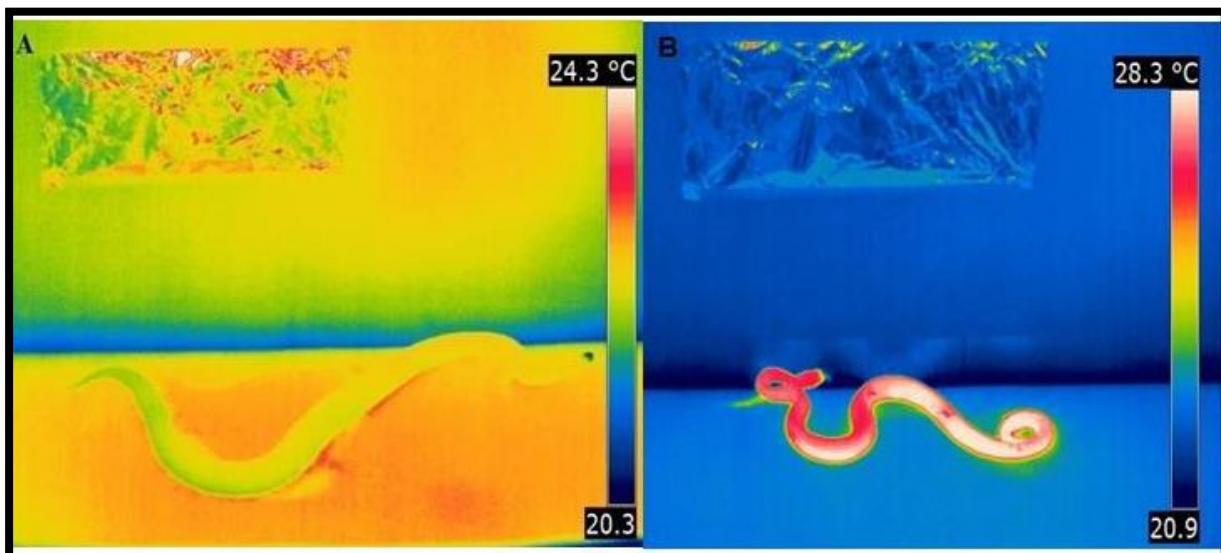


Figura 17. Imagens termográficas das serpentes antes de serem alocadas em um colchão térmico temperatura basal ( $T_b$ ), e após serem retiradas do mesmo, temperatura secundária ( $T_s$ ). Onde, A =  $T_b$ , B =  $T_s$ .

Fonte: Larissa Venier/2018.

Consideramos como Tb e Ts a média dos registros térmicos de três regiões do corpo: 1- Região anterior (RA), cabeça; 2- Região mediana (RM), cavidade celomática; 3- Região Posterior (RP), cauda, como demonstrado na Figura 18 a seguir.

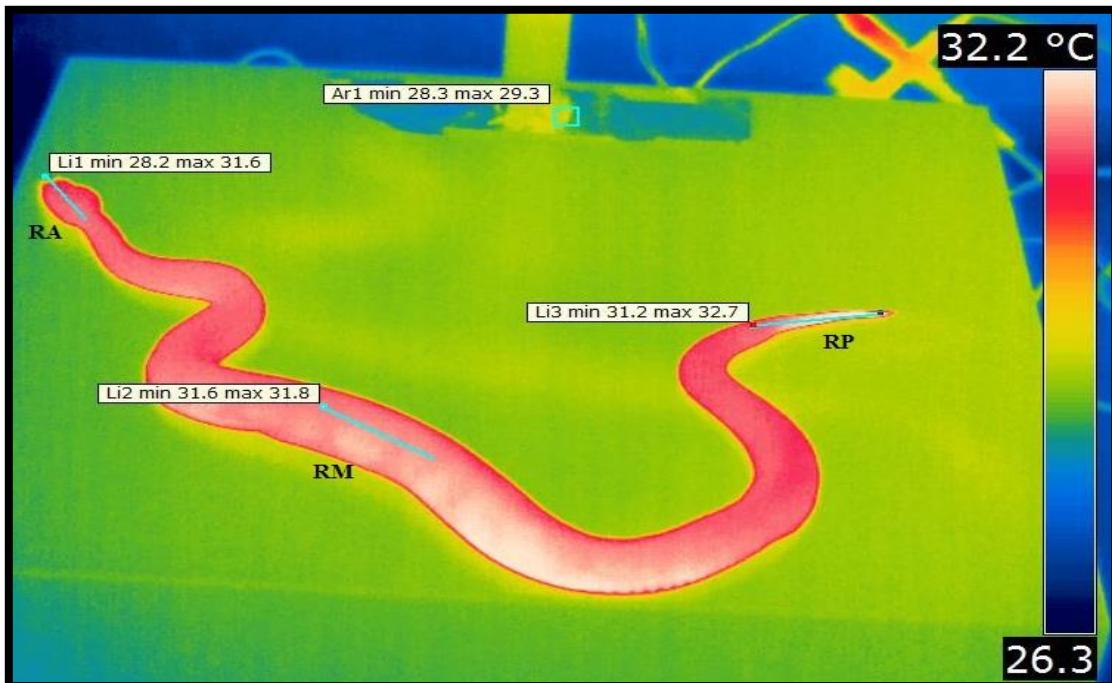


Figura 18. Regiões da superfície corpórea das serpentes que foram mensuradas as temperaturas. Onde RA= Região anterior, RM= Região mediana e RP= Região posterior.

Fonte: Larissa Venier/2018.

## Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados usando o programa SAS (SAS Institute, Cary, IN, version 9.0). Os dados foram submetidos a testes de normalidade, homogeneidade de variâncias e a presença de valores discrepantes (outliers) antes dos testes inferenciais com nível de significância de 5%. Assim, os resultados são apresentados na mesma unidade dos valores originais. As análises foram realizadas pelo método dos quadrados mínimos, utilizando o procedimento GLM do programa SAS, com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + SC_j + S_k + b_1 X_{ijk} + e_{ijkl}$$

Em que: $Y_{ijkl}$  = Característica a ser estudada;  $\mu$  = média geral da característica;  $E_i$ = efeito i-esima espécie (*Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni*, *Crotalus durissus*);  $SC$  = efeito do iésimo subgrupo (cativeiro intensivo e quarentena),  $S_k$ = efeito fixo do k-ésimo sexo (classe M: macho e F: fêmea);  $b_1X_{ijk}$  = covariável relação comprimento/peso ( $X$  = média das relações em centímetros;  $b_1$  = coeficiente de regressão associado a covariável  $X_{ijk}$  [linear] );  $e_{ijkl}$ = efeito residual do l-ésimo indivíduo (aleatório).

As características estudadas foram comprimento total (CT), peso (P), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), leucócitos, eritrócitos, hematórito (Ht), proteína plasmática total (PPT), heterófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, trombócitos, temperatura basal, temperatura secundária, secreção de veneno, alanina amino transferase (ALT), creatinina (CRET), fosfatase alcalina (FA) e uréia.

## RESULTADOS

### Análises morfométricas

As análises estatísticas mostraram diferença significativa do peso para espécie, sexo e condição corporal ( $P <0,0001$ ). Quando analisadas globalmente, a média do peso das serpentes de cativeiro foi significativamente menor ( $355,43 \text{ g} \pm 10,89 \text{ g}$ ) do que a média de peso das serpentes de quarentena ( $360,27 \text{ g} \pm 20,86 \text{ g}$ ) ( $p<0,0001$ ). A espécie que apresentou maior peso foi a *B. alternatus* com média de  $476,2 \text{ g} \pm 19,4 \text{ g}$ . Em seguida, *C. durissus* com  $357 \text{ g} \pm 17,3 \text{ g}$ , *B. mattogrossensis*  $326,2 \text{ g} \pm 28,9 \text{ g}$  e *B. moojeni* com a menor média de peso  $272 \text{ g} \pm 18,7 \text{ g}$  (Tabela 1). As fêmeas apresentaram uma maior média para variável peso com  $403,8 \text{ g} \pm 14,3 \text{ g}$ , enquanto os machos obtiveram uma média de  $311,9 \text{ g} \pm 17,4 \text{ g}$ .

As análises estatísticas mostraram diferença significativa do comprimento total para espécie ( $p<0,001$ ), sub-grupo ( $p<0,001$ ) e condição corporal ( $p<0,0001$ ). A espécie que apresentou a maior média no comprimento total foi *B. alternatus* com  $105,31 \text{ cm} \pm 1,71 \text{ cm}$ . A espécie com menor comprimento total foi *C. durissus* ( $P<0,0001$ ) (Tabela 1). O cativeiro intensivo abrigou os animais com maior comprimento total ( $100,41 \text{ cm} \pm 0,96 \text{ cm}$ ) do que a quarentena ( $93,81 \text{ cm} \pm 1,84 \text{ cm}$ ). Quando analisadas globalmente, a média do comprimento total das fêmeas foi significativamente maior ( $99,43 \pm 1,26 \text{ cm}$ ) do que a média dos machos ( $94,79 \pm 1,53 \text{ cm}$ ) ( $p<0,0001$ ).

	<i>Bothrops alternatus</i>	<i>Bothrops mattogrossensis</i>	<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Crotalus durissus</i>				
	M ± DP	Min-Max	M ± DP	Min-Max	M ± DP	Min-Max	M ± DP	Min-Max
Peso (g)	$476,2 \pm 19,4^a$	63 - 1530	$326,1 \pm 28,8^b$	8 - 515	$272,1 \pm 18,7^{bc}$	48 - 515	$357,1 \pm 17,3^{bd}$	32 - 991
Comprimento Total (cm)	$105,3 \pm 1,7^a$	71 - 160	$97,9 \pm 2,5^{bc}$	56 - 128	$96,4 \pm 1,6^b$	0,5 - 124	$88,8 \pm 1,5^{bd}$	0,5 - 198

Letras diferentes refere-se a valores diferentes com nível de 95% de significância

Tabela 1. Valores médios, desvios padrão e valores máximos e mínimos dos parâmetros morfométricos das serpentes *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*.

**Fonte:** Santa-Rita e Herrera /2018.

## Análises clínicas

A frequência cardíaca apresentou diferença significativa ( $P<0,001$ ) para espécie, subgrupo e período de coleta. A média mais baixa de batimento cardíaco foi apresentada pela *C. durissus*  $75,23 \text{ bpm} \pm 1,54 \text{ bpm}$ , e a mais alta para *B. mattogrossensis*  $86,76 \text{ bpm} \pm 2,60 \text{ bpm}$  (Tabela 2).

Para os subgrupos foram obtidas as médias de,  $75,55 \text{ bpm} \pm 0,98 \text{ bpm}$  para os animais mantidos no cativeiro intensivo e  $82,92 \text{ bpm} \pm 1,93 \text{ bpm}$  os animais recém-chegados da quarentena. Em relação aos períodos de coletas, a frequência cardíaca apresentou diferença significativa especialmente para a espécie *B. alternatus* ( $p = 0,0169$ ) nas coletas 1, 2 e 4 ( $p<0,002$ ).

Os resultados mostraram significância estatística da frequência respiratória para espécie ( $P<0,001$ ), principalmente entre *B. alternatus* ( $p = 0,0320$ ) e *B. moojeni* ( $p= 0,0206$ ), e condição corpórea ( $P<0,0001$ ). A maior média para frequência respiratória foi registrada para *B. moojeni*, com  $22,21 \text{ mpm} \pm 4,42 \text{ mpm}$ . Na sequência *C. durissus*  $21,52 \text{ mpm} \pm 4,12 \text{ mpm}$ , *B. mattogrossensis*  $15,20 \text{ mpm} \pm 6,8 \text{ mpm}$  e *B. alternatus*  $9,59 \text{ mpm} \pm 0,76 \text{ mpm}$  (Tabela 2). As análises mostraram ainda que houve uma diferença significativa para a frequência respiratória entre todas as seis coletas para *B. mattogrossensis* ( $P=0,0032$ ).

Para a quantidade de veneno secretada foi observada significância estatística para espécie ( $P<0,0001$ ), sub-grupo ( $P<0,001$ ) e condição corpórea ( $P<0,0001$ ). A maior média para a produção de veneno foi de *B. alternatus*  $565,46 \mu\text{L} \pm 39,23 \mu\text{L}$ , seguida de *B. moojeni*  $464,02 \mu\text{L} \pm 36,91 \mu\text{L}$ , *B. mattogrossensis*  $312,88 \mu\text{L} \pm 56,89 \mu\text{L}$  e *C. durissus*  $205,05 \mu\text{L} \pm 35,54 \mu\text{L}$  (Tabela 2). Estatisticamente, os valores médios da quantidade de veneno secretada foram maiores para *B. alternatus* ( $p=0,0004$ ) e *B. moojeni* ( $p<0,0001$ ).

Os animais mantidos em cativeiro intensivo apresentaram uma média de produção de veneno de  $456,14 \mu\text{L} \pm 21,39 \mu\text{L}$ , enquanto as serpentes abrigadas na quarentena apresentaram uma média de produção de veneno de  $317,57 \mu\text{L} \pm 42,82 \mu\text{L}$ .

As médias, respectivos desvios padrão, e valores máximo e mínimo para a temperatura basal e secundária encontram-se na Tabela 2. A menor temperatura basal foi registrada para *C. durissus*. As análises estatísticas mostraram diferenças significativas para temperatura basal entre espécies e índice corpóreo ( $P<0,05$ ).

As análises estatísticas mostraram diferenças significativas na temperatura secundária para sub-grupo ( $P<0,05$ ). As serpentes da quarentena apresentaram as maiores médias de temperatura secundária ( $30,5^{\circ}\text{C} \pm 0,43^{\circ}\text{C}$ ) em relação ao grupo de cativeiro intensivo ( $29,5^{\circ}\text{C} \pm 0,23^{\circ}\text{C}$ ). Ainda, houve diferença significativa para temperatura basal para as coletas 1 ( $p =0,0480$ ), 2 ( $p =0,0019$ ) e 3 ( $p=0,0305$ ).

	<i>Bothrops alternatus</i>	<i>Bothrops mattogrossensis</i>	<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Crotalus durissus</i>				
	M ± DP	Min-Max	M ± DP	Min-Max	M ± DP	Min-Max	M ± DP	Min-Max
Frequência Cardíaca (bpm)	$79,2 \pm 1,8^a$	10 - 108	$86,8 \pm 2,6^{bc}$	52 - 124	$75,8 \pm 1,8^d$	13 - 108	$75,2 \pm 1,5^{bd}$	33 - 112
Frequência Respiratória (mpm)	$9,6 \pm 0,8^a$	4 - 16	$15,2 \pm 6,8^b$	4 - 36	$22,2 \pm 4,4^c$	2 - 83	$21,5 \pm 4,1^c$	3 - 16
Secreção de Veneno (μL)	$565,5 \pm 39,2^a$	1,3 - 3.000	$312,9 \pm 56,9^{bc}$	1,2 - 1.000	$464 \pm 36,9^{bd}$	1 - 1.400	$205 \pm 35,5^b$	10 - 1.200
Temperatura Basal (°C)	$25,2 \pm 2,6$	20,3 - 30,2	$25,8 \pm 2,2^a$	21,9 - 29,4	$25,4 \pm 3,9^a$	20,3 - 33,7	$24 \pm 5^b$	19,8 - 29,5
Temperatura Secundária (°C)	$29,9 \pm 3,8$	23,6 - 37,1	$29 \pm 2,9$	25 - 35,1	$29,3 \pm 4$	24 - 38,7	$29,7 \pm 3,3$	23 - 35,2

Letras diferentes referem-se a valores diferentes com nível de 95% de significância

Tabela 2. Valores médios, desvios padrão e valores máximos e mínimos dos parâmetros clínicos das serpentes *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*.

**Fonte:** Santa-Rita e Herrera/2018.

## Análises hematológicas

Os valores médios com os respectivos desvios padrão e valores máximo e mínimo para as variáveis hematológicas estão apresentados na Tabela 3.

	<i>Bothrops alternatus</i>		<i>Bothrops mattogrossensis</i>		<i>Bothrops moojeni</i>		<i>Crotalus durissus</i>	
	M ± DP	Max-Min	M ± DP	Max-Min	M ± DP	Max-Min	M ± DP	Max-Min
Eritrócito	199,9 ± 16,2	1140 - 4,5	227,2 ± 16,2	790 - 18	233,9 ± 15	590 - 10	207,8 ± 15,1	740 - 3
Hematórito	17,9 ± 0,7	37 - 2	19,3 ± 1,	29 - 2,5	19,3 ± 0,7	33 - 6	19,2 ± 0,8	40 - 1
Leucócitos	18,5 ± 4,4	100 - 4,5	15,2 ± 6,81	36 - 4	22,2 ± 4,4	699 - 4,5	21,5 ± 4,1	270 - 3
Heterófilos	28,7 ± 1,6 <sup>a</sup>	66 - 3	28,7 ± 2,4	57 - 5	27,7 ± 1,6 <sup>a</sup>	60 - 5	32,7 ± 1,5 <sup>b</sup>	74 - 2
Linfócitos	23,1 ± 1,7	85 - 1	26,8 ± 2,5	68 - 1	26,7 ± 1,7 <sup>a</sup>	75 - 0	22,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	72 - 3
Monócitos	1,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	27 - 0	0,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	28 - 0	1,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	13 - 0	2,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	13 - 0
Eosinófilos	14,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	48 - 0	13,8 ± 1,4	48 - 0	12,5 ± 0,9	31 - 0	11,7 ± 0,9 <sup>b</sup>	38 - 0
Basófilo	13,6 ± 1,3 <sup>a</sup>	43 - 0	10,7 ± 1,9	31 - 0	10,3 ± 1,3 <sup>b</sup>	53 - 0	12,7 ± 1,2	112 - 0
Azurófilo	20,1 ± 1,1	43 - 0	20,1 ± 1,7	39 - 0	22,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	57 - 0	18,9 ± 1,0 <sup>b</sup>	45 - 0
Trombócitos	7 ± 1	56 - 0	8,7 ± 1,5	23 - 0	7,5 ± 1	80 - 0	6,4 ± 0,9	57 - 0
PPT	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	9 - 2	6,5 ± 0,9 <sup>b</sup>	11 - 3	6,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	10 - 1,8	5,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	28,8 - 1,8

Letras diferentes referem-se a valores diferentes com nível de 95% de significância

Tabela 3. Valores médios, desvios padrão e valores máximos e mínimos dos parâmetros hematológicos das serpentes *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*.

**Fonte:** Santa-Rita e Herrera/ 2018

As análises estatísticas mostraram uma variação significativa durante o período de coleta para os valores médios de:

- (i) Linfócitos de *B. alternatus* ( $p=0,0049$ );
- (ii) Monócitos para *B. alternatus* ( $p=0,0002$ ), *B. mattogrossensis* ( $p=0,056$ ) e *B. moojeni* ( $p=0,015$ );
- (iii) Eosinófilos para *B. mattogrossensis* ( $p=0,0021$ );
- (iv) Basófilos para *B. alternatus* ( $p<0,0001$ ).

Nossos resultados mostraram diferenças significativas entre as espécies de serpente para os diferentes tipos de leucócitos, de acordo com a Tabela 4.

	Heterófilo	Linfócito	Monócito	Basófilo
<i>C. durissus x B. mattogrossensis</i>	***		***	
<i>B. mattogrossensis x B. alternatus</i>		***		
<i>C. durissus x B. alternatus</i>		***	***	***
<i>C. durissus x B. moojeni</i>			***	
<i>B. alternatus x B. moojeni</i>				***

Tabela 4. Diferenças entre os valores médios para heterófilos, linfócitos, monócitos e basófilos das espécies de serpentes peçonhentas *Bothrops alternatus*, *Bothrops matogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*, mantidas no Biotério da UCDB.

**Fonte:** Santa-Rita e Herrera/2018.

Nossos resultados mostraram significância estatística para os valores médios do hematócrito em relação à condição corpórea ( $P<0,001$ ) (Tabela 5). As análises globais mostraram que houve diferença significativa para os valores de hematócrito entre animais cativeiros ( $18,84\% \pm 0,41\%$ ) e as serpentes mantidas na quarentena ( $19,01\% \pm 0,82\%$ ). Ainda, verificou-se diferenças significativas entre fêmeas ( $19,03\% \pm 0,54\%$ ) e machos ( $18,82\% \pm 0,68\%$ ) (Tabela 5).

Não foram observados diferença significativa entre leucócitos e eritrócitos em relação à espécie, sub-grupo, sexo e condição corpórea. Entretanto, os valores médios para eritrócitos ( $p < 0,0001$ ) e leucócitos ( $p = 0,0213$ ) variaram significativamente entre os períodos de coleta (Tabela 6), especialmente na coleta 2 ( $p = 0,0002$ ).

As médias expressas para heterófilos apresentaram diferença estatística apenas para condição corporal ( $P<0,05$ ) (Tabela 5). Ainda, as análises estatísticas mostraram uma variação significativa dos valores médios para heterófilos de *B. matogrossensis* ( $p=0,019$ ) nas coletas 2, ( $p=0,0065$ ), 3 ( $p=0,0041$ ) e 5 ( $p=0,0272$ ).

Em relação às células mononucleares, para as contagens de linfócitos, somente *B. alternatus* apresentou diferenças significativas ( $p =0,0020$ ) (Tabela 5). Os monócitos apresentaram diferenças estatísticas entre as espécies *B. alternatus* ( $p= 0,0003$ ), *B. matogrossensis* ( $p= 0,0541$ ) e *B. moojeni* ( $p 0,0035$ ) (Tabela 5). Ainda, os valores médios das contagens de monócitos variaram entre os períodos de coleta ( $p=0,0342$ ), especialmente para as coletas realizadas nos períodos 2, 3 e 4 ( $p= 0,0282$ ;  $p= 0,0457$  e  $p= 0,0045$ ).

Observamos diferença estatística nas contagens de eosinófilos para o período de coleta ( $p=0,0055$ ), observado na coleta 2 ( $p=0,0053$ ); para a espécie *B. matogrossensis* ( $p 0,0031$ ); e entre animais de cativeiro ( $12,05\pm0,51$ ) e quarentena ( $14,11\pm1,04$ ) (Tabela 5). Ainda, os valores de eosinófilos variaram significativamente entre os animais de cativeiro intensivo ( $p < 0,0001$ ).

Nossos resultados mostraram que as médias dos valores obtidos para basófilos apresentaram diferenças significativas ( $p<0,0001$ ), principalmente para o período de coleta 4 ( $p = 0,0312$ ); para a espécie *B. alternatus* ( $p < 0,0001$ ); e para o subgrupo de cativeiro intensivo ( $p = 0,0153$ ) (Tabela 5).

Os resultados para os valores médios de PPT mostraram uma maior média para *Bothrops matogrossensis* ( $6,46 \pm 0,38$ ) e a menor média para *Crotalus durissus* ( $5,17 \pm 0,23$ ) (Tabela 5). Observamos diferença significativa para o PPT em relação à espécies ( $P<0,05$ ), *B. matogrossensis* ( $p = 0,0405$ ) e *B. moojeni* ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 5). Ainda, os resultados para PPT apresentaram diferença altamente significativa para período de coletas ( $p<0,0001$ ), especialmente nas coletas realizadas nos períodos 1, 3 e 5 ( $p= 0,0010$ ;  $p= 0,0036$  e  $p= 0,0194$ ), e condição corpórea ( $P<0,001$ ).

Não foram observadas diferenças significativas entre as variáveis para azurófilos e trombócitos.

Variáveis	Espécie	Subgrupo	Sexo	Condição Corporal	Coleta
Eritrócito					p<0,0001
Hematócrito			p=0,05	p=0,05	p=0,001
Leucócitos					p=0,0213
Heterófilos	<i>B matogrossensis</i> *			p<0,05	p=0,0102
Linfócitos	<i>B alternatus</i> **				
	<i>B alternatus</i> ***				
Monócitos	<i>B matogrossensis</i> *				p=0,0342
	<i>B moojeni</i> **				
Eosinófilos	<i>B matogrossensis</i> **	Intensivo***			p=0,0055
Basófilo	<i>B alternatus</i> ***	Intensivo**			p<0,0001
PPT	<i>B matogrossensis</i> *			p<0,001	p<0,0001
	<i>B moojeni</i> ***				
ALT					p=0,0318
FA	<i>B moojeni</i> *		Fêmea*		p<0,0001
Creatinina	<i>B alternatus</i> *				p<0,0502
	<i>B moojeni</i> *				
Uréia	<i>B alternatus</i> **				p < 0,0164
	<i>B moojeni</i> *				

Tabela 5. Influência de espécie, subgrupo, sexo, condição corporal e período de coleta nos os valores hematológicos e bioquímicos.

Fonte: Santa-Rita e Herrera/2018.

## Análises bioquímicas

Nossos resultados mostraram que os maiores valores para creatinina foram observados para *B. moojeni* ( $0,89 \pm 0,03$ ) e *B. mattogrossensis* ( $0,86 \pm 0,05$ ) (Tabela 6). Valores de creatinina apresentaram significância estatística entre *B. alternatus* ( $0,84 \pm 0,04$ ) e *C. durissus* ( $0,74 \pm 0,03$ ) (Tabela 6). Os valores de ureia apresentaram médias significativamente diferentes entre as espécies *B. alternatus* ( $p= 0,0036$ ) e *B. moojeni* ( $p= 0,0475$ ) (Tabela 6). A única enzima que apresentou diferença estatística para a variável sexo ( $p= 0,0213$ ) foi a FA ( $p= 0,0213$ ) (Tabela 5).

Nos resultados bioquímicos mostraram diferenças significativas entre os períodos de coleta para ALT ( $p=0,0318$ ), FA ( $p<0,0001$ ), Creatinina ( $p<0,0502$ ) e uréia ( $p<0,0164$ ) (Tabela 5). Sendo que para ALT e creatinina as diferenças significativas aparecem na coleta 3, com os valores de  $p=0,0511$  e  $p=0,0184$  respectivamente. A ureia apresentou diferença estatística na coleta 1 e 2 ( $p= 0,0016$  e  $p= 0,0555$ ), enquanto que a FA na coleta 4 ( $p=0,0019$ ).

Os resultados das médias para ALT apresentam-se mais altos para *B. moojeni* ( $12,42 \pm 1,69$ ), seguida de *C. durissus* ( $11,96 \pm 1,52$ ), *B. mattogrossensis* ( $11,45 \pm 2,56$ ) e *B. alternatus* com ( $10,4 \pm 1,79$ ) (Tabela 6). Já os valores de uréia, *B. alternatus* apresentou a maior média  $7,34 \pm 0,59$  seguida das demais espécies (Tabela 6). A Fosfatase alcalina apresenta à média mais alta para *B. moojeni* ( $3,30 \pm 0,42$ ), enquanto *B. mattogrossensis* obteve a média mais baixa ( $2,38 \pm 0,72$ ) (Tabela 6). Não foram observados diferença significativa para essas variáveis em relação à espécie, sub-grupo, sexo e condição corpórea.

	<i>Bothrops alternatus</i>	<i>Bothrops mattogrossensis</i>	<i>Botrops moojeni</i>	<i>Crotalus durissus</i>				
	M $\pm$ DP	Max-Min	M $\pm$ DP	Max-Min	M $\pm$ DP	Max-Min	M $\pm$ DP	Max-Min
Creatinina	$0,8 \pm 0,04^a$	1,7 - 0,3	$0,8 \pm 0,05$	1,63 - 0,28	$0,9 \pm 0,03^c$	1,7 - 0,3	$0,7 \pm 0,03^{bd}$	1,4 - 0,06
ALT	$10,1 \pm 1,8$	49,2 - 0	$11,4 \pm 2,5$	57,34 - 1,19	$12,4 \pm 1,7$	57,5 - 0	$11,7 \pm 1,5$	81,4 - 1,2
Uréia	$7,3 \pm 0,6^a$	29,7 - 1,4	$5,6 \pm 0,8$	20,23 - 0	$6,5 \pm 0,6$	22,6 - 0,7	$5,7 \pm 0,5^b$	23,1 - 0,2
FA	$3,1 \pm 0,4$	12 - 1	$2,4 \pm 0,7$	6 - 1	$3,3 \pm 0,4$	23 - 1	$2,8 \pm 0,4$	18 - 1

Letras diferentes refere-se a valores diferentes com nível de 95% de significância

Tabela 6. Valores médios, desvios padrão e valores máximos e mínimos dos parâmetros bioquímicos das serpentes *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*.

**Fonte:** Santa-Rita e Herrera/2018.

## DISCUSSÃO

As serpentes da espécie *B. alternatus* do presente trabalho apresentaram a maior média para peso e comprimento ( $476,2\text{ g} \pm 19,4\text{ g}$  e  $105,3\text{ cm} \pm 1,71\text{ cm}$ ) dentre as demais espécies estudadas, superando *C. durissus* ( $357,05\text{ g} \pm 17,27\text{ g}$  e  $88,81\text{ cm} \pm 1,52\text{ cm}$ ), que naturalmente são animais mais robustos podendo ultrapassar o comprimento de 140,5 cm (SAWAYA et al., 2008) e apresentar um peso que pode chegar a 5.922 g de um animal adulto (Dados Biotério/UCDB). Mesmo contando com menor número de espécimes ( $n=24$ ) de *B. alternatus* do que *C. durissus* ( $n=29$ ) no início do experimento, *B. alternatus* apresentaram a maior média para peso e comprimento do que *C. durissus*. De fato, *B. alternatus* é, entre as espécies de *Bothrops* de Cerrado, a mais generalista em relação ao uso do ambiente (SAWAY, 2008). Esta plasticidade adaptativa permite dessa forma a coexistência de *B. alternatus* com populações humanas. De fato, todas as *B. alternatus* utilizadas no presente estudo são oriundas de uma reserva urbana (base aérea) e do seu entorno, tendo como base alimentar roedores silvestres e urbanos. Desta forma, esses animais certamente contam com grande oferta de alimentos, explicando assim o motivo dessa espécie estar acima da média em peso e comprimento das demais espécies estudadas. Embora *B. alternatus* tenha apresentado maior média para comprimento total entre as espécies estudadas, a média de comprimento de *B. alternatus* do plantel do Biotério da UCDB foi verificada como dentro dos parâmetros relatados na literatura (100 cm a 169 cm) (CAMPBELL e LAMAR, 1989 e 2004; NUNES, 2006).

As fêmeas das espécies estudadas apresentaram médias maiores para comprimento e peso do que os machos, seguindo o reportado por vários autores que estudam biologia e história natural de serpentes (SAZIMA, 1992; OLIVEIRA, 2003, PIZZATTO, 2006). Desta forma, nossos dados sugerem que, apesar do estresse promovido pelo cativeiro, as fêmeas conseguem manter sua performance nutricional estando aptas a reprodução.

A diferença no comprimento total encontrada entre machos e fêmeas de *B. alternatus* pode estar associada à padrões comportamentais. De fato, o crescimento

maior das fêmeas corresponde ao padrão mais comum em serpentes, podendo estar relacionado à ausência de comportamento de combate entre machos (SHINE, 1978, 1994; NUNES, 2006). Uma vez que não há registros de comportamento de combate entre machos de *B. alternatus* a diferença no CT encontrada entre machos e fêmeas é esperada. O dimorfismo sexual parece ser uma tendência neste gênero ocorrendo também em outras espécies como *B. asper* (SOLÓRZANO e CERDAS, 1989), *B. jararaca* (SAZIMA, 1992), *B. fonecaia* (SAZIMA e MANZANI, 1998), *B. atrox* (OLIVEIRA, 2003) e *B. pubescens* (HARTMANN et al., 2009).

Ainda, o dimorfismo sexual encontrado para o comprimento total de *B. alternatus* pode estar relacionado à reprodução e fecundidade (SEIGEL e FITCH, 1984; ALMEIDA-SANTOS, et al., 2014). Em machos, o menor tamanho corporal (CT) confere maior mobilidade e, consequentemente, maior deslocamento, oportunizando o aumento do número de cópulas (SHINE, 1978; NUNES, 2006). Conforme SHINE (1994), a forma de reprodução pode contribuir para a ocorrência do dimorfismo sexual no tamanho: *B. alternatus* é vivípara, e a evolução da viviparidade em serpentes teve como resultado direto o incremento do tamanho da fêmea em relação aos machos conspecíficos (SHINE, 1994). Em fêmeas de *Bothrops* sp., a maturidade sexual pode ser atrasada até a terceira temporada reprodutiva, em função do alto custo da reprodução (SHINE, 1978), pois estas necessitam de maior tamanho da cavidade do corpo, podendo levar mais tempo para alcançar a maturidade reprodutiva (SEIGEL, et al., 1987) e precisam de maiores comprimentos corporais para produzir maior massa de ovos e maior número de filhotes (LUISELLI, 1996; NUNES, 2006). Nunes, (2006) sugere que a temperatura mantida relativamente constante em um serpentário pode resultar na perda do caráter reprodutivo sazonal estacional. De fato, observamos o nascimento de filhotes de *B. alternatus* em julho, quando que na natureza esse período corresponde a cópula dos animais. Desta forma, com a reprodução ocorrendo em qualquer período do ano, as fêmeas cativas poderão se desenvolver mais.

Nossos resultados mostraram que os animais mantidos no cativeiro intensivo apresentaram maiores médias no comprimento ( $100,41\text{ cm} \pm 0,96\text{ cm}$ ) do que as serpentes recém-chegadas, mantidas sob quarentena ( $93,81\text{ cm} \pm 1,84\text{ cm}$ ). Entretanto, os animais da quarentena apresentaram maior peso ( $360,27\text{ g} \pm 20,86\text{ g}$ )

em relação às cativas ( $355,43 \text{ g} \pm 10,89 \text{ g}$ ). Sazima (1992) reporta que o comprimento das serpentes está diretamente relacionado à predação. O maior peso observado nas serpentes recém-chegadas pode estar relacionado a grande disponibilidade de pequenos mamíferos em áreas nativas e modificações (MARTINS, 1998; SAWAYA, 2008; ESTEVES, 2016). O menor peso observado para as serpentes cativas pode estar relacionado ao manejo alimentar pelo qual os animais estão submetidos. Após a chegada ao Biotério da UCDB, as serpentes são alimentadas com uma dieta (*Mus musculus*) equivalente a 10 a 20% do seu peso corpóreo segundo Melgarejo-Gimenez, (2006) no sentido de se evitar o sobrepeso. De fato, serpentes cativas são privadas de movimentações e consequente gasto de energia e o manejo nutricional utilizado no Biotério da UCDB evita o sobrepeso, bem como doenças metabólicas provocadas pelo excesso de proteína e gordura que compõe as bases alimentares das serpentes (MADER, 2006; CUBAS, 2007; JEPSON, 2010; CUBAS, 2014). Répteis que sofrem um estresse agudo intenso ficam predispostos a emaciação, depressão imune e dificuldades reprodutivas. Por outro lado, os animais cronicamente estressados podem desenvolver obesidade e lipideose hepática (SILVESTRE, 2014).

Em relação à frequência cardíaca e respiratória, a diferença significativa encontrada entre as espécies estudadas pode ser associada com a diferença estatística encontradas nas temperaturas basais observadas. De fato, répteis terrestres são animais poiquilotérmicos, que em geral oscilam sua temperatura corporal de acordo com as temperaturas externas (MADER, 2006). Em outras palavras não usam seus metabolismos para aquecer ou esfriar a si mesmos. Assim, as frequências cardíacas e respiratórias acompanham as temperaturas basais para cada espécie no sentido de manter o metabolismo. As médias de temperatura corporal encontradas para as quatro espécies de serpentes do presente estudo encontram-se dentro do gradiente térmico sugerido por Goulart (2004), entre 20°C e 39°C.

No presente trabalho, foi observada a discrepância nos valores mínimos e máximos dos animais avaliados principalmente de *B. moojeni*. Para Warwick et al, (2013) e Silvestre (2014) as alterações comportamentais que possam expressar a excitação psicológica, como agressividade, estereotipias (como o esconder a

cabeça, realizar movimentos erráticos), anorexia, taquicardia, bradicardia, espasmos musculares, tanatose, entre outras ações, são formas para o animal minimizar as respostas fisiológicas.

As do presente estudo apresentaram os batimentos cardíacos mais baixos das espécies estudadas ( $75,2 \text{ bpm} \pm 1,5 \text{ bpm}$ ). Alguns autores relatam valores menores para a frequência cardíaca em cascavéis,  $45,4 \pm 4,5 \text{ bpm}$  (STUNGINSK, et al., 2011) e  $12,8 \pm 2,2 \text{ bpm}$  (CAMPBELL et al., 2006), sem a influência do peso e o sexo, como também observado em nosso estudo. Campbell et al. (2006) utilizaram *data loggers* implantados na cavidade celomática de cascavéis. O uso de *data logger* possibilita, por exemplo, uma aferição precisa da frequência e ritmo cardíaco do animal em descanso, já que após a introdução do aparelho via cirurgia o animal é deixado em recuperação e seus parâmetros cardíacos são então aferidos com uma menor influência do fator estressante da contenção (CRUZ e JUNKES, 2008; STUNGINSK, et al., 2011), todavia, seu alto custo e a necessidade de realizar uma pequena cirurgia o tornam pouco viável na rotina clínica (STUNGINSK, et al., 2011). Portanto, pode ser sugerido que tais valores aferidos no presente trabalho se deve ao manejo para contenção dos animais.

Outro fato observado é que as serpentes do nosso trabalho apresentaram valores de frequência cardíaca contrária do que foi observado em serpentes da espécie *Spilotes pullatus* quando contidos. De fato, dois minutos após a fixação dos eletrodos ao corpo de *S. pullatus*, serpente da família Colubridae, os animais apresentavam-se totalmente imóveis, com a temperatura corporal de  $31,1^\circ\text{C}$  e uma diminuição significativa dos batimentos cardíacos de  $64 \pm 3$  para  $23 \pm 2$  por minuto (DA VEIGA, 2008; CRUZ e JUNKES, 2008;). Nos vertebrados, a percepção dos estímulos nocivos provenientes do ambiente, por meio do sistema sensorial (olfato, visão, tato, dor), permite a ativação de respostas comportamentais e fisiológicas adequadas à proteção, adaptando o organismo a diferentes contextos (GOULART, 2004; MADER, 2006; DA VEIGA, 2008; CRUZ e JUNKES, 2008). Entretanto, um estímulo de medo/ansiedade, caracterizada pela imobilidade comportamental e ativação do sistema nervoso parassimpático e/ou diminuição do simpático, com redução da frequência cardíaca (DA VEIGA, 2008; CRUZ e JUNKES, 2008) ocorra em colubrídeos, os estímulos apresentados pelo ambiente e identificados pelo

animal apresentam diferentes respostas fisiológicas para os viperídeos. Ainda, devemos considerar que alguns estímulos nocivos do ambiente podem ser de tal magnitude que, aparentemente, o sistema nervoso pode ficar incapacitado de gerar uma resposta eficiente, podendo levar o organismo ao desfalecimento e à morte (síncope vagal) (GRUBB et al., 1992; DeTOLEDO, 1999). Deste modo, o manejo e cuidados durante um procedimento de intervenção clínica em serpentes devem ser cuidadosamente desenvolvidos no sentido de minimizar os riscos à saúde do animal. O posicionamento em decúbito dorso-ventral é fundamental para a aferição dos batimentos cardíacos em serpentes, já que para animais de corpo cilíndrico, outras posições podem potencialmente influenciar na determinação dos vetores cardíacos (SHOEMAKER e ZANDVLIET, 2005; MADER, 2006; CRUZ e JUNKES, 2008, STUNGINSK, et al, 2011).

Hangensen et al. (2008), através de aplicação de substância que promove a obstrução dos vasos coronarianos (MICROFIL®), relatou que a obstrução do fornecimento de sangue não afeta a capacidade de manter a pressão arterial e a freqüência cardíaca quando em repouso, durante um curto prazo de atividade, ou de acusar anormalidades no eletrocardiograma, apresentando dessa forma, uma alta capacidade das cascavéis a hipoxia. Também não foi observada nenhuma indicação de necrose no músculo cardíaco com a presença do MICROFIL®. A frequência cardíaca e as pressões sanguíneas foram semelhantes aos dados obtidos anteriormente ao processo de obstrução das coronárias. Mostrando dessa forma o alto limiar de tolerância das cascavéis a estímulos externos.

Os valores médios de hematócrito para *B. alternatus* ( $17,9\% \pm 0,7$ ), *B. matogrossensis* ( $19,2\% \pm 1,1$ ), *B. moojeni* ( $19,3\% \pm 0,7$ ) e *C. durissus* ( $19,2\% \pm 0,7$ ) do presente trabalho apresentam valores significativamente diferentes para condição corporal. Nesse sentido, os valores de hematócrito relatados na literatura para as espécies estudadas variam muito dependendo das condições de manejo a que são submetidas às serpentes, com reflexos diretos no peso e comprimento. Assim, a média do Ht% encontrada para cascavéis do Biotério da UCDB foi inferior a mencionada por Troiano et al, (1997) e Grego et al, (2014) para cascavéis adultas mantidas em cativeiro na Argentina ( $22,7\% \pm 3,57$ ) e no Instituto Butantã em SP ( $24\% \pm 3,8$ ) respectivamente. Entretanto, para *B. moojeni* os valores de Ht%

encontrados no presente trabalho foi maior do que aqueles relatados por Rameh-de-Albuquerque (2007) e Grego et al. (2014) 14% e  $14,1\% \pm 5,2$  respectivamente.

ESPÉCIE	Santa-Rita (2018)	Grego et al. (2014)	Rameh de Albuquerque (2007)
	Hematócrito (%)		
<i>Bothrops alternatus</i>	17,9	26,5	27
<i>Bothrops mattogrossensis</i>	19,3	22,1	24
<i>Bothrops moojeni</i>	19,3	14,1	14
<i>Crotalus durissus</i>	19,2	24	24

Tabela 7. Valores médios de hematócrito (%) das serpentes *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*, descritos por três diferentes autores.

**Fonte:** Santa-Rita e Herrera/2018

A diferença significativa para os valores de hematócrito em relação ao índice corporal encontrados nas serpentes do Biotério da UCDB sugere que animais desidratados, com menor peso, apresentem valores de hematócrito fora da normalidade esperada. De fato, o hematócrito é utilizado para mensuração de hidratação (GEORGE, et al., 2008; GONÇALVEZ, 2016) e seus valores podem variar imensamente entre 20 a 40% (WALLACH e BOEVER, 1983; MARKS e CITINO, 1990; FRYE, 1991; STACY et al., 2011), dependendo da espécie e condições de manejo. Devemos ainda considerar que durante o processo de ecdise pode ocorrer uma ligeira desidratação, a qual sugere um aumento no valor do hematócrito (SILVESTRE, 2003; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007). Embora seja mais fácil encontrarmos valores mais baixos na contagem total da série vermelha no período de inverno (GOULART, 2004; GEORGE, et al., 2008; PAIVA, 2015), não foi observada variação significativa para hematócrito no decorrer das coletas, podendo sugerir que a manutenção do controle de temperatura, umidade, fotoperíodo e manejo sanitário do macro e microambiente onde são mantidas as serpentes podem minimizar uma possível variação decorrente da sazonalidade.

Houve diferença significativa observada nos valores médios para hematócrito nos animais recém-chegados (quarentena 19% ± 0,8%) em comparação aos animais que já compõem o plantel do Biotério (cativeiro intensivo 18,8% ± 0,4%) pode estar relacionada ao nível de estresse nos animais recém-chegados como sugerem outros autores também (GOULART, 2004; MADER, 2006; GREGO, 2006; ALMOSNY, 2014). De fato, alguns autores relatam que fisiologicamente após 3 minutos pós-captura ocorre o aumento da concentração de corticosterona, desencadeando dessa forma, a resposta do organismo da serpente ao estresse (SILVESTRE, 2014; PAIVA, 2015). Ainda, os valores para hematócrito registrados em nosso estudo encontram-se abaixo dos sugeridos por Troiano, et al. (1997) e Kolesnikovas, et al. (2007), inclusive dos animais de quarentena, podendo sugerir uma resposta positiva no manejo desenvolvido na área de quarentena do Biotério/UCDB.

Nossos resultados mostraram que as fêmeas viperídeas apresentaram valores médios de hematócrito significativamente mais altos que os machos (19,03% ± 0,54% e 18,82% ± 0,68% respectivamente), diferente dos resultados obtidos para elapídeos que relatam valores mais elevados de Ht% para os machos em relação as fêmeas (PARIDA et al., 2014; DISSANAYAKE et al., 2017). Ainda, as análises estatísticas apontaram que os animais da quarentena possam estar desidratados visto que os valores de hematócrito foram significativamente maiores do que as serpentes mantidas em cativeiro intensivo, sugerindo uma resposta de estres consequente da captura e adaptação ao cativeiro.

Em nosso estudo, o número de eritrócitos surge com valores inferiores aos mencionados por Rameh-de-Albuquerque (2007) para as quatro espécies aqui avaliadas (Tabela 8). Entretanto, para os valores eritrocitários citados por Grego et al, (2014), os valores de três espécies aparecem superiores aos encontrados no presente trabalho (Tabela 8), com exceção de *B. moojeni*, onde os valores apresentaram-se próximos de Grego, et al, (2014). Devemos ressaltar que nossas médias foram aferidas ao longo de 12 meses, portanto temos o fator sazonalidade como ponderação nos valores, ao contrário das demais autoras em que seus dados foram obtidos em coletas pontuais e de animais recém-nascidos. Ainda, devemos considerar que no período de até de 2 anos de sobrevida das serpentes em cativeiro há possibilidade de ocorrer a síndrome da má adaptação, influenciando nos valores

hematológicos e bioquímicos (SELYE, 1973; GUILLETTE, et al., 1997, GOULART, 2004; GREGO, 2006; BASSETTI e VERDADE, 2014).

ESPÉCIE	Santa-Rita (2018)	Grego <i>et al.</i> (2014)	Rameh de Albuquerque (2007)
	Eritrócitos mm <sup>3</sup>		
<i>Bothrops alternatus</i>	199,9	430,7	430
<i>Bothrops mattogrossensis</i>	227,3	450	450
<i>Bothrops moojeni</i>	233,9	219	215
<i>Crotalus durissus</i>	207,8	423	420

Tabela 8. Valores médios de eritrócitos ( $10^3$  células/mm<sup>3</sup>) das serpentes *Bothrops alternatus*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*, descritos por três diferentes autores.

**Fonte:** Santa-Rita e Herrera /2018

Embora os resultados obtidos para PPT no presente trabalho estejam dentro dos valores sugeridos para as serpentes, entre 3 e 7 g/dL (THRALL et al., 2004), foi observado que os valores de PPT diferem significativamente seus valores entre as espécies amostradas. O índice corpóreo também influenciou os valores de PPT indicando que animais desidratados, com menos peso, possam estar com algum processo que venha causar um quadro de hipoalbuminemia em decorrência de alguma disfunção hepática como enfatiza Goulart, (2004) e Mader (2006).

Os valores encontrados para leucócitos nos viperídeos estudados nesse trabalho foram expressivamente maiores do que os citados em literatura. Esse fato possivelmente está associado com o estresse das três últimas coletas por conta das atividades de reforma do Biotério da UCDB. Realmente, estudos relacionados à fisiologia do estresse em serpentes mostram que os seguintes fatores são encontrados em resposta ao estresse: (1) mudanças comportamentais, (2) alterações no funcionamento do sistema nervoso autônomo, (3) respostas neuroendócrinas e (4) respostas imunes (HATTINGH e WILLEMSE, 1976; MADER, 2006; GREGO; 2006; SILVESTRE, 2014). O conhecimento de todos os elementos do estresse que são delineados anteriormente pode ser útil nos esforços para mede esta condição de doença em répteis. O estresse não só induz a ativação do sistema simpático, mas também dirige uma resposta neuroendócrina, inicialmente mais

lenta, mas potencialmente mais duradouro (SILVESTRE, 2014). O eixo neuroendócrino é essencial na regulação das funções fisiológicas competência imunológica, reprodução, metabolismo e comportamento. A captura e eventos envolvendo este processo são conhecidos como sendo um dos principais estressores em espécies de répteis (SOLIS-SOLIS, 2010). A liberação de corticosteróides afeta diferentes espécies de répteis em diferentes períodos; portanto, os efeitos indesejáveis destes compostos produzidos internamente devem ser considerados em espécies de répteis em cativeiro. E uma das principais manifestações hematológicas durante esse processo é a leucocitose (GOULART, 2004; GREGO, 2006; MADER, 2006; GREGO; et al., 2014; SILVESTRE, 2014). O aumento nos níveis de glicocorticoides podem ser sinalizados no leucograma na forma de heterofilia e linfopenia (AL-JOHANY e HAFFOR, 2005; DAVIS, et al. (2008), de forma que a relação entre heterofilo / linfócito revela que quanto maior este valor, menor o bem-estar do animal e maior o estresse (PAIVA, 2015).

Em serpentes observa-se uma leucocitose antes da ecdisse, enquanto que durante e depois da muda se observa leucopenia (SILVESTRE, 2003). Segundo Campbell (1996), em serpentes o número de leucócitos totais varia de 6 – 12 x 10<sup>3</sup> cel/µl.

As médias para heterófilos das serpentes do Biotério da UCDB apresentaram diferença significativa para condição corporal. Animais com debilidade corporal podem estar mais propensos a apresentar condições não inflamatórias como estresse e neoplasias, estando associadas à heterofilia (RASKIN, 2000; TROIANO, et al., 2001). Ainda, das espécies avaliadas, *B. mattogrossensis* mostraram uma variação significativa dos valores médios para heterófilos, sendo esta espécie sujeita a elevada condição de estresse (MARTINS, et al., 2001). Em animais saudáveis os heterófilos representam cerca de 30 a 45% do total de leucócitos, podendo atingir o índice de 65% em casos de infecção bacteriana (FRYE, 1991).

A variação significativa observada para os valores médios de heterófilos de *B. mattogrossensis* durante o período de coleta no presente estudo, sugere a sensibilidade da espécie ao cativeiro, ao manejo excessivo e as mudanças repentinas no ambiente cativo, tendo em vista, que os valores que apontaram alterações foram as coletas 2 ( $p=0,0065$ ), 3 ( $p=0,0041$ ) e 5 ( $p=0,0065$ ), onde na

coleta 2 e 3 começaram as atividades de remoção de materiais e animais (roedores) para o início das obras de reforma do Biotério, mesmo essas ações ocorrendo em outra ala do prédio aparentemente as *B. mattogrossensis* manifestaram fisiologicamente essas atividades. E durante a coleta número 5 as serpentes já haviam sido removidas para outro bloco da Universidade, portanto, embora as tentativas de minimizar os impactos da mudanças para os animais, como a preparação da sala para recebimento dos mesmos, sendo higienizada com os mesmos produtos utilizados nas salas de manutenção das serpentes, estabilização da temperatura constante na sala, controle da umidade, diminuição na rotina de manejo e redução do número de pessoas na nova sala, não foi suficiente para a sensibilidade de *B. mattogrossensis* sugerindo uma confirmação que essa espécie é uma das mais sensíveis a resposta comportamental (CARDOSO, 2003; MACHADO, 2010; BERNARDE, 2014) e fisiológica (MARTINS, et al., 2001; MONTEIRO et al., 2006; BERNARDE, 2014).

Nossos resultados mostraram que para viperídeos, os linfócitos são o segundo tipo celular mais abundante, ficando atrás dos heterófilos. Entretanto, assim como descrito por Dissanayake et al, (2017) para as serpentes elapídicas, dentre as categorias de glóbulos brancos, os linfócitos são as células mais abundantes. As análises estatísticas mostraram uma variação significativa durante o período de coleta para os valores médios de linfócitos para *B. alternatus*. Realmente, em répteis é detectada uma variação na contagem de linfócitos de acordo com a sazonalidade: linfocitose é registrada nos períodos de verão nos países temperados (DUGUY, 1970; WRIGHT, 1981 GONÇALVES, 2016; DISSANAYAKE et al., 2017). Embora a variação térmica registrada em Campo Grande Mato Grosso do Sul não seja expressiva como nos países temperados, mesmo mantendo a constância climática dentro do macroambiente do cativeiro, houve uma diferença significativa na contagem dos linfócitos ao longo do tempo para *B. alternatus*. A linfopenia é associada com a má nutrição, ou secundária a enfermidades causadas por estresse e imunossupressão. Por outro lado, a linfocitose está relacionada à cicatrização, doença inflamatória e infecções parasitárias (hematozoários ou mesmo parasitas intestinais) e virais (MOÇO, et al., 2002; CAMPBELL, 2006; PAIVA 2015). Segundo Grego (2006), a corticosterona liberada em situações de estresse se liga a

receptores presentes no interior dos leucócitos, ocasionando na maioria dos casos, uma imunossupressão, caracterizada principalmente, por um aumento expressivo no número sanguíneo de heterófilos e uma redução importante na contagem de linfócitos, embora a contagem total de leucócito pareça não se alterar. O aumento da razão entre heterófilos / linfócitos, tem sido usado para medir o estresse em tartarugas marinhas (AGUIRRE e BALAZS, 2000; GREGO, 2006). Embora os linfócitos em répteis apresentam diferença na contagem determinados por sexo, onde valores mais altos são observados para as fêmeas (PAIVA, 2015) não foram observadas variações nos gêneros das espécies amostradas.

As análises estatísticas mostraram que houve diferença significativa para os valores médios de eosinófilos entre os animais de cativeiro e quarentena. Em répteis, geralmente o número de eosinófilos varia de 7 a 20% do total de leucócito (FRYE, 1991), sendo que a eosinofilia está relacionada a infecções parasitárias (helmintos e protozoários) e estimulação do sistema imune (CAMPBELL, 2006). Ainda, os eosinófilos estão ausentes na maioria das espécies de cobras, sendo relatados em cobras-rei (*Ophiophagus hannah*) (DOTSON et al., 1995; ALLEMAN e JACOBSON, 1999; SALAKIJ et al., 2002).

Não foram observadas diferença significativa para o número de trombócitos das serpentes estudadas. Quando a trombocitopenia é observada, sugere dificuldade ou retirada lenta de sangue no ato da coleta, atraso no processamento de amostras, coagulação ou erro laboratorial, nesses casos sugere-se que as amostras sejam descartadas. Como nos mamíferos trombocitopênicos, existem inúmeros diferenciais para trombocitopenia em répteis.

Os valores de uréia observados estão abaixo dos valores descritos por Campbell (2007) (15 mg/dL). Os valores plasmáticos de uréia são indicadores de doença renal, entretanto Lopes et al, (2007) relata que a uréia se torna um fator de funcionamento renal irrelevante quando analisada unicamente para as serpentes. Os valores séricos de creatinina apresentados neste estudo estão dentro da margem que Campbell (2007), podendo atingir até 1 mg/dL. De acordo com Almosny e Monteiro (2007), uréia e creatinina podem ser usadas na diferenciação entre insuficiência renal e pré renal.

Os valores médios de ALT e FA, apresentados no estudo estão de acordo com os descritos por Kolesnikovas *et al.*, (2001) (1 a 30 mg/dL) e Almosny e Monteiro (2007) (11,34 a 195,42 UI/L). Tal variação é esperada entre os diferentes criatórios pois, condições de manejo e sazonalidade dentre outros, alteram os valores bioquímicos de um local para outro. Ainda, nossos resultados mostraram uma enorme variação intraespecífica quando analisamos o desvio padrão e os valores de máximo e mínimo para as variáveis bioquímicas.

Em nosso estudo, a espécie que apresentou os maiores valores para ALT foi *B. moojeni* (12,4 UI/L ± 1,7 UI/L) e o menor valor foi detectado para *B. alternatus* (10,1 UI/L ± 1,8 UI/L). Rameh-de-Albuquerque (2007) também encontrou diferenças significativas para ALT entre espécies de *Bothrops* e *Crotalus*, no entanto, *B. alternatus* apresentou maiores valores para essa enzima (12,7 UI/L) do que encontrado no presente trabalho. Diferenças nos níveis séricos para enzimas hepáticas registrados em diferentes plantéis podem indicar uma resposta à quantidade de proteínas ingeridas por esses animais, que podem variar de acordo com o protocolo alimentar desses animais em cativeiro.

Muitos dos parâmetros sanguíneos analisados possuem amplos valores mínimos e máximos, mas em geral, os valores hematológicos e bioquímicos apresentados parecem estar de acordo com os reportados em pesquisas anteriores para espécies de viperídeos. Todavia as variações inter-específicas observadas podem estar relacionadas com a técnica de colheita, métodos de análise utilizados (JOHNSON; BENSON, 1996), condição do animal (cativeiro ou vida livre), estado nutricional, idade e períodos de colheitas diferentes (DUGUY, 1970; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007). Rameh-de-Albuquerque (2007) alerta para comparações entre valores descritos em diferentes estudos, haja visto que os procedimentos utilizados afetam significantemente os resultados obtidos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A metodologia utilizada para a avaliação biométrica foi satisfatória para determinarmos o valor médio de peso e comprimento, bem como a quantidade de produção de veneno das serpentes, do Biotério/UCDB no decorrer de 12 meses.
- As serpentes oriundas das áreas urbanas apresentam um peso significantemente maior do que as mantidas em cativeiro intensivo.
- Fêmeas apresentaram as maiores dimensões corporais e de peso, tanto na quarentena, quanto no cativeiro intensivo.
- A média de frequência cardíaca de *C. duríssus* foi o mais baixo dentre as espécies estudadas e nas demais avaliações clínicas foi à espécie que menos apresentou oscilações.
- A maior frequência respiratória foi observada para *B. moojeni*, sugerindo que essa espécie pode estar usando os movimentos respiratórios para auxiliar no controle fisiológico do estresse.
- A produção de veneno foi proporcional ao índice corporal das espécies estudadas.
- Os animais do cativeiro intensivo apresentaram maiores quantidades de secreção de veneno em relação aos animais recém-chegados.
- Serpentes mantidas em cativeiro intensivo tendem a ter uma resposta mais lenta em relação ao aumento de temperatura que as serpentes recém-chegadas.
- As variações nos índices hematológicos das serpentes da espécie *B. matogrossensis* sugere que dentre as espécies estudadas elas podem ser as mais sensíveis à adaptação e manejo em cativeiro.
- As variações nos índices hematológicos das serpentes da espécie *B. matogrossensis* sugere que dentre as espécies estudadas elas podem ser as mais sensíveis à adaptação e manejo em cativeiro.
- O uso da câmera termográfica como metodologia para a avaliação da temperatura corporal em serpentes pode ser importante instrumento na avaliação destes animais cativos.
- Os valores de ureia para os animais do Biotério/UCDB estão abaixo dos valores de referência.

- Os valores de ALT e FA estão dentro dos referenciados pela literatura para os animais do Biotério/UCDB.
- Os resultados bioquímicos apontam uma variação intraespecífica para os animais do Biotério/UCDB.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, A. Alonso; BALAZS, G. H. *Blood biochemistry values of green turtles, Chelonia mydas, with and without fibropapillomatosis.* Comparative Haematology International, v. 10, n. 3, p. 132-137, 2000.
- ALBUQUERQUE, L. C. R. *Aspectos hematológicos, bioquímicos, morfológicos e citoquímicos de células sanguíneas em Viperídeos neotropicais dos gêneros Bothrops e Crotalus mantidos em cativeiro.* São Paulo: L. C. Ramehde-Albuquerque, 2007.
- AL-JOHANY, A. M.; HAFFOR, A. S. and Decreased Free Radical Production During Mild Heat Stress in Uronastyx egyptius. J. Med. Sci, v. 5, n. 4, p. 311-315, 2005.
- ALLEMAN AR, RASKIN RE, JACOBSON ER. *Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise, Gopherus agassizii.* Am J Vet Res 1992;53:1645–51.
- ALLEMAN, A. R.; JACOBSON, E. R.; RASKIN, R. E. *Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (Crotalus adamanteus).* American Journal of Veterinary Records, v. 60, n. 4, 507-514, 1999 .
- ALMEIDA-SANTOS, S.M.; BRAZL, H.; SANTOS, L.C.; SUEIRO, L.R.; BARROS, V.A.; ROJAS, C.A.; KASPEROVICZUS, K.N. 2014. *Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados.* Herpetologia Brasileira 3(1).
- ALMOSNY, N.R. P., SANTOS, L. C. *Laboratory in wild animals.* 2000. In: Fowler, M. Biology, medicine and surgery of South America wild animals. Ames:Iowa State University, 2000. p. 500-505.
- ALMOSNY, N.P.; MONTEIRO, A. O. *Patología clínica.* In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R. CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária. São Paulo, Roca, 2014. p 939-966.
- ALVES, R. I. A.; SILVA, G. C.; ETO, S. F.; MANRIQUE, W. G.; LOUREIRO, B. A.; ALFREDO, R.; MORAES, J. R. E.; SALVADOR, R.; MORAES, F. R. *Estudio comparativo de valores hematológicos de serpientes de cascavel (Crotalus durissus terrificus) de vida libre y de cautiverio.* Revista Biotemas, 27 (2): 109 - 115, julho de 2014.
- ARIKAN H, KUMLUTAŞ Y, TÜRKÖZAN O, BARAN I, ILGAZ Ç. *The morphology and size of blood cells of some viperid snakes from Turkey.* Amphib-Reptilia. 2004;25:465–70.
- ASHLEY, B.D.; BURCHFIELD, P.M. *Maintenance of a snake colony for the purpose of venom extraction.* Toxicon, v. 5, p. 267-275, 1968.

- AVERY, R. A. (1982). *Field studies of body temperatures and thermoregulation*. Pp 93-166 in Gans, C. and Pough, H. F., eds. Biology of Reptilia v.12. **Physiology C. Physiological ecology**. Academic press. New York
- AZEVEDO, A., LUNARDI, L.O. *Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (Chrysemys dorbignyi)*. In: Acta Histochem, 105 (1): 99-105. 2003.
- BALM, P. H. *Hormones and the behavioral ecology of stress*. In: BALM, P. H. M. (Ed.). Stress physiology in animals. Sheffield, UK: Academic Press, 1999, p. 1-44.
- BARBER, B. J. and E. C. CRAWFORD. 1977. *A stochastic dual-limit hypothesis for behavioral thermoregulation in lizards*. Physiol. Zool. 50:53-60
- BARNARD, S.M. *Color atlas of reptilian parasites*. Part I. In: Exotic animal medicine in practice: the compendium collection. Lawrenceville: Veterinary Learning Systems, 1986. p. 145-148.
- BARRAVIEIRA, B. *Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos*. 1. ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. 411p.
- BARTHOLOMEW, G. A. (1982). *Physiological control of body temperature*. In Gans, C. and Pough, F. H. (Eds): Biology of the Reptilia, Vol. 12: Physiological Ecology, pp. 167–211. Academic Press, New York, NY.
- BASSETTI, L. A. B.; VERDADE, L.; M. *Crocodylia (Jacarés e Crocodilos)*. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R. CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária. São Paulo, Roca, 2014. p 154-169.
- BASTOS MG, BASTOS RMR, Paula RB. *Avaliação da função renal*. In: Barros E, Gonçalves LF. Nefrologia no consultório. Artmed: Porto Alegre; 2007. p. 49-67.
- BELLUOMINI, H. E. *Venom production of snakes in captivity*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 32, p 79-88, 1965.
- BERNARDE, P. S. *Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil*. 1<sup>a</sup> edição. São Paulo: Anolisbooks, 2014. 224p.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. *Brazilian Reptiles: List of Species*. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <[www.sbherpetologia.org.br](http://www.sbherpetologia.org.br)>. Acesso em: 09 de janeiro de 2017. 2015.
- BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M. M.; RODRIGUES, R. S.; De La TORRE, P.; PÉREZ, A.; SOARES, A. M.; ZINGALI, R. B.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. *Snake venomics and antivenomics of Crotalus durissus subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management*. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758-1776, 2010.
- BRATTSTROM B H. *Body temperatures of reptiles*. Amer. Midland Naturalist 73:376-422, 1965.

BREAZILE, J.E. *Physiologic basis and consequences of distress in animals*. In: **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v.191, n.10, p. 1212-1215. 1987. 24.

CABANAC, M., BERNIERI, C. *Behavioural rise in body temperature and tachycardia by handling of a turtle (Clemmys insculpta)*. In: Behav Process 49: p.61-68, 2000

CABANAC, M., BERNIERI, C. *Behavioural rise in body temperature and tachycardia by handling of a turtle (Clemmys insculpta)*. Behav Processes 49:61-68, 2000.

CADLE, J. E. *Geographic distribution: problems in phylogeny and zoogeography*. In: Seigel, R.; Collins J.; Novak, S. Snakes: Ecology and Evolutionary Biology. 1. ed. New York: Macmillian Publishing, 1987. p. 77-105.

CALLEFFO, M. E.; BARBARINI, C. C. *A origem e a constituição dos acervos ofiológicos do Instituto Butantan*. **Cadernos de História e Ciência**., v.3, n. 2, São Paulo, 2007.

CAMPBELL TW (2015) *Exotic animal hematology and cytology*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. Wiley Blackwell, pp 67–83.

CAMPBELL TW. *Clinical pathology of reptiles*. In: Mader DR, editor. Reptile medicine and surgery. 2nd ed. St. Louis: Elsevier; 2006. p. 460–5.

CAMPBELL, H.A.; LEITE, C.A.C.; WANG, T.; SKALS, M.; ABE, A.S.; EGGINTON, S.; RANTIN, F. T.; BISHOP, C.M.; TAYLOR, E.W. *Evidence for a respiratory component, similar to mammalian respiratory sinus arrhythmia, in heart rate variability signal from rattlesnake, Crotalus durissus terrificus*. **The Journal of Experimental Biology**, v.209, p.2628-2636, 2006.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. *The venomous reptiles of latinamerica*. 1. ed. New York: Cornell University Press, 1989. 425p.

CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca.

CAMPBELL, T. W. Clinical Pathology. In: Mader, D.R. (Ed.). *Reptile medicine and surgery*. Pennsylvania: WB Saunders, 2006, p. 248-257.

CAMPBELL, T.W. *Clinical Pathology of Reptiles*. In: Mader, D.R. (editor). Reptile Medicine and Surgery. Philadelphia, WB Saunders. Cap. 28, p. 453 – 470. 1996.

CAMPBELL, T.W., ELLIS, C.K. *Hematology of reptiles*. In: Campbell TW, Ellis CK (eds): Avian and Exotic Hematology and Cytology. Ames, IA, Blackwell publishing, pp 51-81, 2007.

CAMPBELL, T.W. *Bioquímica clínica de répteis*. In: THRALL, M.A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. São Paulo: Roca, 2007. p. 461-466.

CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F. O. S., WEN, F. H., MÁLAQUE, C. M. S., HADDAD JR, V. *Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* 1. ed., São Paulo: FAPESP, 2003. 550p.

CHANHOME L, JINTAKUNE P, WILDE H, COX MJ (2001). *Venomous snake husbandry in Thailand. Wild. Environ. Med.* 12:17 – 23.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. *Snake venom variability: methods of study, results and interpretation.* **Toxicon** 29: 1279–1303, 1991.

CHRISTOPHER, M. M.; BERRY, K. H.; WALLIS, I. R.; NAGY, K. A.; HENEN, B. T.; PETERSON, C. C. *Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the Mojave Desert.* **J Wildl Dis.** 1999;35(2):212–38.

CHROUSOS, George P.; GOLD, Philip W. *The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis.* **Jama**, v. 267, n. 9, p. 1244-1252, 1992.

COOK, N.J. et al. *Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine.* In: **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.76, p. 329-335. 1996.

COSTA, A. et al. *Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I-A longevidade dos gêneros Bothrops, Crotalus e Lachesis.* *Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil de História Natural (Brasil).*(2005).(nº 083), p. 63-68, 2005.

COWAN, D.F. *Diseases of captive reptiles.* **Journal American Veterinary Medical Association.** v.153, p. 848, 1968.

CRUZ, J.G.P.; JUNKES, L. *Controle autonômico da frequência cardíaca em Spilotes pullatus (Colubridae) como determinante da resposta de medo.* **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1468-1471, 2008.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de animais selvagens. Medicina veterinária.* 2a ed. São Paulo, SP: Editora Roca Ltda, 2014.

DA SILVA Jr., N. J.; SITES Jr., J. W. *Revision of the Micrurus frontalis complex (Serpentes: Elapidae).* **Herpetological Monographs**, p. 142-194, 1999.

DA VEIGA, R. A. *Controle autonômico da freqüência cardíaca em Spilotes pullatus (Colubridae) como determinante das respostas de medo.* **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1468-1471, 2008.

DALTRY, J. C., WÜSTER, W., THORPE, R. S. *The role of ecology in determining venom variation in the Malayan Pit Viper, Calloselasma rhodostoma.* In: THORPE, R.

- S., WÜSTER, W., MALHOTRA, A. (ed.) *Venomous snakes: ecology, evolution and snakebite.* Oxford: Clarendon Press, 1997. p. 155–171.
- DANTZER, R., MÓRMEDE, P. *Fisiopatología de la reacción a las agresiones.* In: Dantzer, R, Mórmude. El stress en la cría intensiva del ganado. Zaragoza: Editorial Acríbia; p.41-86. 1984.
- DAVIS, Andrew K.; MAERZ, John C. *Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, Ambystoma talpoideum.* Copeia, v. 2008, n. 3, p. 613-617, 2008.
- DeTOLEDO, J.C. *Convulsive syncope following placement of sphenoidal electrodes.* **Brain Develop**, v.21, p.213-215, 1999.
- DIETERLEN-LIEVRE F. Birds. In: Rowley AF, Ratcliffe MA, editors. *Vertebrate blood cells.* Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1988. p. 257–336.
- DISSANAYAKE, Duminda SB et al. *Hematological and plasma biochemical parameters in a wild population of Naja naja (Linnaeus, 1758) in Sri Lanka.* **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 8, 2017.
- DOTSON, T. K.; RAMSAY, E. C.; BOUNOUS, D. I. *A color atlas of blood cells of the yellow rat snake.* **The Compendium on Continuing Education Practice Veterinary**, v. 17, n. 8, p. 1013-1016, 1995.
- DUGUY R. *Numbers of blood cells and their variation.* In: Gans C, editor. **Biology of Reptilia.** London-New York: Academic; 1970. p. 93–109.
- DUNLAP, K. D e WINGFIELD, J. C. *External and internal influences on indices of physiological stress: I. Seasonal and population variation in adrenocortical secretion in free living lizards, Sceloporus occidentalis.* **Journal of Experimental Zoology**, v. 271, p. 36-46, 1995.
- ESTEVES, Rhaiza Gama. *Comportamento alimentar e aspectos reprodutivos de Bothrops insularis (Amaral, 1921)(Serpentes: Viperidae), na criação ex-situ no Instituto Vital Brazil.* Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Neotropical) Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.
- FALCE, M. C. L. B. *Hematologia de répteis: revisão bibliográfica.* Trabalho de Conclusão de Curso de Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos, Instituto Quallitas, Campinas, SP. 53p, 2000.
- FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L.. FERNANDES, Andreia Figueiredo. *Anestesia em Repteis.* 2011.
- FENWICK, Allyson M. et al. *Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis, and*

*Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, n. 3, p. 617-640, 2009.

FERREIRA, C. F; CARVALHO, A. U.; PALHARES, M. S. *Estresse x sistema gastrointestinal – conceitos e consequências*. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 37, p. 46-52, 2002.

FERREIRA, S. *Estudos bioquímicos e toxinológicos comparativos entre as peçonhas de machos e fêmeas de Bothrops mattogrossensis*. João Pessoa. (Dissertação (Mestrado em Biologia Celulae e Molecular) – UFPB, 2017.

FERREIRA, V. L.; TERRA, J. S.; PIATTI, L.; DELATORRE, M.; STRUSSMAN, C.; BÉDA, A. F.; KAWASHITA-RIBEIRO, R. A.; LANDGREF-FILHO, P.; AOKI, C.; CAMPOS, Z.; SOUZA, F.L.; ÁVILA, R. W.; DUQUE, S.; MARTINS, K. S.; SANTARITA, P. H.; ALBUQUERQUE, N. R. *Reptiles of Mato Grosso do Sul, Brazil*. **Iheringia**. Série Zoologia, v. 107, 2017.

FONTEQUE, J.H.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R.K. et al. *Perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes Crotalus durissus terrificus (cascavel) criadas em cativeiro*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.6, p.457-460, 2009.

FOWLER JR, J. E. *Experience with suprapubic vesicourethral suspension and endoscopic suspension of the vesical neck for stress urinary incontinence in females*. **Surgery, gynecology & obstetrics**, v. 162, n. 5, p. 437-441, 1986.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. *Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda*. Rio de Janeiro: Guanabara koogan p.205-365, 2011.

FRYE FL. *Hematology as applied to clinical reptile medicine*. In: Frye FL, editor. Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry, vol. 1. 2nd edition. Melbourne (FL): Kreiger; 1991. p. 209–77.

FRYE, F. L. *Reptile care: an atlas of diseases and treatments*. Neptune City: T. F. H. Publications, 1991.

FUNK, R.S. *A formulary for lizards, snakes, and crocodilians*. Veterinary Clinical North American Exotic Animal Practice. v. 3, p. 333-358, 2000.

FURTADO, M. F. D. *Aspectos sistemáticos e biológicos que atuam na diversidade da composição de veneno em serpentes peçonhentas brasileiras*. (2006) In: Herpetologia no Brasil II. Belo Horizonte: 2007. p. 183-200.

GARCIA-NAVARRO, K. C. E.; PACHALY, J. R. *Manual de hematologia veterinária*. São Paulo: Varela, 1994.

GEORGE JW, HOLMBERG TA, RIGGS SM, et al. *Circulating siderophagocytes and erythrophagocytes in a corn snake (Elaphe guttata) after coelomic surgery*. **Vet Clin Pathol** 2008;37(3):308–11.

GIBSON, A. R.; SMUCNY, D. A.; KOLLAR, J. (1989). *The effects of feeding and ecdysis on temperature selection by young garter snakes in a simple thermal mosaic.* Canadian Journal of Zoology 67: 19-23.

GILLET AK, FLINT M, HULSE L, HANGER J, MILLS PC (2015) *Haematological and biochemical reference intervals for three species of hydrophiine sea snakes (*Hydrophis curtus*, *H. elegans* and *H. peronii*) in Australia.* Vet J 204:275–281.

GLASER, V., BONI, A. P., PITZ, H. S., de ALBUQUERQUE, C. A. C., ZENI, A. L. B. *Parâmetros hematológicos e bioquímicos de Bothropoides jararaca e Bothrops jararacussu (Ophidia-Viperidae) mantidas em cativeiro.* Archives of Veterinary Science, v. 18, n. 3, 2013.

GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.; SNYDER, CC. *Yield of venom obtained from *Crotalus atrox* by electrical stimulation.* Toxicon, v. 10, p. 575-579, 1972.

GODLEY, J. S. *Foraging ecology of the striped swamp snake, *Regina alleni*, in southern Florida.* Ecological Monographs, v. 50, p. 411 - 436, 1980.

GÓMEZ A, ARROYO C, ASTORGA W, CHACÓN D, RODRÍGUEZ S, JIMÉNEZ M. *Hematological and biochemical reference intervals for Bothrops asper and Crotalus simus (Serpentes: Viperidae), maintained in captivity for venom extraction.* Comparative Clin Path. 2016;25(3):615–23.

GONÇALVES, GUSTAVO SILVEIRA. *Padrões hematológicos e morfológicos de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768)(Serpentes, Viperidae, Crotalinae) ocorrentes no município de Vassouras, Rio de Janeiro.* 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Juiz de Fora.

GONZALEZ F.H.D, SILVA S.C. *Introdução à bioquímica clínica veterinária.* 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. c. 8, p. 318-337, 2006.

GOULART, C. E. S. *Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis.* 1<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2004. 330p.

GREENE, H. W. *The ecological and behavioral context for pitviper evolution.* In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. JR. *Biology of the Pitvipers.* 1. ed. Texas: Selva, 1992. 9- 36p.

GREGO, K. F. *Determinação dos níveis séricos de corticosterona e hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e da extração de veneno, em Bothrops jararaca (Ophidia: Viperidae).* São Paulo: K. F. Grego, 2006.

GREGO, K. F. *Patologia comparada das principais infecções parasitárias acometendo as serpentes da espécie Bothrops jararaca.* (WIED, 1824). São Paulo,

2000. 97p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Setor de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

GREGO, K. F.; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L.; KOLESNIKOVAS, C. K. M. *Squamata (Serpentes)*. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R. CATÃO-DIAS, J.L. *Tratado de animais selvagens: Medicina Veterinária*. São Paulo, Roca, 2014. p 186-218.

GREGORY CR, LATIMER KS, FONTENOT DK, et al. *Chronic monocytic leucemia in an inland bearded dragon, Pogona vitticeps*. J Herpetol Med Surg 2004; 14:12–6.

GREKIN, R. A. Supra-renal. In: Mazzaferri, E.I. Endocrinologia. Rio de Janeiro editora Guanabara Koogan, 3 ed., p.198-204. 1986. 23.

GRISOLIA, C. S.; STANCHI, N. O.; PELUSO, F. O. *Relación entre el período de ayuno y cantidad de veneno extraído de ofídios em cautiverio*. **Revista Argentina Produção. Animal.** v. 6, n. 7, p. 513-516, 1986.

GRUBB, B.P.; TEMESY-ARMOS, P.; MOORE, J., WOLFE, D., HAHN, H., e ELLIOT, L. *Head-upright tilt-table testing in evaluation and management of the malignant vasovagal syndrome*. Am. **J.Cardiol**, v.69, p.904-908, 1992.

GUILLETTE, L. J.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; WOODWARD, A. R. *Effect of acute stress on plasma concentrations of sex and stress hormones in juvenile alligators living in control and contaminated lakes*. **Journal of Herpetology**, v. 31, p. 347-353, 1997.

GUILLETTE, L. J.; CREE, A. e ROONEY, A. A. *Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism*. In: Warwick, C.; Frye, F.L & Murphy, J.B (eds.). *Health and welfare of captive reptiles*. London: Chapman and Hall, 1995, cap.2, p. 32-81.

GVOZDIK, L. (2002). *To heat or to save time? Thermoregulation in the lizard Zootoca vivipara (Squamata: lacertidae) in different thermal environments along an altitudinal gradient*. **Can. J. Zool.** 80:479–492.

HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S., FALK, E., e WANG, T. *Physiological importance of the coronary arterial blood supply to the rattlesnake heart*. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 22, p. 3588-3593, 2008.

HAGENSEN, M.K.; ABE, A.S.; ERLING, F.; WANG, T. *Physiological importance of the coronary arterial blood supply to the rattlesnake heart*. **The journal of experimental biology**, v.211, p.3588-3593, 2008.

HARTMAN FA, LESSLER MA. *Erythrocyte measurements in fishes, amphibia and reptiles*. **Biol Bull.** 1964;126(1):83–8.

HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T.; MARTINS, M. *Ecologia e história natural de uma taxocenose de serpentes no Núcleo Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, no sudeste do Brasil*. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 173, 2009..

- HARVEY, J. W. *Atlas of veterinary hematology*. Philadelphia:WBSaunders; 2001. p. 13.
- HATTINGH, J.; WILLEMSE, G. T. *Hematological observations on the puff adder, Bitis arietans (Ophidia: Viperidae)*. **Herpetologica**, v. 32, n. 3, p. 245-247, 1976.
- HAWKEY, C.M.; DENNET, T.B. *A colour atlas of veterinary comparative haematology*. Ipswich, UK: Wolfe Medical, 1989.
- HAYASHI, M.A.F.; CAMARGO, A.C.M. *The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of Bothrops jararaca contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme*. **Toxicon**, 45:1163–70, 2005.
- HEARD D (2001). *Reptile Anesthesia*. VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA: Exotic Animal Practice Analgesia and Anesthesia 4(1), Elsevier Saunders, 83-116.
- HOFFMAN, W.E., SOLTER PF. *Diagnostic Enzymology of domestic animals* In: Kaneko JJ, Haeney JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 6 ed. San Diego: Academic Press, 2008. Cap. 12, p. 351-378.
- HUEY, R. B. (1982). *Temperature physiology and ecology of reptiles*. In Biology of Reptilia. (Edited by Gans C. and Pough F. H.), vol. 12, pp 25-91. Academic press, London.
- HUEY, R.B.; Hertz, P.E. (1984). *Is a jack-of-all-temperatures a master of none?* **Evolution** 38, 441–444.
- JACOBSON, E. R. *Biology and diseases of reptiles*. In: FOX, J. G.; COHEN, B. J.; LOEW, F. M. Laboratory animal medicine. Orlando: Academic Press, 1984. Cap. 15, p. 449-476.
- JEPSON, L. *Clínica de animais exóticos/referência rápida*. Rio de Janeiro: Elsevier, p.315-317, 2010.
- JOHNSON, C. S. *Aminoácidos e proteínas*. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Fundamentos de Química Clínica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 295-325.
- JOHNSON, C. S.(2005) *Arterial Blood Pressure and Hyperviscosity in Sickle Cell Disease*. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Volume 19, Issue 5, Pages 827-837.
- JOHNSON, J. H.; BENSON, P. A. *Laboratory reference values for a group of captive ball pythons (Python regius)*. **American journal of veterinary research**, v. 57, n. 9, p. 1304-1307, 1996.

JUNIOR, M. S. *O Ofidismo no Brasil*. 1. ed. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária - Ministério da Saúde, 1956.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 12, p. 223-237.

KERR, M. G. *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária*. 2ed. São Paulo: Roca, 9-329, 2003.

KNOTKOVÁ Z, DOUBEK J, KNOTEK Z, HÁJKOVÁ P. *Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (Agrionemys horsfieldi)*. *Acta Vet Brno*. 2002;71(2):191–8.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K.. *Snake venom components and their applications in biomedicine*. **Cellular and Molecular Life Science**. 63: 3030-3041, 2006.

KOLESNIKOVAS, C. K. M. *Patologia comparada de cascavéis (Crotalus durissus, Laurenti, 1768) mantidas em cativeiro*. 1997. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

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

LAGRANGE, P. H.; THANGARAJ, S. K.; DAYAL, R.; DESHPANDE, A. et al. *A toolbox for tuberculosis (TB) diagnosis: an Indian multicentric study (2006-2008); evaluation of serological assays based on PGL-Tb1 and ESAT-6/CFP10 antigens for TB diagnosis*. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96367, 2014.

LEMA, T. *Os répteis do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis – biogeografia – ofidismo*. 1<sup>a</sup> ed., Porto Alegre. EDIPUCRS, 2002. 247p.

LISIČIĆ D, ĐIKIĆ D, BENKOVIĆ V, KNEŽEVIĆ AH, ORŠOLIĆ N, TADIĆ Z. *Biochemical and hematological profiles of a wild population of the nose-horned viper Vipera ammodytes (Serpentes: Viperidae) during autumn, with a morphological assessment of blood cells*. **Zool Stud**. 2013;52:11.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. *Manual de Patologia Clínica Veterinária*. 3 ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007.

LUISELLI, L. *Individual success in mating balls of the grass snake, Natrix natrix: size is important*. **Journal of Zoology**, v. 239, n. 4, p. 731-740, 1996.

MACHADO, T. *Filogenia molecular das espécies Bothrops do grupo neuwiedi (Serpentes, Viperidae)*. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências

Biológicas, Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MADER, D. R. *Normal hematology of Reptiles*. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. Cap. 175, p. 1126-1132.

MADER, D.R. *Reptile Medicine and Surgery*. 2<sup>a</sup> edição. Philadelphia, USA: Elsevier, 2006. 1242p.

MARKS, S. K.; CITINO, S. B. *Hematology and serum chemistry of the radiated tortoise (*Testudo radiata*)*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, p. 342-344, 1990.

MARQUES, O. A. V., ETEROVIC, A., SAZIMA, I. *Serpentes da Mata Atlântica. Guia ilustrado para a Serra do Mar*. 1.ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 184p.

MARQUES, O.A.V., PEREIRA, D.N., BARBO, F.E., GERMANO, V.J. & SAWAYA, R.J. 2009b. Os Répteis do Município de São Paulo: diversidade e ecologia da fauna pretérita e atual. **Biota Neotropica** 9(2): h.

MARTIN, A. *L'uso della termografia nella diagnosi di patologie respiratorie negli ofidi*. 2012-2013. 10f. Monografia (Medicina Veterinaria). Università Degli Studi di Padova, Dip. Di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Padova, Itália, 2013.

MARTINS, M., ARAÚJO, M.S., SAWAYA, R.J. & NUNES, R. 2001. *Diversity and evolution of macrohabitat use body size and morphology in a monophyletic group of neotropical pitvipers (Bothrops)*. **J. Zool.** 254(2001):529-538.

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M.E. 1998. *Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil*. **Herpetological Natural History**, 6: 78-150.

MATEO MR, ROBERTS ED, Enright FM. *Morphologic, cytochemical and functional studies of peripheral blood cells of young healthy American alligators (Alligator mississippiensis)*. **Am J Vet Res** 1984;45:1046-53.

MEAD KF, BORYSENKO M. *Surface immunoglobulin on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle, Chelydra serpentina*. **Dev Comp Immunol** 1984;8:109-20.

MELGAREJO, A. R. *Serpentes peçonhetas do Brasil*. In: CARDOSO, J. L. C. et al. (orgs.). Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1.ed. São Paulo: Sarvier, 2003. 33-71p.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. *Criação e manejo de serpentes*. In: ANDRADE, A., PINTO, S. C., OLIVEIRA, R. S. Animais de laboratório criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 175-199p.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. et al. *Criação e manejo de serpentes. Animais de laboratório-criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 175-200, 2006.

MEREDITH A. & JOHNSON-DELANEY C. BSAVA *Manual of Exotic Pets: Snakes.* Publisher BSAVA. 5th p. 244-245. 2010. 157. WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection.

MIRTSCHIN, P. J., SHINE, R., NIAS, T. J., DUNSTAN, N. L., HOUG, B. J., MIRTSCHIN, M. *Influences on venom yield in Australian tigersnakes (*Notechis scutatus*) and brownsnakes (*Pseudonaja textilis*: Elapidae, Serpentes).* **Toxicon**, v. 40, p. 1581-1892, 2002.

MOBERG, G. P. *Influence of stress on reproduction: measure of well-being.* In: Animal stress. Springer New York, 1985. p. 245-267.

MOÇO, T.C.; O'DWYER, L.H.; VILELA, F.C.; BARRELLA, T.H.; SILVA, R.J. *Morphologic and morphometric analysis of Hepatozoonspp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 97, n. 8, p. 1169-1176, 2002.

MONTALI, R. J. *Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals).* **Journal of comparative pathology**, v. 99, n. 1, p. 1-26, 1988.

MONTEIRO, C.; MONTGOMERY, C. E.; SPINA, F.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M.. *Feeding, Reproduction, and Morphology of Bothrops mattogrossensis (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal.* **Journal of Herpetology**. 40: 408-413, 2006.

MOORE, I. T.; GREENE, M. J.; MASON, R. T. *Environmental and seasonal adaptation of the adrenocortical and gonadal responses to capture stress in two populations of the male garter snake, Thamnophis sirtalis.* **Journal of Experimental Zoology**, v. 289, p. 99-108, 2001.

MORICI, L. A.; ELSEY, R. M.; L. Valentine A. *Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, Alligator mississippiensis.* **The Journal of experimental zoology**, v. 279, n. 2, p. 156-162, 1997.

MOTTA, R. O. C. *Perfil hematológico de serpentes *Crotalus durissus Linnaeus, 1758* (Viperidae) e parasitismo por Hepatozoon (apicomplexa, hepatozoidae) no estado de Minas Gerais,* Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, p. 11-33, 2005.

MURPHY JB, ARMSTRONG BL (1978) *Maintenance of rattlesnake in captivity.* University of Kansas, Lawrence.

NARDINI, G., LEOPARDI, S., BIELLI, M. *Clinical hematology in reptilian species*. In: Vet Clin Exot Anim 16 1–30, 2013.

NIJAGAL, B. S.; YAJURVEDI, H. N. *Influence of corticosterone on FSH-induced ovarian recrudescence in the lizard Mabuya carinata*. General and comparative endocrinology, v. 115, n. 3, p. 364-369, 1999.

NUNES, S. F. *DIETA E BIOLOGIA REPRODUTIVA DA CRUZEIRA, Bothrops alternatus (SERPENTES VIPERIDAE), NA REGIÃO SUL DO BRASIL*. 2006.

OLIVEIRA, P. M. A. *Animais silvestres e exóticos na clínica particular*. 1. ed. São Paulo: Roca, 2003. 375p.

OPPLIGER, A., J. CLOBERT, J. LECOMTE, P. LORENZON, K. Boudjemadi & H. B. John-Alder (1998): *Environmental stress increases the prevalence and intensity of blood parasite infection in the common lizard Lacerta vivipara*. – Ecology Letters, 1: 129–138.

PACHALY, J.R. et al. *Estresse por captura e contenção em animais selvagens*. In: **A hora veterinária**, Porto Alegre, v.13, n.74, p.47-52. 1993.

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.

PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C.; GOMES, A.. *Snake venom therapeutic agents: from toxic to drug development*. Indian Journal of Experimental Biology. 40: 1353-1358, 2002.

PARIDA SP, DUTTA SK, PAL A. *Hematology and plasma biochemistry of wild-caught Indian cobra Naja naja* (Linnaeus, 1758). J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2014;20:14.

PIENAAR UDE V. *Haematology of some South African reptiles*. Johannesburg (South Africa): Witwatersrand University Press; 1962. p. 1–299.

PIZZATTO, L. 2006. *Ecomorfologia e estratégias reprodutivas nos Boidae (Serpentes), com ênfase nas espécies Neotropicais*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PLA, D.; PETRAS, D.; SAVIOLA, A. J.; MODAHL, C. M.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; JUÁREZ, E.; FRIETZE, S.; DORRESTEIN, P. C.; MACKESSY, S. P.; CALVETE, J. J. *Transcriptomics-guided bottom-up and top-down venomics of neonate and adult*

*specimens of the arboreal rear-fanged Brown Treesnake, Boiga irregularis, from Guam.* **Journal of proteomics**, 2017.

RASKIN, R.E. *Reptilian complete blood count.* In: Fudge, A. M. **Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets.** Philadelphia WB Saunders Co. p. 193-197. 2000.

REDROBE S, MACDONALD J. *Sample collection and clinical pathology of reptiles.* **Vet Clin North Am Exotic Anim Pract.** 1999;2(3):709–30.

ROITIMAN, I. Stress ou estresse. In: **Mednews**, v. 13 p. 19-26. 1989.

ROSENFIELD, G. *Acidentes por animais peçonhentos.* In: VERONESI, R. *Doenças infecciosas e parasitárias.* 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 951-962p.

ROSSKOPF. W.J.J., *Disorders of Reptilian Leukocytes and Erythrocytes,* In Fudge AM (ed): **Laboratory Medicine: Avianand Exotic Pets.** Philadelfia, WB Saunders. Pp 198-203, 1999.

RULE AD, LARSON TS, BERGSTRALH EJ, SLEZAK JM, JACOBSEN SJ, COSIO FG. *Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease.* Ann Intern Med. 2004 Dec 21;141(12):929-37.  
SAGGESE, M. D. *Clinical approach to the anemic reptile.* In: **Journal of Exotic Pet Medicine**, vol. 18, nº2, pp 98-111. 2009.

SAINT GIRONS, Marie-Charlotte. *Morphology of the circulating blood cells.* **Biology of the Reptilia**, v. 3, p. 73-91, 1970.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. *Haemostatically active proteins in snake venoms.* **Toxicon.** 57: 627-645, 2011.

SALAKIJ C, SALAKIJ J, APIBAL S, et al. Hematology, *morphology and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (Ophiophagus hannah).* **Vet Clin Pathol** 2002;31:116–26.

SANT'ANNA, S. S. *Hábitos alimentares de cascavel, Crotalus durissus no Sudeste brasileiro (Serpentes Viperidae).* São Paulo, 1999. 7p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

SANTA-RITA, P. H. *Efeito de um complexo homeopático bioestimulatório sobre a produção de veneno em cascavéis mantidas em cativeiro.* 2011. 47 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal) - UFMS. Campo Grande. MS.

SANTOS, E.O. *Mecanismos de estresse: impactos na saúde e na produção animal.* (Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal no programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS) – UFRGS, Porto Alegre, 2005.

- SAPOLSKY R. Stress, *Glucocorticoids, and damage to the nervous system: the current state of confusion.* In: **Stress**,;1: 1-11. 1996.
- SAWAYA, Ricardo Jannini; MARQUES, Otavio Augusto Vuolo; MARTINS, Marcio. *Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. Biota Neotropica*, v. 8, n. 2, p. 127-149, 2008.
- SAZIMA, I.; MANZANI, P. R. *Bothrops fonsecai (Fonseca's lancehead). Reproduction and size.* *Herpetological Review*, v. 29, p. 102-103, 1998.
- SAZIMA, Ivan. *Natural history of the jararaca pitviper, Bothrops jararaca, in southeastern Brazil.* **Biology of the Pitvipers**, p. 199-216, 1992.
- SEIGEL, R. A.; FITCH, H. S. *Ecological patterns of relative clutch mass in snakes.* **Oecologia**, v. 61, n. 3, p. 293-301, 1984.
- SEIGEL, R. A.; HUGGINS, M. M.; FORD, N. B. *Reduction in locomotor ability as a cost of reproduction in gravid snakes.* **Oecologia**, v. 73, n. 4, p. 481-485, 1987.
- SELYE, H. *A syndrome produced by diverse noxious agents.* **Nature**, v. 13, p. 8-32, 1936.
- SELYE, H. *The evolution of the stress concept.* **American Scientist**, v. 61, p. 692-699, 1973.
- SELYE, Hans. *The chemical prevention of cardiac necrosis.* **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 238, n. 1, p. 130, 1959.
- SERAPICOS, E. O., MERUSSE, J. L. B. *Análise comparativa entre tipos de alimentação de Micrurus corallinus (Serpentes, Elapidae) em cativeiro.* **Iheringia, Série Zoologia**, v. 92, n. 4, p. 99-103, 2002.
- SEYLE, H. *Stress and the general adaptation Syntome.* **British Medical Journal**, v. 17. p. 1383-1392, jun., 1950.
- SHINE, R. *Sexual size dimorphism and male combat in snakes.* **Oecologia**, v. 33, n. 3, p. 269-277, 1978.
- SHINE, R. *Sexual size dimorphism in snakes revisited.* **Copeia**, p. 326-346, 1994.
- SHOEMAKER, N.J.; ZANDVLIET, M.M.J.M. *Electrocardiograms in selected species.* Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v.14, n.1, p.26-33, 2005.
- SILVA, Raiany Cristine Cruz da. *O ambiente e a diversidade das serpentes no estado do Tocantins–Brasil.* 2017.

SILVA, W.B. et al. *Bioquímica plasmática de cascavéis (Caudisona durissa LINNAEUS, 1758) em cativeiro*. Ciência Rural, Santa Maria, v.40, n.12 p. 2510-2514, dez, 2010.

SILVESTRE, A. M. *Enfermedades de los reptiles*. Barcelona: Reptilia Ediciones, 2003. 207 p.

SILVESTRE, A.M. *How to assess stress in reptiles*. In: **Journal of Exotic Pet Medicine** v. 23 pp 240-43. 2014.

SOLIS-SOLIS, D. *Acute corticosterone secretion associated with salinity, repeated blood sampling, physical restraining method and body mass in the red-eared slider (Trachemys scripta elegans) from the Pontchartrain basin, Louisiana*. Tese de doutorado, Southeastern Louisiana University, 2010.

SOLÓRZANO, Alejandro; CERDAS, Luis. *Reproductive biology and distribution of the terciopelo, Bothrops asper Garman (Serpentes: Viperidae), in Costa Rica*. **Herpetologica**, p. 444-450, 1989.

SONODA, M.C., GASPARINI, R.L. & CATÃO-DIAS, J.L. *Miopatia de Captura em Cervos do Patanal (Blastocerus Dichotomus)*. In: XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias. **Anais**, P.81. 1996.

SPRAKER, T. *Stress and capture myopathy in artiodactylids*. In: Fowler, M.E. Zoo & wild animal medicine. 3 ed. Philadelphia : WB Saunders, p. 48187.1993.

STÁBELI, R. G. et al. *Cytotoxic L-amino acid oxidase from Bothrops moojeni: biochemical and functional characterization*. International journal of biological macromolecules, v. 41, n. 2, p. 132-140, 2007.

STACY BA, Pessier AP. *Host response to infectious agents and identification of pathogens in tissue sections*. In: Jacobson ER, editor. Infectious diseases and pathology of reptiles. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. p. 260–1.

STACY, N.I., ALLEMAN, A.R., SAYLER, K.A. (2011) *Diagnostic hematology of reptiles*. Clin Lab Med 31: 87–108.NI StacyAR AllemanKA Sayler2011Diagnostic hematology of reptiles.Clin Lab Med3187108.

STAHL, S. J. *Reptile hematology and serum chemistry*. In: The North American Veterinary Conference, 2006, Orlando. Proceedings of the North American Veterinary Conference, Small Animal Edition – Exotics: Reptiles and Amphibians. Ithaca: NAVC, 2006. V. 20, p. 1673 – 1676.

STEVENS LA, LEVEY AS. *Measurement of kidney function*. Med Clin North Am. 2005 May;89(3):457-73.

STUGINSKI, D. R.; FERNANDES, W.; GREGO, K. F. *Parâmetros eletrocardiográficos de cascavéis (Crotalus durissus, Linnaeus, 1758) em Cativeiro*. Archives of Veterinary Science, v. 16, n. 3, 2011.

SYKES 4TH JM, KLAPHAKE E. *Reptile Hematology*. **Vet Clin North Am Exot Anim Pract.** 2008;11(3):481–500.

SYPEK J, BORYSENKO M. *Reptiles*. In: Rowley AF, Ratcliffe NA, editors. *Vertebrate blood cells*. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1988. p. 211–56.

SZARSKI H, CZOPEK G. *Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles*. **Bull Acad Pol Sci Cl.** 1966;14:433–7.

THRALL M.A.; BAKER D.C.; CAMPBELL T.W.; DeNICOLA D.; FETTMAN M.J.; LASSEN E.D.; REBAR A.; WEISER G. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*, 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 248 a 263, 2006.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON R.; T. CAMPBELL(Ed.). *Veterinary hematology and clinical chemistry*. John Wiley & Sons, 2004.

THRALL, M. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1 ed. São Paulo: Roca, 2007. 408p.

TROIANO, J. C. et al. *Blood biochemical profile of the south american rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) in captivity*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, p. 183-189, 2001.

TROIANO, J. C.; VIDAL, J. C.; GOULD, J.; GOULD, E. *Haematological reference intervals of the south american rattlesnake (Crotalus durissus terrificus, Laurenti, 1768) in captivity*. **Comparative Haematology International**, 7. 2. P. 109–112, 1997.

UETZ, P. *The reptile database: How Many Species?* Disponível em: <<http://reptile-database.org>>. Acesso em: 01 de dezembro de 2016.

VAN DAMME, R.; BAUWENS, D.; Verheyen, R. F. (1986). *Selected body temperatures in the lizard Lacerta vivipara: variation within and between populations*. **Journal of Thermal Biology** 11: 219-222.

VARELA, N. *Evaluación clínica de reptiles*. **Boletín GEAS - Grupo de Estudio de Animales Silvestres**, v. 3, n. 1, 2002.

VEGA, J. T. E. *Manual de Prácticas para La Asignatura de Clínica de Animales de Zoológico*. 2011. 226f. Monografía (Médico Veterinário Zootecnista). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2012.

VIEIRA, D. S. *Variação sazonal dos constituintes bioquímicos plasmáticos de cascavéis Crotalus durissus collilineatus amaral, 1926 mantidas em cativeiro*. 2015. WALLACH, J.D.; BOEVER, W.J. *Diseases of exotic animals*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1983.

- WARWICK, C.; ARENA, P.C.; LINDLEY, S.; JESSOP, M. STEEDMAN, C. *Assessing reptile welfare using behavioural criteria*. In Pract 35:123- 131, 2013.
- WERTHER, KARIN. *Semiologia de animais silvestres*. Semiologia veterinária, 1st edn. Editora Roca, São Paulo, p. 774-791, 2004.
- WHO, W. H. O. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. 1981.
- WINGFIELD, J. C.; SMITH, J. P.; FARNER, D. S. *Endocrine responses of white-crowned sparrows to environmental stress*. Condor, v. 84, p. 399-409, 1982.
- WITHERS, P. C., and J. D. CAMPBELL. 1985. *Effects of environmental cost on thermoregulation in the desert iguana*. Physiol. Zool. 58:329-339.
- WOZNIAK, E.J. et al. *Employment of the polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventative zoological medicine*. J Zoo Wild Med, 25: pp 538-49. 1994.
- WRIGHT RK, COOPER EL. *Temperature effects on ectotherm imune responses*. Dev Comp Immunol. 1981;5(Supplement 1):117–22.
- WRIGHT, K. M.; SKEBA, S. *Hematology and plasma chemistries of captive prehensile-tailed skinks (Corucia zebrata)*. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, p. 429-432, 1992.
- ZUG, G. R., VITT, L. J., CALDWELL, J. P. 2001. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. 2. ed. San Diego: Academic Press. 630p.

## **ANEXOS**

## CERTIFICADO

Declaramos que o projeto intitulado “**Determinação de Parâmetros Sanitários em Serpentes Peçonhentas Mantidas em Cativeiro Intensivo.**”, protocolo nº. **027/2015**, sob a responsabilidade de **Paula Helena Santa Rita** - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, para fins de pesquisa científica, está de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Católica Dom Bosco.

We certify that the research entitled “**Determination of Sanitary Parameters in Venomous Snakes Retained in Intensive Captivity.**”, protocol number **027/2015**, under the responsibility of **Paula Helena Santa Rita**, which involves the breeding and/or animals of Chordata phylum, for scientific research, is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College for Control of Animal Experimentation, and was approves by the Ethical Committer For Animal Research of Universidade Católica Dom Bosco.

Vigência do Projeto	Nº. de animais/ Espécie/ Linhagem
27/11/2015 à 27/11/2017	95 / Serpentes / 24 Bothrops alternatus, 15 Bothrops mattogrossensis, 27 Bothrops moojeni e 29 Crotalus durissus

Campo Grande, 27 de novembro de 2015.



Profa. Dra. Susana Elisa Moreno  
Coordenadora da CEUA /UCDB



## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47695-1	Data da Emissão: 04/02/2016 11:45	Data para Revalidação*: 05/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

### Dados do titular

Nome: PAULA HELENA SANTA RITA	CPF: 781.817.711-68
Título do Projeto: Diversidade de parasitas em serpentes peçonhentas em duas áreas contíguas com diferentes formas de ocupação	
Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO	CNPJ: 03.226.149/0015-87

### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Instalação das Armadilhas	04/2015	04/2015
2	Coleta em campo	04/2016	04/2017
3	Trabalho Sócio - Ambiental	04/2016	04/2017
4	Identificação dos parasitas	04/2016	04/2017

### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

### Outras ressalvas

1	1) As serpentes que forem coletadas (retiradas definitivamente da natureza) serão incorporadas ao plantel do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), registrado junto ao Ibama sob o nº 718682; 2) O estudo ora autorizado conta com parecer favorável do CEUA/UCDB sob o nº 027/2015.
---	---

### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	KAMILA COSTA MECCHI	Pesquisadora	025.240.451-37	001527200 SEJUSP-MS	Brasileira
2	GUILHERME DE MIRANDA MOURAO	Pesquisador	488.045.506-78	418653 SSP-MS	Brasileira
3	ANA MARIA JANSEN	Pesquisadora	184.807.057-87	1917077 IFP-RJ	Brasileira
4	Filipe Martins Santos	Pesquisador	032.292.371-96	001596796 SSP-MS	Brasileira
5	Heitor Miraglia Herrera	Pesquisador	444.869.871-87	049724503 IFP-RJ	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 31447132



Página 1/3



## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47695-1	Data da Emissão: 04/02/2016 11:45	Data para Revalidação*: 05/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

### Dados do titular

Nome: PAULA HELENA SANTA RITA	CPF: 781.817.711-68
Título do Projeto: Diversidade de parasitas em serpentes peçonhentas em duas áreas contíguas com diferentes formas de ocupação	
Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO	CNPJ: 03.226.149/0015-87

### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CORGUINHO	MS	Reserva Ecológica Estância Quinta do Sol	Fora de UC Federal
2	CORGUINHO	MS	Fazenda Colorado	Fora de UC Federal
3	CORGUINHO	MS	Reserva Ecológica Vale do Bugiu	Fora de UC Federal

### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Bothrops moojeni, Crotalus durissus
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Bothrops moojeni (*Qtde: 10), Crotalus durissus (*Qtde: 10)
3	Marcação de animais silvestres in situ	Crotalus durissus, Bothrops moojeni

\* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Escama, Ectoparasita, Regurgitação/conteúdo estomacal, Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha de queda "pit fall", Coleta manual, Outros métodos de captura/coleta(Abrigo artificial )
3	Método de marcação (Répteis)	Microchip

### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	MISSAO SALESIANA DE MATO GROSSO	criadouro científico
2	Instituto Oswaldo Cruz	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 31447132



Página 2/3



## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 47695-1	<b>Data da Emissão:</b> 04/02/2016 11:45	<b>Data para Revalidação*:</b> 05/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: PAULA HELENA SANTA RITA	CPF: 781.817.711-68
Título do Projeto: Diversidade de parasitas em serpentes peçonhentas em duas áreas contíguas com diferentes formas de ocupação	
Nome da Instituição : MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO	CNPJ: 03.226.149/0015-87

## **Registro de coleta imprevista de material biológico**

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 31447132

