UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

KATHLEEN FERNANDES GREGO

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

2006

KATHLEEN FERNANDES GREGO

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)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luíz Catão-Dias

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1750
FMVZ

Grego, Kathleen Fernandes

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) / Kathleen Fernandes Grego. — São Paulo: K. F. Grego, 2006.
129 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luís Catão-Dias.

1. Jararaca. 2. Testosterona. 3. Estradiol. 4. Corticosterona.
5. Extração de veneno. I. Título.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)

Av. Dr. Vital Brazil, 1500 CEP 05503-900 Tel. 011-37267222 r.2239 Fax 011-37261505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 130/2003, referente ao projeto "Níveis de corticosterona e hormônios esteróides sexuais plasmáticos, basais e estresse induzidos, em *Bothrops jararaca* (WIED,1827)", de responsabilidade da Dra. Kathleen Fernandes Grego está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

São Paulo, 04 de agosto de 2003.

Wilson Fernandes
Presidente da CEUAIB

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GREGO, Kathleen Fernandes

Título: 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)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*A minha querida família,
Roney, Mayara e Luana,
sem a qual a minha vida
não teria sentido algum*

*Aos meus pais,
João e Norma,
pelo grande apoio e incentivo,
mesmo estando distantes*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias pela orientação, amizade e confiança em mim depositada e pelo seu espírito empreendedor e disposição em aceitar novos desafios.

Ao pesquisador e amigo Wilson Fernandes, pelo apoio, incentivo, orientação e pelas valiosas sugestões ao decorrer do trabalho e por proporcionar, como Diretor do Laboratório de Herpetologia, todas as condições necessárias ao desenvolvimento do estudo.

Ao pesquisador e amigo Sávio Stefanini Sant'Anna pelas conversas enriquecedoras, pela disponibilidade em revisar a tese e por ajudar na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira pela disponibilização do Laboratório de Dosagens Hormonais para realização das análises hormonais.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães pela disponibilidade, colaboração e incentivo.

À técnica do Laboratório de Dosagens Hormonais e veterinária, Priscila, pela dedicação e competência.

À amiga Luciana Carla Rameh de Albuquerque Zanotti pela amizade, companheirismo e pela ajuda no processamento das amostras sanguíneas.

Ao amigo Alexandre Pinheiro Zanotti pela ajuda na contenção física dos animais do berçário, pela amizade, momentos de descontração e por permitir o uso de uma de suas belas fotos na capa da minha tese.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada, Sílvia Sochiarelli, pela tranquilidade e paz que passa aos pós-graduandos, sempre com palavras de muito incentivo.

À Supervisora Técnica de Serviço da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice, Elza Mara Faquim, pela revisão e formatação final da tese.

Aos estagiários do Programa de Aperfeiçoamento Profissional, Adriano, Luciano, Carla, Alessandra, Daniel, Anderson, Marília e Alexandre pela amizade, convívio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À técnica Vera Lúcia pelo convívio, palavras de apoio e por ter corado todas as extensões sanguíneas.

Aos funcionários de apoio do Laboratório de Herpetologia, Toninho, Carlos, Cláudio, Lúcia e Irene por estarem sempre à disposição e pelos momentos de descontração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao estudo.

Agradecimento especial a minha família que sempre me dá forças para seguir em frente. Aos meus irmãos Anna e Alexandre e aos meus sobrinhos Gabriel e Daniel, pelo carinho, apoio e compreensão.

RESUMO

GREGO, K. F. **Determinação dos níveis séricos de corticosterona e de hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e da extração de veneno, em *Bothrops jararaca* (Ophidia: Viperidae).** [Determination of serum levels of corticosterone and sexual steroid hormones, stress-induced by physical restraint and venom extraction, on *Bothrops jararaca* (Ophidia: Viperidae).]. 2006. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Neste estudo foram utilizadas 30 serpentes da espécie *B. jararaca* com três anos de idade, nascidas no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e divididas em 3 grupos experimentais, cada qual contendo 10 animais. A média do peso e do comprimento rostro cloacal dos machos e das fêmeas, respectivamente, foi de 97 gramas e 75 centímetros, e 281 gramas e 99 centímetros. Os animais do Grupo A não tiveram o seu manejo diário modificado, permanecendo na mesma sala durante todo o experimento. Os animais dos Grupos B e C foram transferidos, no início do experimento, para uma mesma sala de produção de veneno, sendo os animais do Grupo C eram submetidos à rotina de extração de veneno. A cada dois meses, por um período de 1 ano, 2 mL de sangue foram colhidos pela veia caudal, em dois momentos distintos, para a realização de exames hematológicos e dosagens séricas de estradiol, testosterona e corticosterona, pela técnica de radioimunoensaio. A primeira amostra de sangue foi colhida 120 segundo após a primeira contenção física e a segunda amostra 90 minutos após a contenção física e/ou a extração de veneno. As serpentes dos três grupos apresentaram níveis séricos elevados de corticosterona em resposta ao procedimento de contenção e/ou da extração, demonstrando que estes procedimentos podem ser considerados agentes estressantes. Embora não tenha sido observada correlação significativa entre os níveis de corticosterona e os de hormônios esteróides sexuais, os níveis de testosterona (nos machos) e os de estradiol (nas fêmeas) diminuíram nos animais que apresentaram maiores valores de corticosterona. A relação heterófilo/linfócito não se mostrou um bom sinalizador para detectar estresse nas jararacas do estudo.

Palavras-chave: Jararaca. Estresse. Testosterona. Estradiol. Corticosterona. Extração de veneno.

ABSTRACT

GREGO, K. F. **Determination of serum levels of corticosterone and sexual steroid hormones, stress-induced by physical restraint and venom extraction, on *Bothrops jararaca* (Ophidia: Viperidae).** [Determinação dos níveis séricos de corticosterona e de hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e da extração de veneno, em *Bothrops jararaca* (Ophidia: Viperidae).]. 2006. 129 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

In the present studies, 30 snakes of the species *B. jararaca* with three years old, born in captivity at the Laboratório de Herpetologia - Instituto Butantan - were divided into 3 experimental groups, each one containing 10 animals. The mean weight and snout vent length of males and females were 97 grams and 75 centimeters and 281 grams and 99 centimeters, respectively. The Group A animals did not have their daily management modified since their birth, staying at the same room through all experiment. The Groups B and C animals were transferred, at the beginning of the studies, to the same venom extraction room, but only snakes of Group C were submitted to milking routine. Each two months for a period of a year 2 ml of blood were collected by ventral caudal venipuncture, at two different moments, for hematological exams and serum measurement of estradiol, testosterone and corticosterone by RIA (radioimmunoassay). The first blood samples were collected 120 seconds after physical restraint and the second blood samples occurred 90 minutes after physical restraint and/or milking routine. Snakes of the three groups showed high serum levels of corticosterone response for the restraint and/or milking procedure, indicating that these procedures can be considered stress agents. Although it has not been observed a significant correlation between levels of corticosterone and sexual steroids hormones, testosterone concentration in males and estradiol concentration in females diminished in animals showing higher levels of corticosterone. The heterophil/limphocyte relation could not be considered a good stress indicator in pitvipers of our studies.

Key words: Jararaca. Stress. Testosterone. Estradiol. Corticosterone. Venom extraction.

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 -	Níveis de testosterona plasmática em diferentes espécies de serpentes, descritos na literatura.....	33
Quadro 3.2 -	Principais características das células sanguíneas de serpentes. São Paulo, 2006.....	40
Quadro 4.1 –	Origem das serpentes utilizadas neste experimento. São Paulo, 2004.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1-	Sala de filhotes no biotério de serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2006	45
Figura 4.2-	Pote plástico em que os filhotes de serpentes são mantidos até o segundo ano de idade no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2006.....	45
Figura 4.3-	Sala de produção de veneno com gaiolas plásticas no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2006.....	45
Figura 4.4-	Procedimentos utilizados na extração de veneno no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2006. A: Colocação do animal em recipiente saturado de CO ₂ . B: Extração de veneno em Becker de vidro com cobertura plástica. C: Retorno do animal a sua gaiola, imediatamente após a extração de veneno. São Paulo, 2004.....	46
Figura 4.5-	Contenção física da serpente com laço de Lutz e punção da veia coccigeana, no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2003.....	48
Figura 5.1-	Presença de hemácia imatura (seta branca) ao lado de um azurófilo (seta preta) em extensão sanguínea de <i>B.jararaca</i> , corada com solução May-Grunwald e Giemsa modificado por Rosenfeld, visualizada em microscópio de luz em aumento de 1000x	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-	Controle de qualidade dos ensaios de estradiol em amostras de soro de <i>B. jararaca</i> . São Paulo, 2006.....	56
Tabela 5.2-	Controle de qualidade dos ensaios de testosterona em amostras de soro de <i>B. jararaca</i> . São Paulo, 2006.....	56
Tabela 5.3-	Controle de qualidade dos ensaios de corticosterona em amostras de soro de <i>B. jararaca</i> . São Paulo, 2006.....	57
Tabela 5.4-	Valores médios do peso (g) de fêmeas e machos dos Grupos.....	59
Tabela 5.5-	Valores hematológicos médios dos machos e das fêmeas do Grupo A com erro-padrão dos valores médios (EPM).São Paulo, 2004.....	62
Tabela 5.6-	Valores hematológicos médios dos machos e das fêmeas do Grupo B com erro-padrão dos valores médios (EPM).São Paulo, 2004.....	63
Tabela 5.7	Valores hematológicos médios dos machos e das fêmeas do Grupo C com erro-padrão dos valores médios (EPM).São Paulo, 2004.....	64
Tabela 5.8-	Valores hematológicos médios do Grupo A com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	65
Tabela 5.9-	Valores hematológicos médios do Grupo A com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	66
Tabela 5.10-	Valores hematológicos médios do Grupo A com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	67
Tabela 5.11-	Valores médios da testosterona sérica (ng/mL) do Grupo A, no PC (T ₁) e no PCE (T ₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	75
Tabela 5.12-	Valores médios da testosterona sérica (ng/mL) do Grupo B, no PC (T ₁) e no PCE (T ₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	75
Tabela 5.13-	Valores médios da testosterona sérica (ng/mL) do Grupo C, no PC (T ₁) e no PCE (T ₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	75
Tabela 5.14-	Valores médios da testosterona sérica (ng/mL) dos Grupos	

	A, B e C no PC (T_1), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	78
Tabela 5.15-	Valores médios do estrógeno sérico (pg/mL) do Grupo A no PC (E_1) e no PCE (E_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	80
Tabela 5.16-	Valores médios do estrógeno sérico (pg/mL) do Grupo B no PC (E_1) e no PCE (E_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	80
Tabela 5.17-	Valores médios do estrógeno sérico (pg/mL) do Grupo C no PC (E_1) e no PCE (E_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004.....	80
Tabela 5.18-	Valores médios de estrógeno sérico (pg/mL) dos Grupos A, B e C no PC (E_1), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	82
Tabela 5.19-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos machos do Grupo A no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	85
Tabela 5.20-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos machos do Grupo B no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	85
Tabela 5.21-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos machos do Grupo C no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	85
Tabela 5.22-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos Grupos A, B e C no PC (C_{M1}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	87
Tabela 5.23-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos Grupos A, B e C no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	88
Tabela 5.24-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas do Grupo A no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	91
Tabela 5.25-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) das	

	fêmeas do Grupo B, no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004	91
Tabela 5.26-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas do Grupo C, no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	91
Tabela 5.27-	Valores médios de corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas dos Grupos A, B e C no PC (C_{F1}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	93
Tabela 5.28-	Valores médios de corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas dos Grupos A, B e C no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	94
Tabela 5.29-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) no PC e PCE das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) e dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) do Grupo A, com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	96
Tabela 5.30-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) no PC e PCE das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) e dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) do Grupo B, com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	96
Tabela 5.31-	Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) no PC e PCE das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) e dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) do Grupo C, com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1-	Representação gráfica da curva de regressão linear entre a curva formada pelas concentrações de um “pool” de amostras de soro em diluições sucessivas e a curva padrão do conjunto DSL® MedLab para dosagem de estradiol. São Paulo, 2006.....	54
Gráfico 5.2-	Representação gráfica da curva de regressão linear entre a curva formada pelas concentrações de um “pool” de amostras de soro em diluições sucessivas e a curva padrão do conjunto diagnóstico da DPC® para dosagem de testosterona. São Paulo, 2006.....	55
Gráfico 5.3-	Representação gráfica da curva de regressão linear entre a curva formada pelas concentrações de um “pool” de amostras de soro em diluições sucessivas e a curva padrão do conjunto diagnóstico da MPBiomedicals® para dosagem de corticosterona. São Paulo, 2006.....	55
Gráfico 5.4-	Representação gráfica dos valores médios dos pesos de machos e fêmeas dos Grupos A, B e C. São Paulo, 2004.....	59
Gráfico 5.5-	Variação anual da média do nº de eritrócitos x $10^3/\text{mm}^3$ dos machos dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004.....	61
Gráfico 5.6-	Variação anual da média do nº de eritrócitos x $10^3/\text{mm}^3$ das fêmeas dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos. São Paulo, 2004.....	61
Gráfico 5.7	Variação anual da média do nº de leucócitos x $10^3/\text{mm}^3$ das fêmeas dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. Letras diferentes significam diferenças estatísticas, nas mesmas datas, entre os grupos. São Paulo, 2004.....	68
Gráfico 5.8-	Variação anual da média do nº de leucócitos x $10^3/\text{mm}^3$ dos machos dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004.....	69
Gráfico 5.9-	Variação anual da média do nº de trombócitos/ mm^3 dos animais dos Grupos A, B e C. Diferenças estatísticas entre os grupos, nas mesmas datas, estão	

	representadas por letras diferentes. São Paulo, 2004....	69
Gráfico 5.10-	Variação anual da porcentagem de heterófilos degranulados dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004.....	70
Gráfico 5.11-	Variação anual da porcentagem de linfócitos dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004.....	71
Gráfico 5.12-	Variação anual da porcentagem de azurófilos dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004.....	71
Gráfico 5.13-	Variação anual da porcentagem de basófilos dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos, nas mesmas datas. São Paulo, 2004.....	72
Gráfico 5.14-	Variação anual da porcentagem de heterófilos íntegros dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004.....	72
Gráfico 5.15-	Variação anual das relações heterófilo degranulado/linfócito e heterófilo intacto/linfócito dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004.....	74
Gráfico 5.16-	Representação gráfica da concentração média da testosterona sérica do Grupo A, no PC (T ₁) e no PCE (T ₂), com seus respectivos erros- padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	76
Gráfico 5.17-	Representação gráfica da concentração média da testosterona sérica do Grupo B, no PC (T ₁) e no PCE (T ₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	76
Gráfico 5.18-	Representação gráfica da concentração média da testosterona sérica do Grupo C, no PC (T ₁) e no PCE (T ₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	77
Gráfico 5.19-	Representação gráfica da concentração média da testosterona sérica nos Grupos A, B e C, no PC (T ₁), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	78

Gráfico 5.20-	Representação gráfica da concentração média de estrógeno sérico no Grupo A no PC (E_1) e no PCE (E_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre E_1 e E_2 na mesma data. São Paulo, 2004.....	81
Gráfico 5.21-	Representação gráfica da concentração média de estrógeno sérico no Grupo B no PC (E_1) e no PCE (E_2), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	81
Gráfico 5.22-	Representação gráfica da concentração média de estrógeno sérico no Grupo C no PC (E_1) e no PCE (E_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	82
Gráfico 5.23-	Representação gráfica da concentração média do estrógeno sérico nos Grupos A, B e C no PC (E_1), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	83
Gráfico 5.24-	Representação gráfica da concentração média do estrógeno sérico nos Grupos A, B e C no PCE (E_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	83
Gráfico 5.25-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica dos machos do Grupo A no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{M1} ou C_{M2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{M1} ou C_{M2}). São Paulo, 2004.....	86
Gráfico 5.26-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica dos machos do Grupo B no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{M1} ou C_{M2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{M1} ou C_{M2}). São Paulo, 2004.....	86
Gráfico 5.27-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica dos machos do Grupo C no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-	

	padrão dos valores médios. NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{M1} ou C_{M2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_1 ou C_2). São Paulo, 2004.....	87
Gráfico 5.28-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica nos Grupos A, B e C no PC (C_{M1}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	88
Gráfico 5.29-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica nos Grupos A, B e C no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. Ensaio hormonal não realizado: (NR). São Paulo, 2004.....	89
Gráfico 5.30-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica das fêmeas do Grupo A no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{F1} ou C_{F2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{F1} ou C_{F2}). São Paulo, 2004.....	92
Gráfico 5.31-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica das fêmeas do Grupo B no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{F1} ou C_{F2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{F1} ou C_{F2}). São Paulo, 2004.....	92
Gráfico 5.32-	Representação gráfica da da concentração média de corticosterona sérica das fêmeas do Grupo B no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{F1} ou C_{F2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{F1} ou C_{F2}). São Paulo, 2004.....	93
Gráfico 5.33-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica nos Grupos A, B e C no PC (C_{F1}), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. Ensaio hormonal não realizado (NR). São	

	Paulo, 2004.....	94
Gráfico 5.34-	Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica nas fêmeas dos Grupos A, B e C no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. São Paulo, 2004.....	95
Gráfico 5.35-	Representação gráfica das concentrações médias de corticosterona no PC e no PCE dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) e das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) do Grupo A. São Paulo, 2004.....	97
Gráfico 5.36-	Representação gráfica das concentrações médias de corticosterona no PC e no PCE dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) e das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) do Grupo B. (NR): dosagem hormonal não realizada. São Paulo, 2004.....	98
Gráfico 5.37-	Representação gráfica das concentrações médias de corticosterona no PC e no PCE dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) e das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) do Grupo C. (NR): dosagem hormonal não realizada. São Paulo, 2004.....	99
Gráfico 6.1-	Correlação linear simples dos valores séricas de testosterona e corticosterona em machos de <i>B. jararaca</i> do Grupo A São Paulo, 2004.....	106
Gráfico 6.2-	Correlação linear simples dos valores séricas de testosterona e corticosterona em machos de <i>B. jararaca</i> do Grupo B. São Paulo, 2004.....	106
Gráfico 6.3-	Correlação linear simples dos valores séricas de testosterona e corticosterona em machos de <i>B. jararaca</i> do Grupo C. São Paulo, 2004.....	106

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3	REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1	A GLÂNDULA ADRENAL DOS RÉPTEIS.....	30
3.2	HORMÔNIOS SEXUAIS E A REPRODUÇÃO EM SERPENTES.....	31
3.3	O ESTRESSE EM RÉPTEIS.....	33
3.4	BIOLOGIA DO ESTRESSE E SUA INTERAÇÃO COM A REPRODUÇÃO.....	37
3.5	HEMATOLOGIA DAS SERPENTES.....	39
3.6	O ESTRESSE E SUA INTERAÇÃO COM A HEMATOLOGIA E IMUNIDADE DAS SERPENTES.....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	BIOTÉRIO DE SERPENTES DO INSTITUTO BUTANTAN E A EXTRAÇÃO DE VENENO.....	44
4.2	ANIMAIS	46
4.3	COLHEITA DE MATERIAL.....	48
4.4	PROVAS LABORATORIAIS.....	49
4.4.1	Dosagens hormonais	49
4.4.2	Validação dos conjuntos diagnósticos	50
4.4.3	Hematologia	50
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5	RESULTADOS	53
5.1	VALIDAÇÃO DOS CONJUNTOS DIAGNÓSTICOS.....	54

5.2	CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOIMUNOENSAIO.....	56
5.3	RESULTADOS BIOMÉTRICOS DAS SERPENTES.....	57
5.4	RESULTADOS HEMATOLÓGICOS.....	60
5.5	RESULTADOS DOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA SÉRICA DOS MACHOS E SUA RELAÇÃO COM OS VALORES BIOMÉTRICOS E HEMATOLÓGICOS.....	74
5.6	RESULTADOS DOS NÍVEIS DE ESTRÓGENO SÉRICO DAS FÊMEAS E SUA RELAÇÃO COM OS VALORES BIOMÉTRICOS E HEMATOLÓGICOS.....	79
5.7	RESULTADOS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA DOS MACHOS E SUA RELAÇÃO COM OS VALORES BIOMÉTRICOS, HEMATOLÓGICOS E COM OS NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA.....	84
5.8	RESULTADOS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA DAS FÊMEAS E SUA RELAÇÃO COM OS VALORES BIOMÉTRICOS, HEMATOLÓGICOS E COM OS NÍVEIS SÉRICOS DE ESTRADIOL.....	90
5.9	RESULTADOS DA RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA DAS FÊMEAS E DOS MACHOS.....	96
6	DISCUSSÃO	100
6.1	ANÁLISE DOS RESULTADOS DA CORTICOSTERONA SÉRICA.....	101
6.2	ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E TESTOSTERONA NOS MACHOS.....	104
6.3	ANÁLISE DOS RESULTADOS DA CORTICOSTERONA SÉRICA E SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS SÉRICOS DE ESTRADIOL NAS FÊMEAS.....	109
6.4	ANÁLISE DAS DIFERENÇAS DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA ENTRE MACHOS E FÊMEA.....	110
6.5	ANÁLISE DA HEMATOLOGIA E SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS.....	111
7	CONCLUSÕES	115
	REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a *Bothrops jararaca*, conhecida vulgarmente como jararaca, é encontrada ao sul da Bahia; na Região Sudeste; nos estados do Paraná e Santa Catarina, podendo alcançar os estados do Mato Grosso e Goiás. A jararaca ocupa ampla diversidade de habitat, desde florestas tropicais decíduais e semitropicais, até campos abertos. As fêmeas podem atingir 160 cm, sendo maiores e mais pesadas que os machos. A coloração de *B. jararaca* pode variar de amarelo claro a preto. Quando filhotes, a sua alimentação consiste de anuros e de pequenos lagartos, mudando para aves e pequenos mamíferos quando adultos (ANDRADE; ABE, 1999). Ágil, sobe com facilidade em arbustos e telhados baixos e tem uma grande capacidade adaptativa, ocupando e colonizando tanto áreas silvestres, agrícolas e suburbanas, como até áreas urbanas (MELGAREJO, 2003).

Os dados sobre acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil são baseados na notificação à Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos (CNCZAP). No período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, obteve-se uma média de 20.000 casos de acidentes ofídicos/ano, sendo que 73,1% destes acidentes foram por envenenamento botrópico (ARAÚJO et al., 2003). Sabe-se que a ocorrência do acidente ofídico está, em geral, relacionada a fatores climáticos, aumentando na estação chuvosa, quando também aumenta a atividade humana nos trabalhos no campo. Neste período o número de serpentes recebidas pelo Instituto Butantan (IB) também sofre um acréscimo considerável.

Estima-se que a quantidade total de serpentes (peçonhentas e não peçonhentas) recebidas nos primeiros 50 anos do IB ultrapassasse os 604.688 indivíduos, sendo que 40% (aproximadamente 242.000) destes animais pertenciam à espécie *B. jararaca* (FONSECA, 1954; OLIVEIRA, 1981; VAZ, 1949). O número de serpentes doadas ao IB vem caindo, vertiginosamente, a cada década, provavelmente devido a fatores como a ação antrópica (desmatamento e crescimento populacional), à desativação do serviço de transporte de serpentes pelas linhas férreas e à disseminação de criadouros de serpentes peçonhentas por todo o território nacional. Nas décadas de 50, 60, 70, 80 e 90, foram recebidas 6562, 6045, 4853, 3293 e 1898 jararacas, respectivamente (Fernandes, W., comunicação pessoal)¹.

¹ Informe fornecido por Fernandes, W. do Laboratório de Herpetologia do IB em 2000, baseado em relatórios anuais.

Devido ao declínio no recebimento de animais peçonhentos pelo IB, o Laboratório de Herpetologia percebeu a necessidade de estudos na área de criação de serpentes em Cativeiro, com o intuito principal de buscar a sua auto-suficiência, visto que o veneno é utilizado não só para a produção de soros anti-peçonhas, como para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Para implantar um programa de reprodução mais eficiente, é necessário entender melhor o comportamento e a fisiologia reprodutiva dos animais.

O veneno da jararaca possui toxinas que induzem ao aparecimento de distúrbios hemostáticos durante o envenenamento de suas vítimas. De fato, dentre as diversas propriedades farmacológicas dos venenos, aquelas que atuam sobre a hemostasia sempre foram as que mais suscitaram interesse dos pesquisadores, quer pela possibilidade de aplicação terapêutica e diagnóstica, quer pela importância nos envenenamentos ofídicos (SANO-MARTINS; SANTORO, 2003). O estudo do veneno da jararaca permitiu o descobrimento das enzimas bradicinina (ROCHA-E-SILVA et al., 1949) e captopril, sendo esta última inibidora da conversão de angiotensina, hoje amplamente utilizada no tratamento da hipertensão arterial, na insuficiência cardíaca congestiva e na doença arterial coronária (FERREIRA, 1965).

Atualmente, o Biotério de Serpentes do IB mantém cerca de 800 serpentes peçonhentas com a finalidade de produção de imunobiológicos, sendo que, aproximadamente, 150 delas são da espécie *B. jararaca*. As serpentes recém-chegadas da natureza, antes de fazerem parte do plantel de produção de veneno, passam por medidas profiláticas rigorosas, com o intuito de diminuir a propagação de doenças para o plantel já estabilizado e também para minimizar os efeitos deletérios do estresse de cativeiro. Algumas dessas medidas profiláticas são a vermifugação e banho de imersão em ectoparasiticidas, exames hematológicos além da permanência mínima de 60 dias em quarentena, onde são realizados exames coproparasitológicos. Tanto na quarentena, como nas salas de produção de veneno, as serpentes são mantidas em salas climatizadas, em gaiolas individuais com substrato de papelão ondulado e água *ad libitum*. Diariamente as serpentes passam por uma inspeção e, quando necessário, as gaiolas sujas são substituídas e a água trocada.

Mensalmente, as serpentes são submetidas à extração de veneno na própria sala onde são mantidas. Nestes dias a rotina diária da sala é modificada pois durante a extração de veneno há a presença constante de, no mínimo, duas pessoas (o extrator e o auxiliar) e de, no máximo, três pessoas, que permanecem na sala por, aproximadamente, 3 a 4 horas seguidas,

manipulando os animais a serem extraídos. Para tornar a extração de veneno mais segura para o extrator e com um menor desperdício de veneno, desde 1984 as serpentes são sedadas em dióxido de carbono antes de serem submetidas à extração.

Um dos grandes desafios da manutenção de ofídios peçonhentos em cativeiro é o de minimizar os efeitos do estresse, aumentando-se o bem-estar e a qualidade de vida destes animais (GUILLETTE et al., 1995) e, conseqüentemente, o índice reprodutivo, já que o estresse pode influenciar, de maneira negativa, a atividade reprodutiva dos animais.

A resposta orgânica ao estresse está altamente correlacionada ao tipo de estímulo, ao modo de percepção e às características psicológicas do animal (FERREIRA et al., 2002). Estudos sobre o estresse crônico em répteis demonstraram que níveis elevados de corticosterona sérica estão associados com a falência reprodutiva, supressão imunológica e uma redução ou ausência de crescimento (MORICI et al., 1997). Em indivíduos cronicamente estressados o risco de desenvolvimento de doenças infecciosas aumenta.

De acordo com alguns autores (AGUIRRE et al., 1995; WEISS et al., 2002), o estresse crônico, a falência reprodutiva e a imunossupressão podem ser acompanhados em uma população de répteis através da determinação dos níveis de corticosterona sérica, determinação dos hormônios esteróides sexuais e determinação dos parâmetros sanguíneos específicos como: contagem eritrocitária, contagem leucocitária, determinação da hemoglobina e do hematócrito, cálculo do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Como, geralmente, as pesquisas que abordam este assunto estudam apenas os efeitos do estresse agudo (DUNLAP; WINGFIELD, 1995; MATHIES et al., 2001; MOORE et al., 2001) e não documentam os efeitos do estresse crônico em serpentes, estudos referentes à influência dos agentes estressores crônicos nos valores hormonais e hematológicos em um plantel de serpentes destinadas à produção de veneno são importantes para que possamos entender um pouco mais sobre a fisiologia do estresse nestes animais e implantar técnicas de manejo que possam minimizar o estresse durante a extração de veneno. Desta maneira poderemos melhorar a qualidade de vida destes animais em cativeiro e, conseqüentemente o seu índice reprodutivo. Na experiência do Laboratório de Herpetologia do IB, as serpentes nascidas em cativeiro se adaptam melhor às condições de um biotério do que animais recém-capturados.

A melhoria na qualidade de vida das serpentes reverte, diretamente, na melhoria da produção de imunobiológicos tanto qualitativa, como quantitativamente.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a influência da contenção física, associada ou não à rotina de extração de veneno, nos níveis de hormônios esteróides sexuais e de corticosterona na espécie *Bothrops jararaca*, delineando estratégias mais eficientes para a manutenção e reprodução deste ofídio em cativeiro.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Validar, em soro de *Bothrops jararaca*, os conjuntos diagnósticos comerciais DPC (Coat-A-Count – Diagnostic Products Corporation/USA), em fase sólida, para dosagem de testosterona; DSL (Diagnostic System Laboratories INC/USA), em fase líquida, para dosagem de estradiol; e ImmuChemTM (MP Biomedicals/USA), com duplo anticorpo, para dosagem de corticosterona.
- ❖ Determinar, nas fêmeas, os níveis séricos de estradiol e de corticosterona antes e após o procedimento da contenção física e/ou da extração de veneno.
- ❖ Determinar, nos machos, os níveis séricos de testosterona e de corticosterona antes e após o procedimento da contenção física e/ou da extração de veneno.
- ❖ Analisar os parâmetros hematológicos dos animais, verificando diferenças quantitativas e qualitativas nas células sanguíneas ao longo do experimento.
- ❖ Verificar possíveis correlações entre as diferentes variáveis estudadas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A glândula adrenal dos répteis

A glândula adrenal tem a importante função de manter a homeostasia do organismo através de mudanças apropriadas na fisiologia, no metabolismo e no balanço eletrolítico normal, produzindo hormônios em resposta aos estresses agudo e crônico. Nos répteis, a glândula adrenal exibe uma associação anatômica consistente com a gônada, sendo composta por dois tipos de tecidos, interrenal e cromafim (HEBARD; CHARIPPER, 1955). O termo “tecido interrenal” foi criado para a equivalência citológica e funcional, em outros vertebrados, da córtex adrenal nos mamíferos, enquanto o termo “tecido cromafim” designa todas as células derivadas da crista neural, especializadas para a produção de catecolaminas simpatomiméticas, independente de sua localização. As células cromafins são assim chamadas porque as catecolaminas contidas em seus grânulos citoplasmáticos têm afinidade por sais de crômio e escurecem quando oxidados pelo dicromato de potássio (DE FALCO et al., 2004).

As células do tecido cromafim secretam adrenalina (epinefrina) e noradrenalina (norepinefrina) e correspondem às células da medula adrenal dos mamíferos (GUILLETTE et al., 1995). O segundo tipo de célula, as células esteroideogênicas interrenais, se coram mais fracamente com eosina-hematoxilina, são de origem mesodermal e secretam corticosteróides. As células interrenais são homólogas às células da córtex adrenal de mamíferos (CHESTER-JONES, 1977; GABE, 1970). Doddamani (2000) e Rupik (2002) demonstraram que a diferenciação de cromafinoblastos em células cromafins é, provavelmente, estimulada pela influência dos hormônios que são produzidos pelas células do tecido interrenal.

Em répteis, estes dois tipos de células não estão distintamente separados em zonas delimitadas, como no caso dos mamíferos. Assim, a diferenciação entre estas células é feita de acordo com suas qualidades tintoriais e características celulares (FRYE, 1991).

As concentrações relativas de corticosterona plasmática e cortisol diferem entre as classes de vertebrados. A corticosterona é secretada, primariamente, em anfíbios, répteis e aves e o cortisol em peixes e na maioria dos mamíferos (GREENBERG; WINGFIELD, 1987).

Em muitos vertebrados, os hormônios glicocorticosteróides coordenam respostas fisiológicas a diversos estímulos nocivos, como doenças, agressão social, estações do ano desfavoráveis e fome. Embora os glicocorticosteróides sejam essenciais para a sobrevivência

a estes desafios, a elevação prolongada ou repetida destes hormônios pode causar vários efeitos danosos, incluindo inibição dos sistemas reprodutivo e imunológico (MUNCK et al., 1984; SAPOLSKY, 1987). Em alguns machos, os glicocorticosteróides inibem a reprodução através da supressão da produção de testosterona, um esteróide gonadal, que é necessário tanto para a produção de espermatozóides, como para a ativação do comportamento territorial e da corte (MOORE; ZOELLER, 1985). Em algumas fêmeas, os glicocorticosteróides diminuem o número de oogônias e oócitos, além de diminuir os níveis de estradiol sérico e suprimir a formação de folículos vitelogênicos nos ovários (NIJAGAL; YAJURVEDI, 1999).

O papel fisiológico dos glicocorticosteróides ainda continua sendo investigado, mas já é conhecido que vários agentes estressores, como alguns fatores ambientais bióticos e abióticos (períodos climáticos desfavoráveis, predadores, subordinação hierárquica, poluentes, ação antrópica) são capazes de estimular a secreção de corticosterona pela glândula adrenal de vários répteis estudados até hoje (GUILLETTE et al., 1995).

3.2 Hormônios sexuais e a reprodução em serpentes

Como em outros vertebrados, a atividade reprodutiva em répteis é controlada pelo sistema neuroendócrino. Vários fatores como condições ambientais (fotoperíodismo e temperatura), estado nutricional e comportamento social, influenciam o sistema nervoso e controlam a liberação de um neuropeptídeo, o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), pelo hipotálamo (LICHT et al., 1985). O GnRH é liberado na conexão vascular entre o hipotálamo e a glândula pituitária e é transportado para a pituitária, onde estimula a secreção de duas gonadotropinas: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Todos os répteis estudados parecem possuir estes dois hormônios, com exceção das serpentes e dos lagartos que possuem uma única gonadotropina, o “FSH-like” (ISHII, 1991).

O testículo de répteis sintetiza grandes concentrações de testosterona com menor quantidade de dehidrotestosterona (BOURNE, 1991). O ovário sintetiza primariamente estradiol-17 β , durante a fase de crescimento folicular do ciclo (vitelogênese) e progesterona durante a fase luteal do ciclo reprodutivo (JONES; BAXTER, 1991). Segundo Bonnet et al. (1994) o estradiol-17 β tem sido descrito como promotor de mobilização de reservas maternas para a vitelogênese em *Vipera aspis*. A administração exógena de estradiol também influencia a reprodução em répteis, causando hipertrofia ovidutal, aumento do número de

glândulas de muco, atividade secretória ovidutal e aumento da vascularidade (GIRLING, 2002; MEAD et al., 1981).

Os hormônios esteróides sexuais são essenciais para a maturação do trato reprodutivo de machos e fêmeas durante o ciclo reprodutivo (JONES; BAXTER, 1991; PALMER; GUILLETTE, 1991), são responsáveis pelas características sexuais secundárias e modificam comportamentos reprodutivos em répteis (MOORE; LINDZEY, 1992; WHITTIER; TOKARZ, 1992).

Segundo Almeida-Santos e Orsi (2002), a fêmea de *B. jararaca* tem um ciclo reprodutivo sazonal, apresentando uma fase ativa de crescimento folicular, acasalamento e gestação em um ano e uma fase de parturição seguida de quiescência folicular em outro ano, caracterizando um ciclo bienal. A vitelogênese ativa (com altos níveis de estradiol) se inicia em março, ou seja, no final do verão, e finaliza em setembro, na primavera. O período das cópulas é no final do verão e início do outono e é coincidente com a vitelogênese das fêmeas (ALMEIDA-SANTOS, 2005). O ciclo ovariano das jararacas está sob a influência dos hormônios estrógeno e progesterona (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004).

Nos machos de jararaca, a espermatogênese inicia-se no verão. Os espermatozoides estão presentes no ducto deferente, em grandes quantidades, no outono (acasalamento) e no inverno (ALMEIDA-SANTOS, 2005). A presença de espermatozoides no ducto deferente durante todos os meses do ano indica um potencial para ocorrência de cópulas em qualquer época do ano (JANEIRO-CINQUINI, 1993).

Os valores da testosterona plasmática podem variar entre Famílias diferentes, assim como entre animais do mesmo gênero. Pesquisadores trabalhando com *Naja naja* (BONNA-GALLO et al., 1980), *Nerodia sipedon* (WEIL; ALDRIDGE, 1981), *Agkistrodon piscivorus* (JOHSON et al., 1982), *Thamnophis sirtalis* (WEIL, 1985), *Vipera aspis* (NAULLEAU et al., 1987), *Vipera berus* (NAULLEAU; FLEURY, 1996), *Coluber viridiflavus* (BONNET; NAULLIEAU, 1996), *Agkistrodon contortix* (SCHUET et al., 1997), *T. s. concinnus* (MOORE et al., 2000, 2001) e *B. irregularis* (MATHIES et al., 2001) encontraram diferentes concentrações de testosterona que variaram de 0,06 a 103ng/mL, conforme pode ser observado no quadro 3.1.

Família	Espécie	Testosterona (ng/mL)	Referência
Elapidae	<i>Naja naja</i>	0,06 – 2,5	Bonna-Gallo et al, 1980
Viperidae	<i>Agkistrodon contortix</i>	1,03 – 103,8	Schuet et al (1997)
	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0,1 – 3,0	Johson et al, 1982
	<i>Vipera aspis</i>	0,1 – 60,0	Naulleau et al ,1987
	<i>Vipera berus</i>	0,51 – 45,0	Naulleau e Fleury, 1988
Colubridae	<i>Boiga irregularis</i>	0,07 – 3,20	Mathies et al, 2001
	<i>Coluber viridiflavus</i>	3,9 – 45,0	Bonnet e Naulleau, 1996
	<i>Thamnophis sirtalis</i>	2,4 – 38,3	Well, 1985
	<i>Thamnophis s. concinnus</i>	2,0 – 88,0	Moore et al, 2000
	<i>Nerodia sipedon</i>	0,1 – 21,5	Weil e Aldridge, 1981

Quadro 3.1 Níveis de testosterona plasmática em diferentes espécies de serpentes, descritos na literatura.

Mesmo entre animais da mesma espécie encontramos relatos científicos com diferentes médias de concentrações de testosterona. Isto pode ocorrer devido às diferentes condições em que as amostras de sangue foram colhidas nos estudos, como a estação do ano, localização geográfica do estudo e tempo decorrido da captura do animal até a colheita da amostra sanguínea, assim como quanto ao método de análise.

3.3 O estresse em répteis

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. Muitas vezes, o indivíduo precisa responder a desafios similares com diferentes estratégias, dependendo do contexto social e ambiental.

Segundo Moberg (1985), 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 (agente estressor) é ameaçador, três tipos de respostas biológicas podem ocorrer:

- resposta comportamental: é a resposta mais econômica para o animal, onde este apenas se afasta da ameaça.
- resposta autonômica: caracterizada por uma resposta específica rápida. No estresse agudo, os ramos parassimpático e simpático do sistema nervoso autonômico alteram os batimentos cardíacos, resistência vascular, secreções das glândulas exócrinas, contração dos músculos lisos do sistema digestório e secreção de catecolaminas pela

glândula adrenal e pelos terminais nervosos noradrenérgicos, para que o animal consiga fazer ajustes fisiológicos rápidos em resposta ao estresse.

- resposta neuroendócrina: 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.

Como em outros vertebrados, os répteis também exibem uma resposta bem desenvolvida ao estresse, que é capaz de 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.

A síntese de corticosteróides pelo tecido interrenal está sob o controle de um hormônio pituitário anterior, o adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH é, por sua vez, regulado pelo hormônio corticoliberina, que é sintetizado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo. Vários fatores influenciam a concentração de corticosteróides plasmáticos incluindo variabilidade genética, idade, sexo, estado nutricional, o tipo de agente estressor e a frequência de apresentação do agente estressor (SELYE, 1973).

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 (SAPOLSKY, 1992). Perturbações ambientais capazes de desfazer a homeostasia do organismo engatilham a cascata neurohormonal, resultando na elevação de glicocorticosteróides, catecolaminas e glicose, entre outros fatores sanguíneos (CHROUSOS; GOLD, 1992) necessários para restaurar a homeostasia.

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 esteróides 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 glicocorticosteróides durante o estresse é o fígado, seguido das células linfóides, 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 normal dos répteis (GUILLETTE et al., 1995) causando múltiplos problemas como inibição das funções normais dos hormônios reprodutivos (NIJAGAL; YAJURVEDI, 1999), morte neuronal (SAPOLSKY, 1992), inibição da função imune e do crescimento (MORICI et al., 1997) e dificuldade em resistir a patógenos (DUNLAP; SCHALL, 1995).

A resposta orgânica ao estresse está altamente correlacionada ao tipo de estímulo, ao modo de percepção, e às características psicológicas do animal (FERREIRA et al., 2002). Selye (1936) descreveu uma série de modificações anatômicas e fisiológicas não-específica, característica de animais expostos a vários agentes estressantes e denominou este processo de “Síndrome Geral de Adaptação”, definindo 3 estágios: alarme, adaptação e exaustão.

O estágio de alarme é geralmente tido como uma resposta aguda ao estresse e pode ser detectado horas após a exposição ao agente estressor. 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 expulsa 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’.

No segundo estágio (‘adaptação’), o organismo repara os danos causados pela reação de alarme, reduzindo os níveis hormonais. Se o estresse se torna crônico, quando ocorre um aumento constante na concentração dos hormônios glicocorticosteróides, o animal entra num estágio caracterizado, inicialmente, por hipertrofia das glândulas adrenais e inibição do crescimento e da função gonadal. Estudos sobre estresse crônico em répteis demonstraram que níveis elevados de corticosterona sérico estão associados com falência reprodutiva, supressão imunológica e uma redução ou ausência de crescimento (MORICI et al., 1997). Em indivíduos cronicamente estressados o risco de desenvolvimento de doenças infecciosas aumenta.

Se o agente estressor é mantido, o animal ‘resistirá’ ao estresse e sua morfologia e fisiologia retornam praticamente ao normal. Esta resistência é específica, ou seja, se um novo agente estressor é introduzido, uma nova resposta irá começar. Se o estresse crônico se torna severo, o animal não manterá a homeostasia e entrará no estágio final (exaustão), onde muitos

dos sintomas observados durante o estágio de alarme reaparecerão. Se constantemente estimulado, o sistema adrenal pode exibir um estado patológico, onde os hormônios glicocorticosteróides não são mais secretados (GUILLETTE et al., 1997).

A resposta ao estresse pode ser iniciada em reação às interações sociais (SHUELL et al., 1996), perturbações bióticas e abióticas do ambiente (WINGFIELD et al., 1982), assim como em resposta à captura e manipulação (MOORE et al., 1991). Quaisquer mudanças ambientais que perturbem a homeostase do organismo desencadeiam uma cascata neurohormonal que resulta na elevação sérica de glicocorticosteróides, catecolaminas e glicose, entre outros necessários ao restabelecimento da homeostasia (JESSOP, 2001).

Muitos vertebrados secretam glicocorticosteróides em resposta a uma diversidade de estressores fisiológicos que ocorre naturalmente, como clima desfavorável, falta de alimento e parasitismo (DUNLAP; WINGFIELD, 1995). Um componente clássico da resposta ao estresse em espécies vertebradas é a elevação nos níveis de glicose circulante como consequência da estimulação de hormônios hiperglicêmicos, como catecolaminas e glicocorticosteróides (DEVENPORT et al., 1989; MIZOCK, 1995). O efeito hiperglicêmico dos glicocorticosteróides sob condições estressantes, em muitos vertebrados, é devido a sua capacidade gluconeogênica e na sua habilidade em inibir a utilização de glicose periférica em tecidos não essenciais, assim como a conversão de glicogênio hepático em glicose (WIDMAIER, 1990). Em répteis, a corticosterona demonstrou possuir efeitos gliconeogênicos e hiperglicêmicos (CALLARD; CHAN, 1972; JACOB; OOMEN, 1992).

Tradicionalmente, o estresse é visto como tendo um impacto negativo na reprodução em diversos níveis (GREENBERG; WINGFIELD, 1987). As ramificações comportamentais e fisiológicas deste mecanismo hormonal são bem reconhecidas, pois comprometem o esforço reprodutivo de um indivíduo para promover a sua sobrevivência durante períodos de instabilidade ecológica (SAPOLSKY, 1987; WINFIELD et al., 1998). A energia necessária para a sobrevivência é sempre seqüestrada de necessidades menos emergenciais para a sobrevivência do indivíduo como o crescimento, imunocompetência e reprodução (JESSOP et al., 1999)

Contudo, existem situações em que alguns animais exibem uma dessensibilização adrenal para prevenir distúrbios físicos e comportamentais que possam interferir com a reprodução. Esta modulação adrenocortical é um mecanismo através do qual os vertebrados mediam mudanças na taxa, duração, e magnitude da síntese de glicocorticosteróides e a sua

liberação, em resposta a agentes estressores (WINGFIELD; ROMERO, 2001). Embora hajam vários exemplos de modulação adrenocortical em répteis, até a presente data (COTE et al., 2006; GREENBERG; WINGFIELD, 1987; HOOPES et al., 2000;) existe pouco conhecimento dos mecanismos fisiológicos que operam no eixo HPA para capacitar a modulação na liberação de corticosterona durante o estresse. Este mecanismo adaptativo otimiza o sucesso reprodutivo, pondo em risco a sobrevivência do indivíduo (JESSOP et al., 1999).

3.4 Biologia do estresse e sua interação com a reprodução

As respostas hormonais ao estresse fisiológico geralmente envolvem ativação do HPA, aumentando a concentração de glicocorticosteróides plasmáticos que pode resultar, concomitantemente, em diminuição de esteróides sexuais plasmáticos. Interações negativas entre o HPA e o eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG) sugerem que a ativação de um sistema é acompanhado pela diminuição na atividade do outro. Diminuição na testosterona plasmática é acompanhada por um aumento de glicocorticosteróides em lagartos machos de *Urosaurus ornatus* e em machos de *Thamnophis sirtalis parietalis* (MOORE et al., 1991, 2000). Assim, respostas fisiológicas ao estresse, marcados por um aumento na concentração plasmática de glicocorticosteróides, resulta em um decréscimo de hormônios esteróides sexuais e supressão do comportamento reprodutivo de várias espécies (RIVIER; RIVEST, 1991; WINGFIELD, 1988).

Em fazendas de criação de crocodilos, foi observada uma atividade reprodutiva baixa após o transporte de animais de um tanque para outro ou após modificações intensas em um tanque. Estas atividades são consideradas estressantes e vários criadores concluíram que o estresse limita a atividade reprodutiva do seu plantel (GUILLETTE et al., 1995).

Segundo Lance e Elsey (1986), jacarés de vida livre exibiram uma redução de 50% na testosterona plasmática após 4 horas de captura, com um declínio de menos de 10% dos valores iniciais após 24 horas de captura. Coincidentemente, com o decréscimo dos níveis plasmáticos de testosterona, o corticosteróide plasmático aumentou drasticamente durante as primeiras doze horas.

Moore e Zoeller (1985) demonstraram que o estresse de cativeiro resulta em um aumento na corticosterona plasmática e uma diminuição, correspondente, na secreção de

hormônio liberador do hormônio luteinizante pelo hipotálamo de salamandra *Taricha granulosa*.

O aumento nos níveis de corticosteróide plasmático em animais induzidos ao estresse também parece suprimir diretamente a secreção de esteróides gonadais em mamíferos e outros vertebrados afetando a reprodução (GAO et al., 1996). Segundo Dunlap e Schall (1995), o excesso de corticosterona causa uma diminuição tanto no tamanho do testículo como na secreção de testosterona e, conseqüentemente, inibição do comportamento reprodutivo de machos.

Em aves, α -globulinas capazes de se ligarem à corticosterona no plasma sanguíneo, também podem se ligar à testosterona, mas com menor afinidade e, com o auxílio desta globulina, estes hormônios são levados às células portadoras de receptores. É possível que uma situação similar ocorra em répteis, onde globulinas plasmáticas possam se ligar tanto à corticosterona como à testosterona (JENNINGS et al., 2000). Concentrações altas de corticosterona podem desalojar a testosterona dos receptores, fazendo com que esta seja eliminada (DEVICHE et al., 2001).

Nijagal e Yajurvedi (1999) observaram um decréscimo significativo no número de oogônias e oócitos e nos níveis de estradiol sérico, além da ausência de folículos vitelogênicos nos ovários de fêmeas de lagartos (*Mabuya carinata*) tratadas com hormônio folículo estimulante (FSH) + corticosterona, comparadas às fêmeas de lagartos tratadas somente com FSH. Segundo Michael e Cooke (1994), os glicocorticosteróides não possuem efeito na atividade enzimática basal, mas inibem a estimulação induzida pelo hormônio luteinizante (LH) e FSH nas gônadas.

O estresse é, geralmente, descrito como tendo um efeito deletério sobre as gônadas (STEPHENS, 1980). Contudo, existem estudos recentes em alguns répteis (*Urussaurus stansburiana* (WILSON; WINGFIELD, 1992), *Triturus carnifex* (ZERANI; GOBETTI, 1993), *Geochelone nigra* (SCHRAMM et al., 1999), *Thamnophis sirtalis parietalis* (MOORE et al., 2001)) que relatam uma relação positiva entre a corticosterona e a reprodução. Segundo Moore e Jessop (2003) uma relação positiva entre a corticosterona plasmática e a reprodução pode ocorrer quando o comportamento reprodutivo é energeticamente desgastante.

Segundo Moore e Greene (2001), trabalhando com serpentes do Canadá (*T. sirtalis parietalis*) e Jessop (2001; 2002), com tartarugas marinhas (*Chelonia mydas* e *Eretmochelys*

imbricata), animais que possuem oportunidades reprodutivas limitadas, ou seja, possuem um período curto de acasalamento ou períodos longos de espera para ovipostura, podem suprimir a resposta adrenocortical ao estresse durante a estação reprodutiva, maximizando o investimento reprodutivo.

3.5 Hematologia das serpentes

Os exames de sangue constituem poderosa arma diagnóstica, auxiliando os médicos veterinários na elucidação de enfermidades que acometem os animais, orientando a terapêutica a ser instituída e, muitas vezes, permitindo o estabelecimento de um prognóstico mais acurado (CAMPBELL, 1996). Vários fatores como idade, sexo, estação do ano, estresse, dieta, hormônios circulantes, temperatura e hidratação podem afetar os valores sanguíneos (FRYE, 1991).

As células sanguíneas de répteis podem ser agrupadas em eritrócitos, leucócitos e trombócitos (SAINT GIRONS, 1970). Os leucócitos são corpúsculos incolores envolvidos nos mecanismos de defesas celulares e imunocelulares do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). Em serpentes o número de leucócitos totais varia de 6 a 12 x 10³ células/mm³ (MADER, 1996). Os eritrócitos, os trombócitos e os linfócitos são morfolologicamente similares entre várias espécies de répteis e a diferenciação entre estas duas últimas células é difícil.

Os trombócitos estão relacionados ao sistema de coagulação sanguínea, sendo análogos às plaquetas de mamíferos. Quando não ativados possuem formato arredondado, com núcleo denso arredondado ou oval.

Segundo Alleman et al. (1999), a classificação dos diferentes leucócitos presentes nas serpentes são: linfócitos, azurófilos, heterófilos e basófilos. As principais características destas células estão apresentadas no quadro 3.2.

Células sanguíneas	Núcleo	Citoplasma
Eritrócito	O seu núcleo varia de oval a pleomórfico, com lobulações irregulares.	O citoplasma de eritrócitos imaturos é menor, arredondado e mais basofílico do que o citoplasma de eritrócitos maduros.
Trombócitos	O seu núcleo é oval ou elíptico, com cromatina densa.	Fracamente basofílico
Linfócitos	Seu núcleo é maior do que o de um trombócito, com uma cromatina menos densa.	Citoplasma mais basofílico do que o de um trombócito. A razão núcleo/citoplasma é maior nos linfócitos do que nos trombócitos.
Azurófilos	Seu núcleo é arredondado e possui cromatina densa.	O citoplasma contém grânulos azurofílicos e alguns vacúolos.
Heterófilo	O seu núcleo é pequeno, arredondado a oval e localizado, geralmente, excentricamente.	O citoplasma possui um grande número de grânulos eosinofílicos, com tamanho variado. A razão núcleo/citoplasma (N/C) é pequena.
Basófilos	O núcleo tem a sua visualização dificultada devido a grande quantidade de grânulos presentes no citoplasma.	O citoplasma possui uma grande quantidade de grânulos arredondados basofílicos. A razão núcleo/citoplasma (N/C) é grande.

Quadro 3.2 – Principais características das células sanguíneas de serpentes. São Paulo, 2006

Os linfócitos são células mononucleares esféricas com núcleo também esférico que se cora intensamente pelos corantes hematológicos. Estas células são responsáveis pela defesa imunológica humoral e celular do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). O número absoluto de linfócitos circulantes pode variar de acordo com a espécie, idade, sexo, estação do ano, estado nutricional, presença de hemoparasitas, metazoários e na vigência de processos inflamatórios crônicos (FRYE, 1991).

Pouco se sabe sobre a origem e a função dos azurófilos, podendo-se afirmar apenas que o aumento no número ou alteração nas características morfológicas são indicativos de processo infeccioso (HAWKEY; DENNETT, 1989).

Os heterófilos possuem importante papel na defesa do organismo assumindo, provavelmente, o papel representado pelos neutrófilos nos mamíferos. São células grandes com núcleo excêntrico, de formato oval ou arredondado, e grânulos intracitoplasmáticos que se colorem em vermelho-alaranjado com corantes tipo Romanowsky. Estas células estão envolvidas com a morte celular, incluindo a quimiotaxia, opsonização, ingestão e lise (FRYE, 1991; HAWKEY; DENNETT, 1989). O número de heterófilos também pode estar aumentado em casos de necrose tecidual. Em animais sadios os heterófilos representam de 30 a 45% do total de leucócitos, podendo atingir o índice de 65 % em casos de infecção bacteriana (FRYE, 1991).

Os basófilos são caracterizados pela presença de grande quantidade de grânulos basofílicos citoplasmáticos que podem, até mesmo, impedir a visualização do núcleo celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). Acredita-se que estas células estejam envolvidas com processos alérgicos possuindo receptores para imunoglobulina E. Representam de 10 a 25% do total de leucócitos, podendo ter essa porcentagem diminuída em períodos de hibernação (FRYE, 1991).

3.6 O estresse e sua interação com a hematologia e imunidade das serpentes

Segundo Aguirre et al. (1995), o estresse crônico e a imunossupressão podem ser acompanhados em uma população de répteis através da análise dos níveis de corticosterona plasmáticos e parâmetros sanguíneos específicos como a contagem eritrocitária, contagem leucocitária, determinação da hemoglobina e do hematócrito, cálculo do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Segundo Bauer (2002), a corticosterona 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 neutrófilos (=heterófilos nos répteis) e uma redução importante na contagem de linfócitos, embora a contagem total de leucócitos pareça não se alterar. O aumento da relação entre heterófilos/linfócitos, tem sido usado para medir o estresse em frangos (GROSS; SIEGEL, 1983) e em tartarugas marinhas (AGUIRRE et al., 1995).

É importante salientar que, nos homens, as mudanças na relação neutrófilo/linfócito na circulação decorrem da ação dos glicocorticosteróides e da noradrenalina, que promovem uma migração temporária de leucócitos do sangue para os tecidos ou vice-versa (BAUER, 2002). Estudos demonstraram que, durante o estresse crônico, os linfócitos migram para a medula óssea, talvez como uma proteção contra os efeitos nocivos dos níveis elevados de glicocorticosteróides circulantes (MCEWEN, 1997) e que ocorre uma redução na capacidade dos linfócitos de se multiplicar, devido a uma redução na produção de interleucina-2, uma citocina importante liberada pelo linfócito e capaz de ativar e induzir a proliferação celular (BAUER, 2002).

Saad et al. (1987) demonstrou que no lagarto *Chalcides ocellatus*, uma exposição curta e repetida de corticosterona exógena reduz a função imunológica e que um aumento sazonal no glicocorticosteróide endógeno coincide com o seu período anual natural de imunossupressão (SAAD; EL RIDI, 1990). Lance (1992) demonstrou que o estresse por contenção ou o implante de corticosterona em jacarés resultou em um decréscimo nos linfócitos e em um aumento nos heterófilos.

Segundo Kelly (1985) a depleção de monócito é uma parte importante da leucopenia induzida pelo glicocorticosteróide, pois diminui as células circulantes que participam da fagocitose. Desta maneira, a fagocitose, a citólise bacteriana e a digestão bacteriana também estão diminuídas. Os glicocorticosteróides, aparentemente, inibem a produção de enzimas, tornam mais lento o processamento do antígeno e, assim, reduzem quantitativamente a resposta imunológica.

Corticosteróides e hormônios sexuais parecem regular o sistema imunológico de répteis (SAAD; EL RIDI, 1988; ZAPATA et al., 1992) e alterar as várias funções dos linfócitos. Quando uma infecção se instala, essas células de defesa têm, por exemplo, a capacidade de se multiplicar, o que aumenta as chances de remover o agente infeccioso. Diversos estudos têm demonstrado que o estresse crônico diminui a proliferação linfocitária, o que também acontece no estado clínico depressivo em humanos (PICKERING et al., 1984; SAAD; EL RIDI, 1988).

Segundo Roth (1985) o estresse pode levar a um aumento na susceptibilidade às doenças, e esta condição é, em parte, devido às alterações nas funções imunológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Biotério de serpentes do Instituto Butantan e a extração de veneno

O Biotério de Serpentes do Instituto Butantan (IB) criado em 1962 mantém, atualmente, cerca de 800 serpentes sendo que, aproximadamente, 200 são da espécie *Bothrops jararaca*. Todas as serpentes adultas são mantidas individualizadas em gaiolas plásticas de 60 x 40 x 15 cm que são forradas com papelão ondulado e guarnecidas com pratos plásticos para água. As salas onde são mantidos os animais são climatizadas, com temperatura média entre 25° a 27 °C e umidade relativa em torno dos 60%. Para melhorar a qualidade de vida dos animais e a qualidade do veneno para a produção de imunobiológicos e desenvolvimento de fármacos, medidas profiláticas e sanitárias são adotadas em todas as fases da criação (quarentenas, salas de produção de veneno e sala de filhotes).

Ao nascimento, as serpentes são levadas à sala de filhotes (Figura 4.1) onde são mantidas em potes plásticos de 25 x 18 x 15 cm, forrados com papelão ondulado e com um pequeno prato de água (Figura 4.2). Esta sala mantém uma temperatura média entre 25° a 27 °C e umidade relativa em torno dos 60%. Sempre que necessário, os potes plásticos são limpos e a água trocada. Nesta sala os animais são alimentados, quinzenalmente, com filhotes de camundongos provenientes do Biotério Central do IB. As serpentes permanecem nesta sala até, aproximadamente, os três anos de idade, quando passam para as salas de produção de veneno (SPV)

Nas SPV (Figura 4.3), as serpentes são submetidas à extração de veneno mensalmente. Uma semana após a extração os animais são alimentados com camundongos (*Mus musculus*) ou ratos (*Rattus norvegicus*) adultos provenientes do Biotério Central do IB. Cada serpente recebe em média 10 a 20% do seu peso em alimentação. Este cuidado na alimentação é para evitar a obesidade, condição comum em serpentes superalimentadas mantidas em cativeiro.

As gaiolas, potes plásticos e a água são trocados sempre que necessário, lavados em salas apropriadas para a lavagem e desinfetados com hipoclorito de sódio a 4%. Anualmente todos os animais das SPV são vermifugados com ivermectina (0,2mg/Kg IM) e praziquantel (8mg/Kg IM).

Figura 4.1- Sala de filhotes no biotério de serpentes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2006

Figura 4.2- Pote plástico em que os filhotes de serpentes são mantidos até o segundo ano de idade no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2006

Figura 4.3- Sala de produção de veneno com gaiolas plásticas no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2006

Para diminuir a probabilidade de acidentes ofídicos com o extrator (pessoa que extrai o veneno das serpentes), evitar o desperdício de veneno e facilitar a extração do mesmo, os animais são colocados em ambientes saturados de CO_2 por, aproximadamente, 5 minutos. Com este procedimento os animais ficam sedados por um curto período de tempo, suficiente para realizar a extração de veneno e retornar o animal para a sua gaiola (Figura 4.4). Este procedimento é aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais no Instituto Butantan, sendo utilizado desde 1984.

O veneno é extraído em um becker de vidro imerso em banho de gelo, com uma cobertura plástica. A cada extração a cobertura plástica é trocada para evitar infecção entre as serpentes. Outra medida profilática é a desinfecção das presas com álcool iodado a 2%, logo após a extração, para evitar infecções bacterianas. Após a extração, o veneno é imediatamente submetido a um processamento laboratorial, quando é centrifugado e refrigerado a -20°C . Uma semana após a extração os animais são alimentados conforme descrito anteriormente.

Durante a rotina de extração de veneno é recomendada a permanência de, no mínimo, duas pessoas na sala: o extrator e um auxiliar, que pesa e registra o peso dos animais em fichas individuais e ajuda a segurar o terço final das serpentes, caso elas acordem repentinamente. No máximo são permitidas três pessoas na sala durante a extração de veneno; acima deste número a concentração do extrator pode diminuir, arriscando a segurança de todos.

Figura 4.4- Procedimentos utilizados na extração de veneno no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2006. **A:** Colocação do animal em recipiente saturado de CO_2 . **B:** Extração de veneno em Becker de vidro com cobertura plástica. **C:** Retorno do animal a sua gaiola, imediatamente após a extração de veneno. São Paulo, 2004

4.2 Animais

Neste estudo foram utilizados 30 animais nascidos em cativeiro no ano de 2000, pertencentes a oito ninhadas diferentes (Quadro 4.1), e que, no período do estudo, estavam com três anos de idade.

Procedências	Grupos Experimentais					
	A		B		C	
	Machos (n)	Fêmeas (n)	Machos (n)	Fêmeas (n)	Machos (n)	Fêmeas (n)
Caucaia do Alto – SP (1 ninhada)			01		02	02
Pomerode – SC (5 ninhadas)	04	03	04	03	02	01
São Bento do Sul – SC (1 ninhada)	03			02		02
São Paulo – SP (1 ninhada)					01	

Quadro 4.1- Origem das serpentes utilizadas neste experimento. São Paulo, 2004

Legenda: n = número de animais.

Estes animais foram divididos, aleatoriamente, em três grupos distintos:

Grupo A (Controle): formado por 10 serpentes (7 machos e 3 fêmeas) que continuaram sendo mantidas na sala de filhotes durante o período de estudo. Os animais deste grupo não foram submetidos ao processo de extração de veneno e foram mantidos em caixas de madeira medindo 25 x 35 x 15 cm, após o segundo ano de vida. A água era oferecida a vontade e a alimentação quinzenalmente.

Grupo B: neste grupo foram utilizadas 10 serpentes (5 machos e 5 fêmeas) que foram transferidas para uma sala de produção de veneno no início do experimento, em março/03. Estas serpentes eram alimentadas mensalmente, conforme o cronograma de extração. Este grupo não foi submetido à rotina de extração, mas tinha o seu manejo modificado em relação à sala de filhotes, pois como ficavam em uma sala de produção de veneno, uma vez por mês, presenciavam uma movimentação constante de pessoas na sala durante toda a parte da manhã. Outra mudança no manejo foi a troca do técnico responsável pela manutenção da sala, pois as salas possuíam responsáveis distintos.

Grupo C: neste grupo foram utilizadas 10 serpentes (5 machos e 5 fêmeas) que foram transferidas para a mesma sala de produção de veneno do Grupo B, em março/03. Este grupo, ao contrário do grupo anterior, foi submetido mensalmente à rotina de extração de veneno, passando pelos procedimentos descritos no item 4.1. Estas serpentes também foram

alimentadas uma vez por mês, conforme o cronograma de extração. Os grupos B e C foram alimentados no mesmo dia.

4.3 Colheita de material

Antes dos animais do experimento serem transferidos da sala de filhotes para a sala de produção de veneno, duas amostras de sangue foram retiradas de cada um dos animais dos 3 grupos, com um intervalo de, aproximadamente, 90 minutos entre elas. As amostras sanguíneas foram colhidas através da punção da veia coccigeana, com agulha 20 x 0,55mm e seringas descartáveis sem adição de anticoagulante, com o animal contido fisicamente em laço de Lutz (Figura 4.5).

Figura 4.5- Contenção física da serpente com laço de Lutz e punção da veia coccigeana, no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. São Paulo, 2004

A cada dois meses, durante um período de 12 meses de estudo, duas punções sanguíneas, perfazendo um total de 2mL, foram obtidas de cada animal dos três grupos, com intervalo de 90 minutos entre elas. As punções eram realizadas em até 120 segundos após a abertura da gaiola plástica e a contenção física do animal.

Após a primeira colheita de amostra sanguínea, os animais dos grupos A e B, depois de serem pesados, eram devolvidos as suas respectivas gaiolas, enquanto os animais do grupo C eram pesados e postos, individualmente, em recipientes saturados de CO₂ para serem submetidos à rotina de extração de veneno. Esta primeira amostragem sanguínea determinava os valores séricos dos hormônios esteróides sexuais e da corticosterona no primeiro procedimento de contenção física e, durante o experimento, foi chamada de procedimento de

contenção (PC). A segunda colheita de sangue, realizada 90 minutos após a primeira nos Grupos A e B, e 90 minutos após a extração de veneno no grupo C, determinava os níveis séricos destes hormônios no segundo procedimento de contenção física e/ou extração de veneno e foi denominada de procedimento de contenção e/ou extração (PCE).

Logo após a colheita de sangue extensões sanguíneas eram preparadas para a realização da contagem celular diferencial. Uma alíquota de sangue era acondicionada em tubo de ensaio plástico, sem anticoagulante, para a obtenção de soro para os ensaios hormonais e outra alíquota em tubo de ensaio plástico heparinizado, para realização dos exames hematológicos. As colheitas de sangue eram realizadas nas mesmas datas para os três grupos experimentais e sempre na parte da manhã.

4.4 Provas laboratoriais

4.4.1 Dosagens hormonais

As dosagens hormonais séricas de estradiol foram realizadas através da técnica de radioimunoensaio (RIE), utilizando-se o conjunto comercial diagnóstico com duplo anticorpo DSL® (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA). O princípio desta técnica baseia-se na reação antígeno-anticorpo, usando-se como competidor o hormônio a ser dosado, marcado com ^{125}I . Para dosagem de testosterona sérica utilizou-se a técnica de radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (COAT-A-A-COUNT, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) desenvolvido para avaliação quantitativa de testosterona no soro humano. Para dosagem de corticosterona foi utilizado conjunto diagnóstico comercial duplo Anticorpo (MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY, USA – antiga ICN).

Estes conjuntos diagnósticos utilizam como elemento traçador o hormônio marcado com ^{125}I e apresentam pouca reação cruzada com os precursores específicos para cada hormônio estudado. Todos os parâmetros de controle de qualidade dos ensaios hormonais foram analisados conforme rotina empregada no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH).

4.4.2 Validação dos conjuntos diagnósticos:

As validações dos conjuntos diagnósticos foram realizadas para o uso em soro de *B. jararaca*, através do método de paralelismo. Este método permite indicar se a matriz íntegra, onde estão os hormônios mensurados (soro sanguíneo), está interagindo com o anticorpo do conjunto diagnóstico de forma similar àquela dos hormônios usados como padrão, para isso foi utilizado um “pool” de amostras de baixa concentração hormonal (valores próximos aos limites inferiores da curva padrão). A esta amostra adicionamos valores conhecidos dos hormônios estudados, a fim de aproximá-los dos pontos da curva padrão fornecida pelo conjunto diagnóstico.

4.4.3 Hematologia:

Para acompanhar o estado geral dos animais durante o período de estudo e verificar a sua resposta hematológica frente aos agentes estressores, exames hematológicos foram realizados ao longo dos 12 meses de experimentação. Os exames realizados foram:

I. Volume Globular ou Hematócrito:

A determinação deste valor foi realizada pela sedimentação total dos glóbulos vermelhos através do processo do microhematócrito (BIRGEL, 1979). O volume de células aglutinadas foi lido em cartão de hematócrito.

II. Contagem Total de Eritrócitos:

Para a contagem total de eritrócitos, 20µL de sangue total heparinizado foram diluídos em 4,0 mL de diluente isotônico de Natt e Herrick (1952). Após a diluição, a solução foi utilizada para o preenchimento da Câmara de Neubauer e os eritrócitos, presentes em 5/25 casetas do retículo central, foram contados com o auxílio de microscópio de luz em aumento de 200 vezes. O número total de eritrócitos foi obtido pela fórmula: nº de eritrócitos x 100 x 10 x 5 e expresso em células/mm³.

III. Contagem total de leucócitos:

Para a contagem total de leucócitos, 20µL de sangue total heparinizado foram diluídos em 4,0 mL de diluente isotônico de Natt e Herrick (1952), sendo contadas as células dos 16 quadrados simples localizados nos cantos da Câmara de Neubauer. O número de leucócitos totais foi obtido pela fórmula: nº de leucócitos contados x 100 x 10 x 0,25 e expresso em células/mm³.

IV. Contagem total de trombócitos:

Para a contagem total de trombócitos, 20µL de sangue total heparinizado foram diluídos em 4,0 mL de diluente isotônico de Natt e Herrick (1952), sendo contadas as células dos 16 quadrados simples localizados nos cantos da Câmara de Neubauer. O número de trombócitos totais foi obtido pela fórmula: nº de trombócitos contados x 100 x 10 x 0,25 e expresso em células/mm³.

V. Determinação da concentração de hemoglobina:

A determinação da concentração de hemoglobina foi obtida através de leitura em espectrofotômetro, medida a 540nm, através da determinação colorimétrica da cianometahemoglobina (BIRGEL, 1979).

VI. Contagem diferencial de leucócitos:

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensão sanguínea corada com a solução May-Grunwald e Giemsa modificada por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) e observada com auxílio de microscópio de luz, com lente de imersão. Foram contados um total de 100 a 200 leucócitos/lâmina e os diferentes tipos de leucócitos foram anotados com auxílio de um contador digital múltiplo (Leucotron®).

4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism® versão 4.0 e GraphPad InStat® versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego Califórnia -

USA). Através do aplicativo Guided Data Analysis, as variáveis foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e à homocedasticidade. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformadas (logaritmo na base 10 – $\text{Log}_{10}X$) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se uma análise não paramétrica. Caso os dados obedecessem às premissas era realizada uma análise paramétrica.

Para analisar os dados entre machos e fêmeas foi utilizado o Teste t-student ou, quando necessário, o teste de Mann-Whitney. Para analisar as diferenças dentro do mesmo grupo, em diferentes datas, foi utilizado ANOVA com dados repetidos ou o Teste de Friedman. As diferenças entre os três grupos foram analisadas utilizando ANOVA (fator único) ou Kruskal-Wallis. Para a comparação múltipla de médias foram utilizados os Testes de Tukey ou o de Dunn. Para analisar os dados do PC e do PCE foram utilizados o teste t-student (para amostras independentes ou pareadas), o teste de Mann-Whitney (para duas amostras independentes) e o de Wilcoxon (para duas amostras pareadas).

Para avaliar a associação entre duas variáveis foi utilizada a análise da correlação linear simples, com cálculo do coeficiente de correlação (Pearson)

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e o erro-padrão dos valores médios (média $\pm$ erro padrão) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através de análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Validação dos conjuntos diagnósticos

Os valores das curvas obtidas a partir das diluições do hormônio marcado em “pool” de amostras de soro para estradiol, testosterona e corticosterona apresentaram alta e significativa correlação com as curvas padrões dos conjuntos diagnósticos (Gráficos 5.1, 5.2 e 5.3). Os valores de $r=R^2$ foram 0,99 para o estradiol sérico, 0,98 para a testosterona sérica e 0,99 para a corticosterona sérica. Nos três ensaios $p<0,008$.

Gráfico 5.1 – Representação gráfica da curva de regressão linear entre a curva formada pelas concentrações de um “pool” de amostras de soro em diluições sucessivas e a curva padrão do conjunto DSL® MedLab para dosagem de estradiol. São Paulo, 2006

Gráfico 5.2-Representação gráfica da curva de regressão linear entre a curva formada pelas concentrações de um “pool” de amostras de soro em diluições sucessivas e a curva padrão do conjunto diagnóstico da DPC® para dosagem de testosterona. São Paulo, 2006

Gráfico 5.3 - Representação gráfica da curva de regressão linear entre a curva formada pelas concentrações de um “pool” de amostras de soro em diluições sucessivas e a curva padrão do conjunto diagnóstico da MPBiomedicals® para dosagem de corticosterona. São Paulo, 2006

5.2 Controle de qualidade do radioimunoensaio

O controle de qualidade dos ensaios realizados para dosagem sérica de estradiol, testosterona e corticosterona baseou-se na análise dos coeficientes de variação intra- e inter-ensaio.

Para os ensaios séricos de estradiol todos os coeficientes de variação intra-ensaio foram inferiores a 11% e o inter-ensaio inferiores a 8%. A concentração mínima detectada foi de 0,38 pg/mL (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Controle de qualidade dos ensaios de estradiol em amostras de soro de *B. jararaca*. São Paulo, 2006

Ensaio	CPM	Cap.lig	L.N.E.	Sensibilidade	CV Intra baixo	CV Intra alto
	total	(B/B0)	(%)	% (dose)		
1	15131	80%	1,87	95,03 (0,38)	2,76%	6,16%
2	24097	48%	1,35	91,80 (0,75)	4,24%	3,75%
3	22317,5	49%	1,34	91,14 (0,55)	4,19%	10,24%
CV Inter ensaio					0,55%	7,11%

Para a testosterona sérica os coeficientes intra-ensaio não excederam 9,6% e o inter-ensaio 2,88%. A concentração mínima detectada foi de 0,01ng/dL (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Controle de qualidade dos ensaios de testosterona em amostras de soro de *B. jararaca*. São Paulo, 2006

Ensaio	CPM	Cap.lig	L.N.E.	Sensibilidade	CV Intra baixo	CV Intra alto
	total	(B/B0)	(%)	% (dose)		
1	47867	48%	0,34	96,9 (0,001)	9,6%	2,4%
2	38968	48%	0,36	94,9 (0,05)	3,0%	1,2%
3	37940,5	51%	0,53	95,9 (0,05)	4,1%	0,5%
CV Inter ensaio					2,88%	0,22%

Para a corticosterona sérica os coeficientes de variação intra-ensaio foram inferiores a 9,58% e o inter-ensaio inferiores a 4,09%. A concentração mínima detectada foi de 3,81 ng/mL (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Controle de qualidade dos ensaios de corticosterona em amostras de soro de *B. jararaca*. São Paulo, 2006

Ensaio	CPM	Cap.lig	L.N.E.	Sensibilidade	CV Intra baixo	CV Intra alto
	total	(B/B0)	(%)	% (dose)		
1	37191	54%	1,74	93,0 (4,32)	4,33%	5,38%
2	33835	54%	1,84	93,0 (3,81)	3,75%	2,88%
3	33779	54%	1,81	91,6 (3,63)	1,97%	3,12%
4	32835	54%	1,75	91,2 (7,05)	5,76%	6,26%
5	28599	59%	3,15	90,7 (6,00)	9,58%	7,63%
CV Inter ensaio					0,58%	4,09%

Todos os coeficientes de variação ficaram dentro do padrão esperado de até 15% (CHAARD, 1995) e confirmaram a qualidade dos ensaios realizados.

5.3 Resultados biométricos das serpentes

Em relação ao comprimento, verificamos que não houve diferenças estatísticas dentro dos grupos e nem entre os grupos, nas diferentes datas, mas houve diferenças estatísticas entre os machos e as fêmeas em todos os grupos experimentais, sendo as fêmeas sempre maiores. As médias e o erro padrão dos valores médios (EPM) do comprimento rostro-cloacal (CRC) dos machos e das fêmeas foram de 76,8 cm $\pm$ 1,5 cm e 104,0 cm $\pm$ 4,6 cm, respectivamente ($p < 0,0001$) no Grupo A; 86,1 cm $\pm$ 4,3 cm e 95,2 cm $\pm$ 3,6 cm, respectivamente ($p < 0,001$) no Grupo B e 87,4 cm $\pm$ 4,6 cm e 99,8 cm $\pm$ 3,0 cm, respectivamente ($p < 0,004$) no Grupo C.

Quanto ao peso, as fêmeas apresentaram valores maiores, estatisticamente significantes, em relação aos machos sendo, aproximadamente, três vezes mais pesadas (Tabela 5.4). As fêmeas do Grupo A não apresentaram diferenças estatísticas no peso ao longo do experimento, embora no gráfico 5.4 possa se perceber um aumento gradativo, chegando ao final com um aumento de, aproximadamente, 20% na média do peso inicial. As fêmeas do Grupo B apresentaram um aumento progressivo no peso, estatisticamente significativo a partir de setembro/03, com uma pequena queda em janeiro/2004; ao final do experimento estas fêmeas apresentaram um ganho de peso de 30% na média do seu peso inicial. As fêmeas do Grupo C apresentaram uma maior oscilação no peso durante o período de estudo, mas observamos um aumento estatístico em novembro/03 e março/04; estas fêmeas chegaram ao final do estudo com um aumento de 17% na média do seu peso inicial.

Comparando-se as fêmeas dos diferentes grupos experimentais, percebe-se que o perfil é muito parecido, havendo diferença estatística apenas no mês de novembro/03, quando houve uma queda na média do peso do Grupo A.

Os machos do Grupo A apresentaram um aumento significativo no peso a partir de setembro/03, chegando ao final do experimento com um acréscimo de 53% na média do peso inicial. Os machos dos Grupos B e C não apresentaram diferenças estatísticas no peso ao longo do experimento (Tabela 5.4).

Comparando-se os machos dos diferentes grupos experimentais percebe-se que os perfis dos Grupos B e C são muito parecidos (Gráfico 5.4), tendo ambos se diferenciado estatisticamente do Grupo A nos meses de janeiro/04 e março/04, embora, graficamente, se perceba esta diferença a partir de setembro/03.

Durante o período de estudo, todos os animais se alimentaram normalmente.

Tabela 5.4 - Valores médios do peso (g) de fêmeas e machos dos Grupos A, B e C, com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Data	Peso médio das fêmeas $\pm$ EPM			Peso médio dos machos $\pm$ EPM		
	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Março/2003	282 $\pm$ 33	286 $\pm$ 26 ^a	305 $\pm$ 46 ^a	94 $\pm$ 4 ^a	97 $\pm$ 7	101 $\pm$ 14
Maio/2003	292 $\pm$ 36	306 $\pm$ 36 ^{ab}	316 $\pm$ 44 ^{ab}	91 $\pm$ 3 ^a	87 $\pm$ 6	93 $\pm$ 13
Julho/2003	307 $\pm$ 47	330 $\pm$ 42 ^{ab}	341 $\pm$ 43 ^{ab}	104 $\pm$ 5 ^{ab}	88 $\pm$ 3	95 $\pm$ 11
Setembro/2003	320 $\pm$ 46	348 $\pm$ 39 ^b	329 $\pm$ 48 ^{ab}	117 $\pm$ 10 ^b	89 $\pm$ 3	91 $\pm$ 12
Novembro/2003	303 $\pm$ 47 ^{**}	370 $\pm$ 36 ^{*b}	356 $\pm$ 51 ^{*b}	123 $\pm$ 7 ^b	94 $\pm$ 4	101 $\pm$ 12
Janeiro/2004	336 $\pm$ 68	341 $\pm$ 32 ^b	336 $\pm$ 48 ^{ab}	150 $\pm$ 8 ^{c**}	94 $\pm$ 6 [*]	93 $\pm$ 9 [*]
Março/2004	340 $\pm$ 89	369 $\pm$ 46 ^b	357 $\pm$ 48 ^b	144 $\pm$ 12 ^{c**}	86 $\pm$ 7 [*]	89 $\pm$ 12 [*]

Legenda: EPM (erro padrão dos valores médios). Letras diferentes significam diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo. Diferenças significantes entre os grupos de mesmo sexo estão assinaladas com asterisco (*).

Gráfico 5.4- Representação gráfica dos valores médios dos pesos de machos e fêmeas dos Grupos A, B e C. São Paulo, 2004

5.4 Resultados hematológicos

Os resultados hematológicos das fêmeas e dos machos dos Grupos A, B e C estão apresentados nas tabelas 5.5, 5.6 e 5.7, respectivamente. Os resultados totais (machos e fêmeas somados) dos diferentes grupos estão apresentados nas tabelas 5.8, 5.9 e 5.10.

Nas comparações entre machos e fêmeas observamos diferenças estatísticas em alguns parâmetros hematológicos como: número de eritrócitos/mm³, número de leucócitos/mm³, hematócrito e hemoglobina. No Grupo B as fêmeas apresentaram valores mais altos de eritrócitos no final do experimento do que os machos. Em relação aos leucócitos, observamos diferenças no Grupo B, no mês de janeiro/04, com as fêmeas apresentando valores mais baixos e no Grupo C, nos meses de novembro/03 e janeiro/04, com os machos apresentando valores mais baixos em novembro e mais altos em janeiro. As fêmeas apresentaram maiores índices de hemoglobina nos meses de julho/03 (Grupos B e C), em setembro/03 no Grupo B e em janeiro/04 no Grupo C; e também apresentaram valores mais elevados no hematócrito no Grupo A em maio/03, no B nos meses de setembro/03 e março/04; e no C em julho/03.

Em relação à contagem total de eritrócitos (Gráficos 5.5 e 5.6), as fêmeas e machos do Grupo A apresentaram um perfil semelhante, onde observamos uma queda gradativa nos valores de julho/03 a novembro/04. Nos Grupos B e C, ambos os sexos também se comportaram de maneira similar, apresentando uma diminuição estatística significativa apenas no final do experimento, quando comparado aos valores iniciais.

Gráfico 5.5- Variação anual da média do nº de eritrócitos x 10³/mm³ dos machos dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004

Gráfico 5.6 - Variação anual da média do nº de eritrócitos x 10³/mm³ das fêmeas dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos. São Paulo, 2004

Tabela 5.5 - Valores hematológicos médios dos machos e das fêmeas do Grupo A com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM).
São Paulo, 2004

Parâmetros Hematológicos	Março /2003		Maio /2003		Julho/2003		Setembro/2003		Novembro/2003		Janeiro/2004		Março/2004	
	média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM	
	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas
CTE (10 ³ céls/mm ³)	623 ± 46	577 ± 102	498 ± 64	737 ± 158	427 ± 37	610 ± 165	320 ± 19	453 ± 105	326 ± 64	347 ± 54	398 ± 37	497 ± 99	428 ± 49	460 ± 116
CTL (10 ³ céls/ mm ³)	10,8 ± 1,8	6,0 ± 1,0	9,9 ± 0,7	5,3 ± 3,0	8,3 ± 2,0	5,3 ± 1,4	15,9 ± 1,6	13,0 ± 0,3	8,1 ± 1,1	5,8 ± 2,7	7,7 ± 0,6	8,7 ± 2,2	4,8 ± 0,9	5,3 ± 3,1
CTT (10 ³ céls/ mm ³)	10,3 ± 2,4	7,2 ± 2,0	11,4 ± 2,1	9,5 ± 4,0	10,6 ± 2,1	12,0 ± 4,0	24,1 ± 2,1	14,7 ± 1,1	7,3 ± 1,2	7,7 ± 1,9	6,9 ± 2,1	7,7 ± 2,3	7,2 ± 1,1	8,2 ± 1,7
HGB (g/dL)	7,6 ± 1,3	8,6 ± 2,1	6,2 ± 0,2	7,2 ± 1,7	6,6 ± 0,5	7,0 ± 1,0	5,6 ± 0,4	6,6 ± 1,0	*	*	5,0 ± 0,2	6,4 ± 1,0	5,8 ± 0,5	6,9 ± 1,1
HT (%)	22 ± 1	27 ± 4	19 ± 2 ^a	27 ± 2 ^b	18 ± 1	22 ± 3	16 ± 1	18 ± 3	19 ± 2	24 ± 2	21 ± 2	26 ± 2	20 ± 1	25 ± 3
VCM (fL)	351 ± 19	474 ± 21	401 ± 46	395 ± 76	434 ± 20	396 ± 66	502 ± 36	413 ± 19	768 ± 152	715 ± 110	531 ± 63	558 ± 126	509 ± 71	584 ± 85
HCM (pg)	126 ± 27	145 ± 12	137 ± 16	101 ± 16	156 ± 14,4	124 ± 18	178 ± 11	150 ± 8	*	*	124 ± 7,8	133 ± 21	143 ± 16,7	158 ± 18
CHCM (g/dL)	38,4 ± 10	31,0 ± 3	34,9 ± 3	26 ± 5	36,2 ± 1	32,0 ± 1	35,6 ± 1	36,0 ± 1	*	*	23,7 ± 1	25,0 ± 2	28,3 ± 0,7	27,0 ± 1
HD %	3,7 ± 1,8	7,0 ± 6	1,7 ± 0,7	2,0 ± 1,2	1,7 ± 1,0	1,0 ± 1,0	3,0 ± 1,6	2,3 ± 1,4	1,5 ± 0,6	4,3 ± 2,0	4,6 ± 1,3	9,3 ± 3,5	2,1 ± 0,9	0,5 ± 0,5
HI %	5,0 ± 1,4	7,7 ± 7,7	1,0 ± 0,4	3,0 ± 1,5	1,8 ± 1,0	8,0 ± 2,6	6,3 ± 3,5	4,7 ± 0,9	0,8 ± 0,8	0,7 ± 0,7	4,3 ± 1,6	11,3 ± 1,8	2,0 ± 0,4	0,5 ± 0,5
A %	2,3 ± 0,3	9,7 ± 7,7	1,3 ± 0,2	24,3 ± 7,9	0,7 ± 0,1	14,7 ± 3,5	1,5 ± 0,3	8,3 ± 6,4	0,4 ± 0,1	9,7 ± 5,7	1,1 ± 0,4	23 ± 7,5	0,6 ± 0,2	4,5 ± 3,5
B %	1,8 ± 0,4	5,7 ± 2,3	1,8 ± 0,3	8,7 ± 2,9	0,6 ± 0,1	8,3 ± 5,9	2,1 ± 0,3	4,3 ± 1,2	0,7 ± 0,1	3,0 ± 0,6	1,2 ± 0,3	7,0 ± 2,1	0,8 ± 0,2	4,5 ± 3,5
L %	51 ± 6	70 ± 24	66 ± 4	63 ± 8	82 ± 3	68 ± 10	65 ± 7	80 ± 9	82 ± 3	82 ± 7	59 ± 8	49 ± 10	67 ± 5	90 ± 7

CTE (contagem total de eritrócitos), CTL (contagem total de leucócitos), CTT (conagem total de trombócitos), HGB (Hemoglobina), Ht (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), HD (heterófilos degranulados), HI (heterófilos intactos), A (Azurofilos), B (basófilos) e L (linfócitos). * Dosagem de hemoglobina não foi realizada. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre machos e fêmeas nas mesmas datas.

Tabela 5.6 - Valores hematológicos médios dos machos e das fêmeas do Grupo B com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM).
São Paulo, 2004

Parâmetros Hematológicos	Março /2003		Maio /2003		Julho/2003		Setembro/2003		Novembro/2003		Janeiro/2004		Março/2004	
	média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM	
	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas
CTE (10 ³ céls/mm ³)	630 ± 42	702 ± 124	534 ± 54	662 ± 93	576 ± 27	534 ± 95	502 ± 42	674 ± 69	530 ± 86	774 ± 121	504 ± 57	562 ± 89	392 ± 15 ^a	620 ± 87 ^b
CTL (10 ³ céls/ mm ³)	7,6 ± 2,0	5,6 ± 1,3	14,2 ± 1,9	9,3 ± 2,5	6,2 ± 1,1	4,6 ± 0,9	10 ± 0,9	8,1 ± 1,1	8,9 ± 2,2	8,0 ± 1,2	10,3 ± 1,1 ^a	6,0 ± 0,8 ^b	6,7 ± 2,0	7,6 ± 2,4
CTT (10 ³ céls/ mm ³)	6,9 ± 2,2	8,5 ± 2,0	10,1 ± 2,5	7,2 ± 1,7	12,4 ± 3,0	7,0 ± 0,9	6,7 ± 1,2	6,7 ± 1,1	6,7 ± 1,1	8,9 ± 2,5	7,2 ± 1,5	6,4 ± 0,9	5,4 ± 1,5	6,9 ± 1,2
HGB (g/dL)	5,4 ± 0,5	8,6 ± 2	5,1 ± 0,4	7,2 ± 2	5,5 ± 0,1 ^a	7,0 ± 1 ^b	5,2 ± 0,3 ^a	6,6 ± 1 ^b	*	*	6,2 ± 1,4	5,6 ± 1	10,1 ± 6,2	6,0 ± 0,4
HT (%)	22 ± 2	25 ± 2	18 ± 1	23 ± 3	17 ± 1	22 ± 3	17 ± 1 ^a	24 ± 2 ^b	20 ± 2	26 ± 2	21 ± 1	27 ± 2	15 ± 2 ^a	24 ± 2 ^b
VCM (fL)	346 ± 32	386 ± 41	342 ± 23	364 ± 28	311 ± 31	451 ± 81	336 ± 23	383 ± 61	403 ± 59	364 ± 46	430 ± 51	551 ± 148	384 ± 39	396 ± 36
HCM (pg)	86 ± 7	111 ± 15	99 ± 9	100 ± 12	95 ± 6	145 ± 19	106 ± 9	108 ± 15	*	*	124 ± 25	137 ± 34	255 ± 154	101 ± 10
CHCM (g/dL)	25 ± 1	28 ± 1	29 ± 1	28 ± 3	32 ± 2	34 ± 3	32 ± 2	29 ± 1	*	32 ± 10	30 ± 7	25 ± 1	26 ± 2	25 ± 0,4
HD %	7 ± 3	6,5 ± 3	3 ± 1	1 ± 0,6	7 ± 3	4 ± 2	8 ± 5	3 ± 1	12 ± 5	6 ± 2	18 ± 6	5 ± 2	9 ± 6	4 ± 0,5
HI %	8 ± 3	5 ± 3	0,2 ± 0,2	4 ± 3	6 ± 1	1 ± 0,4	4 ± 2	2 ± 1	4 ± 3	2 ± 0,7	5 ± 1	2 ± 1	3 ± 1	2,4 ± 1
A %	17 ± 1	9 ± 2	16 ± 4	6 ± 2	15 ± 3	10 ± 2	12 ± 2	12 ± 2	13 ± 3	7 ± 1	26 ± 8	23 ± 6	10 ± 5	12 ± 3
B %	20 ± 3	23 ± 6	10 ± 4	9 ± 2	13 ± 2	13 ± 3	11 ± 3	7 ± 1	9 ± 2	11 ± 1	10 ± 3	11 ± 4	5 ± 1	8 ± 2
L %	45 ± 7	56 ± 7	71 ± 6	82 ± 2	59 ± 8	73 ± 3	65 ± 7	76 ± 4	62 ± 8	74 ± 3	41 ± 10	58 ± 10	72 ± 8	74 ± 5

CTE (contagem total de eritrócitos), CTL (contagem total de leucócitos), CTT (conagem total de trombócitos), HGB (Hemoglobina), Ht (hematócrito), VCM (volume corpúscular médio), HCM (hemoglobina corpúscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpúscular média), HD (heterófilos degranulados), HI (heterófilos intactos), A (Azurofilos), B (basófilos) e L (linfócitos). * Dosagem de hemoglobina não foi realizada. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre machos e fêmeas nas mesmas datas.

Tabela 5.7 - Valores hematológicos médios dos machos e das fêmeas do Grupo C com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM).
São Paulo, 2004

Parâmetros Hematológicos	Março /2003		Maio /2003		Julho/2003		Setembro/2003		Novembro/2003		Janeiro/2004		Março/2004	
	média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM		média ± EPM	
	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas
CTE (10 ³ céls/mm ³)	438 ± 93	672 ± 118	512 ± 114	636 ± 51	428 ± 55	550 ± 82	460 ± 60	482 ± 100	512 ± 144	534 ± 74	232 ± 104	468 ± 104	354 ± 44	510 ± 78
CTL (10 ³ céls/ mm ³)	9,4 ± 2,1	7,6 ± 1,4	14,9 ± 4,0	13,3 ± 1,6	12,5 ± 3,4	8,0 ± 2,6	14,1 ± 2,0	13,1 ± 1,4	9,6 ± 1,5 ^a	16,0 ± 1,2 ^b	12,0 ± 1,5 ^a	6,2 ± 0,4 ^b	4,5 ± 0,8	7,0 ± 1,1
CTT (10 ³ céls/ mm ³)	10,0 ± 3,3	8,4 ± 2,1	14,1 ± 3,6	9,7 ± 1,6	17,0 ± 2,8	14,7 ± 3,2	13,7 ± 1,3	9,6 ± 1,7	9,9 ± 1,7	15,1 ± 4,4	13,7 ± 3,8	10,5 ± 2,8	6,1 ± 1,6	6,9 ± 6,0
HGB (g/dL)	5,9 ± 1,2	6,8 ± 0,5	5,6 ± 0,8	8,3 ± 0,9	4,9 ± 0,6 ^a	7,4 ± 0,8 ^b	5,6 ± 0,4	8,1 ± 2,6	*	*	2,9 ± 0,4 ^a	5,6 ± 0,7 ^b	3,7 ± 0,7	5,2 ± 0,5
HT (%)	17 ± 2	26 ± 4	17 ± 2	26 ± 2	16 ± 1 ^a	24 ± 2 ^b	17 ± 1	21 ± 4	18 ± 1	23 ± 1	15 ± 2	22 ± 2	15 ± 3	20 ± 2
VCM (fL)	484 ± 107	404 ± 50	394 ± 100	412 ± 21	393 ± 31	471 ± 54	401 ± 61	435 ± 18	512 ± 244	473 ± 70	462 ± 54	534 ± 86	427 ± 46	410 ± 52
HCM (pg)	139 ± 27	116 ± 21	123 ± 27	132 ± 9	119 ± 18	144 ± 18	107 ± 15	181 ± 60	*	*	324 ± 201	134 ± 20	105 ± 14	105 ± 9
CHCM (g/dL)	30 ± 5	28 ± 2	32 ± 2	32 ± 1	31 ± 4	30 ± 1	27 ± 1	43 ± 15	*	*	19 ± 0,4	25 ± 0,5	24 ± 1	26 ± 1
HD %	3 ± 2	6 ± 3	4 ± 3	2 ± 0,5	2 ± 2	3 ± 1	8 ± 3	5 ± 1	6 ± 3	4 ± 2	8 ± 2	2 ± 0,7	3 ± 2	2 ± 1
HI %	8 ± 7	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 2	2 ± 1	1 ± 0,7	2 ± 1	3 ± 3	0,6 ± 0,6	5 ± 3	5 ± 2	2 ± 1	7 ± 5
A %	13 ± 5	12 ± 3	25 ± 6	14 ± 4	10 ± 6	14 ± 4	19 ± 3	9 ± 1	21 ± 4	9 ± 2	27 ± 9	21 ± 6	22 ± 4	23 ± 7
B %	6 ± 1	10 ± 5	15 ± 1	8 ± 5	5 ± 2	6 ± 1	4 ± 1	5 ± 2	5 ± 2	3 ± 0,6	3 ± 1	5,2 ± 0,5	7 ± 1	6,7 ± 2
L %	68 ± 14	69 ± 7	55 ± 9	73 ± 7	79 ± 7	75 ± 3	68 ± 3	79 ± 3	64 ± 7	81 ± 3	57 ± 9	67 ± 6	66 ± 4	58 ± 13

CTE (contagem total de eritrócitos), CTL (contagem total de leucócitos), CTT (conagem total de trombócitos), HGB (Hemoglobina), Ht (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), HD (heterófilos degranulados), HI (heterófilos intactos), A (Azurofilos), B (basófilos) e L (linfócitos). * Dosagem de hemoglobina não foi realizada. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre machos e fêmeas nas mesmas datas.

Tabela 5.8. Valores hematológicos médios do Grupo A com erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Parâmetros Hematológicos	Março /2003 Média ± EPM	Maio /2003 Média ± EPM	Julho/2003 Média ± EPM	Setembro/2003 Média ± EPM	Novembro/2003 Média ± EPM	Janeiro/2004 Média ± EPM	Março/2004 Média ± EPM
CTE (10 ³ céls/mm ³)	609 ± 41 ^a	570 ± 70 ^a	482 ± 57 ^{ab}	360 ± 36 ^b	359 ± 42 ^b	435 ± 42 ^{ab}	439 ± 46 ^{ab}
CTL (10 ³ céls/ mm ³)	9 ± 1 ^{a,c}	10 ± 1 ^{a,b}	7 ± 1,4 ^{a,c}	15 ± 1 ^b	7 ± 1 ^{a,c}	8 ± 0,8 ^{a,c}	5 – 1 ^c
CTT (10 ³ céls/ mm ³)	9 ± 2 ^a	11 ± 2 ^a	11 ± 2 ^a	21 ± 2 ^b	7 ± 0,9 ^a	7 ± 1 ^a	7 ± 0,8 ^a
HGB (g/dL)	8 ± 1 ^a	6 ± 0,5 ^a	7 ± 0,4 ^a	6 ± 0,4 ^a	*	5 ± 0,4 ^a	6 ± 0,5 ^a
HT (%)	23 ± 2 ^a	21 ± 2 ^a	19 ± 1 ^a	17 ± 1 ^b	20 ± 1 ^{a,b}	23 ± 1 ^{a,b}	22 ± 2 ^{a,b}
VCM (fL)	388 ± 24 ^a	399 ± 37 ^a	422 ± 22 ^a	475 ± 28 ^{a,b}	752 ± 108 ^b	541 ± 56 ^{a,b}	534 ± 54 ^{a,b}
HCM (pg)	132 ± 19 ^a	126 ± 13 ^a	146 ± 7 ^a	169 ± 9 ^a	*	127 ± 8 ^a	147 ± 12 ^a
CHCM (g/dL)	36 ± 7 ^{a,b}	32 ± 3 ^{a,b}	35 ± 1 ^a	36 ± 0,7 ^a	*	24 ± 1 ^b	28 ± 0,5 ^{a,b}
HD %	5 ± 2 ^{a,b}	6 ± 0,5 ^{a,b}	1 ± 0,7 ^a	3 ± 1 ^{a,b}	2 ± 0,8 ^{a,b}	6 ± 1 ^{a,b}	2 ± 0,7 ^b
HI %	6 ± 2 ^a	1 ± 0,7 ^a	4 ± 1 ^a	6 ± 2 ^a	1 ± 0,6 ^a	6 ± 2 ^a	2 ± 0,4 ^a
A %	19 ± 4 ^a	16 ± 3 ^a	10 ± 1 ^a	10 ± 3 ^a	7 ± 2 ^a	19 ± 4 ^a	11 ± 2 ^a
B %	13 ± 2 ^a	15 ± 3 ^a	7 ± 2 ^a	11 ± 2 ^a	7 ± 2 ^a	12 ± 2 ^a	13 ± 3 ^a
L %	57 ± 8 ^a	65 ± 3 ^a	78 ± 4 ^a	70 ± 6 ^a	82 ± 3 ^a	56 ± 7 ^a	72 ± 5 ^a

CTE (contagem total de eritrócitos), CTL (contagem total de leucócitos), CTT (contagem total de trombócitos), HGB (Hemoglobina), Ht (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), HD (heterófilos degranulados), HI (heterófilos intactos), A (Azurofilos), B (basófilos) e L (linfócitos). * Dosagem de hemoglobina não foi realizada. Letras diferentes significam diferenças estatísticas no parâmetro hematológico nas diversas datas.

Tabela 5.9. Valores hematológicos médios do Grupo B com erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Parâmetros Hematológicos	Março /2003 Média ± EPM	Maio /2003 Média ± EPM	Julho/2003 Média ± EPM	Setembro/2003 Média ± EPM	Novembro/2003 Média ± EPM	Janeiro/2004 Média ± EPM	Março/2004 Média ± EPM
CTL (10 ³ céls/ mm ³)	7 ± 1 ^a	12 ± 2 ^b	5 ± 1 ^a	9 ± 1 ^{ab}	8 ± 1 ^{ab}	8 ± 10 ^{ab}	7 ± 1 ^{ab}
CTT (10 ³ céls/ mm ³)	7 ± 1 ^a	8 ± 1 ^a	10 ± 2 ^a	6 ± 1 ^a	8 ± 1 ^a	7 ± 1 ^a	6 ± 1 ^a
HGB (g/dL)	6 ± 0,5 ^a	6 ± 0,5 ^a	6 ± 0,4 ^a	6 ± 0,4 ^a	*	6 ± 1 ^a	8 ± 3 ^a
HT (%)	23 ± 1 ^{ac}	21 ± 2 ^{abc}	20 ± 2 ^{ab}	20 ± 2 ^{abc}	23 ± 2 ^{abc}	24 ± 2 ^c	19 ± 2 ^b
VCM (fL)	366 ± 26 ^a	353 ± 17 ^a	389 ± 51 ^a	359 ± 32 ^a	383 ± 36 ^a	491 ± 77 ^a	390 ± 25 ^a
HCM (pg)	99 ± 9 ^a	99 ± 7 ^a	125 ± 13 ^a	107 ± 8 ^a	*	130 ± 20	178 ± 77 ^a
CHCM (g/dL)	27 ± 1 ^a	28 ± 2 ^a	33 ± 2 ^a	30 ± 1 ^a	*	28 ± 3 ^a	52 ± 26 ^a
HD %	6 ± 2 ^a	2 ± 0,6 ^a	5 ± 2 ^a	2 ± 3 ^a	9 ± 3 ^a	11 ± 3 ^a	6 ± 3 ^a
HI %	7 ± 2 ^a	2 ± 1 ^a	3 ± 1 ^a	5 ± 1 ^a	3 ± 1 ^a	3 ± 1 ^a	3 - 1 ^a
A %	13 ± 2 ^a	11 ± 3 ^a	12 ± 2 ^a	12 ± 1 ^a	10 ± 2 ^a	24 ± 4 ^a	11 ± 3 ^a
B %	21 ± 3 ^a	10 ± 2 ^b	13 ± 2 ^b	9 - 2 ^b	10 ± 1 ^b	10 ± 2 ^b	7 ± 1 ^b
L %	50 ± 5 ^{a,c}	76 ± 4 ^b	66 ± 5 ^{abc}	70 ± 4 ^b	68 ± 5 ^{abc}	50 ± 7 ^c	73 ± 4 ^a

CTE (contagem total de eritrócitos), CTL (contagem total de leucócitos), CTT (conagem total de trombócitos), HGB (Hemoglobina), Ht (hematócrito), VCM (volume corpulcular médio), HCM (hemoglobina corpulcular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpulcular media), HD (heterófilos degranulados), HI (heterófilos intactos), A (Azurofilos), B (basófilos) and L (linfócitos). * Dosagem de hemoglobina não foi realizada. Letras diferentes significam diferenças estatísticas no parâmetro hematológico nas diversas datas.

Tabela 5.10. Valores Hematológicos médios do Grupo C com erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Parâmetros Hematológicos	Março /2003 Média ± EPM	Maio /2003 Média ± EPM	Julho/2003 Média ± EPM	Setembro/2003 Média ± EPM	Novembro/2003 Média ± EPM	Janeiro/2004 Média ± EPM	Março/2004 Média ± EPM
CTE (10 ³ céls/mm ³)	555 ± 8 ^a	574 ± 62 ^a	505 ± 53 ^a	471 ± 55 ^a	524 ± 70 ^a	393 ± 70 ^a	423 ± 54 ^a
CTL (10 ³ céls/ mm ³)	8 ± 1 ^{ab}	14 ± 2 ^a	11 ± 2 ^{ab}	14 ± 1 ^a	13 ± 1 ^a	9 ± 1 ^{ab}	6 ± 1 ^b
CTT (10 ³ céls/ mm ³)	9 ± 2 ^{ab}	12 ± 2 ^{ab}	16 ± 2 ^a	12 ± 1 ^{ab}	13 ± 3 ^{ab}	12 ± 2 ^{ab}	6 ± 1 ^b
HGB (g/dL)	6 ± 1 ^a	7 ± 1 ^a	6 ± 1 ^a	6 ± 1 ^a	*	4 ± 1 ^a	4 ± 0,5 ^a
HT (%)	21 ± 2 ^a	22 ± 2 ^a	21 ± 2 ^a	19 ± 2 ^a	21 ± 1 ^a	19 ± 2 ^a	17 ± 2 ^a
VCM (fL)	444 ± 57 ^a	403 ± 48 ^a	431 ± 36 ^a	418 ± 31 ^a	435 ± 95 ^a	562 ± 81 ^a	420 ± 32 ^a
HCM (pg)	127 ± 16 ^a	127 ± 13 ^a	127 ± 13 ^a	144 ± 32 ^a	*	115 ± 14 ^a	105 ± 8 ^a
CHCM (g/dL)	29 ± 3 ^a	32 ± 1 ^a	3 ± 2 ^a	35 ± 8 ^a	*	23 ± 1 ^a	25 ± 1 ^a
HD %	5 ± 2 ^a	3 ± 1 ^a	3 ± 1 ^a	6 ± 1 ^a	6 ± 2 ^a	4 ± 1 ^a	2 ± 1 ^a
HI %	5 ± 3 ^a	2 ± 1 ^a	3 ± 1 ^a	1 ± 1 ^a	2 ± 2 ^a	5 ± 1 ^a	4 ± 2 ^a
A %	13 ± 3 ^a	19 ± 4 ^a	12 ± 4 ^a	14 ± 2 ^a	15 ± 3 ^a	23 ± 5 ^a	22 ± 4 ^a
B %	8 ± 3 ^a	12 ± 2 ^a	5 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a	4 ± 1 ^a	7 ± 1 ^a
L %	69 ± 7 ^a	64 ± 6 ^a	77 ± 4 ^a	74 ± 3 ^a	73 ± 5 ^a	63 ± 5 ^a	63 ± 6 ^a

CTE (contagem total de eritrócitos), CTL (contagem total de leucócitos), CTT (contagem total de trombócitos), HGB (Hemoglobina), Ht (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), HD (heterófilos degranulados), HI (heterófilos intactos), A (Azurofilos), B (basófilos) and L (linfócitos). * Dosagem de hemoglobina não foi realizada. Letras diferentes significam diferenças estatísticas no parâmetro hematológico nas diversas datas.

Comparando-se os diferentes grupos, machos e fêmeas separadamente, observamos que entre as fêmeas dos três grupos não houve diferenças estatísticas quanto ao valor da hemoglobina e do hematócrito, mas observamos diferenças significantes em relação ao número de eritrócitos (Gráfico 5.6) e ao de leucócitos no mês de novembro/03, quando a média do Grupo A sofreu uma queda e a média do Grupo C apresentou um aumento, respectivamente (Gráfico 5.7).

Em relação aos machos, os Grupos A e B iniciaram o experimento com valores mais altos de eritrócitos, mas em setembro/03 o Grupo A teve uma diminuição significativa, se diferenciando dos demais grupos. Neste mesma data, o número de leucócitos e o valor da hemoglobina estavam mais altos no Grupo A do que no B. Em janeiro/04 observamos uma diferença no número de leucócitos entre os Grupos B e C, com valores mais altos para o último grupo (Gráfico 5.8).

Gráfico 5.7- Variação anual da média do nº de leucócitos x 10³/mm³ das fêmeas dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. Letras diferentes significam diferenças estatísticas, nas mesmas datas, entre os grupos. São Paulo, 2004

Gráfico 5.8- Variação anual da média do nº de leucócitos x 10³/mm³ dos machos dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004

Nos demais parâmetros hematológicos não foram detectadas diferenças significantes entre os machos e as fêmeas, sendo que as análises estatísticas foram realizadas com o número total de animais que compunha cada grupo.

Considerando-se os resultados totais para cada grupo, observou-se que no Grupo A houve uma aumento estatístico no número de trombócitos em setembro/03, quando comparados ao início do experimento. Nem no Grupo B e nem no Grupo C houve diferenças estatísticas quanto ao número de trombócitos (Gráfico 5.9).

Gráfico 5.9 - Variação anual da média do nº de trombócitos/mm³ dos animais dos Grupos A, B e C. Diferenças estatísticas entre os grupos, nas mesmas datas, estão representadas por letras diferentes. São Paulo, 2004

Na contagem específica de leucócitos o Grupo A apresentou uma pequena queda na porcentagem de heterófilos degranulados em julho/03 e novembro/03 (Gráfico 5.10) e um aumento nos linfócitos no mês de novembro/03 (Gráfico 5.11). O Grupo B apresentou um aumento significativo no número de linfócitos nos meses de maio/03 e março/04, um aumento estatístico na porcentagem de azurófilos em janeiro/04 (Gráfico 5.12) e uma queda gradativa na porcentagem de basófilos em relação ao início do experimento (Gráfico 5.13). No Grupo C, ao contrário do Grupo B, houve um aumento significativo na porcentagem de basófilos no mês de maio/03.

Comparando-se os dados dos três grupos, observa-se que os Grupos B e C apresentaram um perfil anual semelhante na contagem total de trombócitos, conquanto existam algumas diferenças estatísticas em alguns meses, conforme pode ser verificado no gráfico 5.9. O Grupo A se diferenciou dos demais grupos, principalmente no mês de setembro, onde verificou-se um aumento no número de trombócitos.

Comparando-se os três grupos, em relação à contagem específica de leucócitos, não detectamos diferenças significantes quanto aos heterófilos degranulados (Hd) (Gráfico 5.10), linfócitos (Gráfico 5.11), azurófilos (Gráfico 5.12) e heterófilos íntegros (Hi) (Gráfico 5.14). Entre os Grupos B e C encontramos diferenças estatísticas na porcentagem de basófilos nos meses de março/03, julho/03 e novembro/03, sendo que o Grupo B apresentou os maiores valores (Gráfico 5.13).

Gráfico 5.10- Variação anual da porcentagem de heterófilos degranulados dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004

Gráfico 5.11- Variação anual da porcentagem de linfócitos dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004

Gráfico 5.12- Variação anual da porcentagem de azurófilos dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004

Gráfico 5.13- Variação anual da porcentagem de basófilos dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre os grupos, nas mesmas datas. São Paulo, 2004

Gráfico 5.14- Variação anual da porcentagem de heterófilos íntegros dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004

A presença de eritrócitos imaturos na circulação sanguínea foi uma constante durante o período de estudo nos animais dos três grupos (Figura 5.1).

Figura 5.1- Presença de hemácia imatura (seta branca) ao lado de um azurófilo (seta preta) em extensão sanguínea de *B.jararaca*, corada com solução May-Grunwald e Giemsa modificado por Rosenfeld, visualizada em microscópio de luz em aumento de 1000x

Nos três grupos experimentais foram analisadas as correlações entre a porcentagem de linfócitos e a de Hd, Hi e a soma dos dois tipos de heterófilos. Nos grupos A e B encontramos correlações negativas significantes e de média intensidade entre a porcentagem de linfócitos e a dos diferentes tipos de heterófilos, enquanto no Grupo C a correlação entre a porcentagem dos linfócitos e a dos Hd não foi significativa.

Os perfis das relações Hd/linfócito e Hi/linfócito foram semelhantes nos Grupos A e B, onde podemos perceber uma queda em maio/03 e um aumento gradativo até o mês de janeiro/04 para novamente sofrer uma queda em março/04 (Gráfico 5.15). Os valores do Grupo B foram sempre mais elevados do que os do Grupo A na relação Hd/linfócito. O Grupo C apresentou uma relação Hd/linfócito mais baixa do que os demais grupos e, praticamente, constante durante todo o período de estudo, enquanto a relação Hi/linfócito acompanhou o perfil dos Grupos A e B. Diferenças estatísticas foram observadas, quanto à relação Hd/linfócito, no mês de novembro entre os Grupos A e B, e no mês de janeiro/03 entre os Grupos B e C. Quanto à relação Hi/linfócito, foram observadas diferenças significantes entre os Grupos A e C nos meses de setembro/03 e de março/04.

Gráfico 5.15- Variação anual das relações heterófilo degranulado/linfócito e heterófilo intacto/linfócito dos animais dos Grupos A, B e C, com seus respectivos EPM. São Paulo, 2004

5.5 Resultados dos níveis de testosterona sérica dos machos e sua relação com os valores biométricos e hematológicos

Os resultados dos níveis séricos de testosterona no PC e no PCE dos grupos A, B e C estão apresentados nas tabelas 5.11, 5.12 e 5.13, respectivamente. No tabela 5.14 podemos observar os valores séricos de testosterona no PC nos diferentes grupos.

Os valores da concentração de testosterona sérica no começo do experimento (março/03), no PC (T_1) e no PCE (T_2), foram comparados com os valores dos demais meses de estudo.

No Grupo A, observaram-se diferenças significantes nos valores de T_1 nos meses de setembro/03 (5,8ng/mL, $p < 0,001$) e novembro/03 (6,6ng/mL, $p < 0,01$), quando comparados ao valor médio de T_1 de março/03 (28,9ng/mL). Em relação à T_2 , também foram observadas diferenças significantes nos mesmos meses de setembro/03 (4,3ng/mL, $p < 0,001$) e novembro/03 (5,2ng/mL, $p < 0,001$), quando comparados ao valor médio de T_2 em março (30,9ng/mL), conforme pode ser observado no tabela 5.11. Não houve diferenças significantes entre os valores de T_1 e de T_2 obtidos nas mesmas datas ao longo de todo o experimento (Gráfico 5.16).

Tabela 5.11- Valores médios da testosterona sérica (ng/mL) do Grupo A, no PC (T₁) e no PCE (T₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Data	Grupo A			
	T ₁ (ng/mL)	EPM	T ₂ (ng/mL)	EPM
Março/2003	28,93 ^a	5,92	30,92 ^a	24,62
Maio/2003	17,06 ^{ab}	3,81	10,21 ^{ab}	2,34
Julho/2003	11,69 ^{ab}	4,26	10,05 ^{ab}	3,70
Setembro/2003	5,80 ^b	1,68	4,26 ^b	3,79
Novembro/2003	6,60 ^b	1,82	5,24 ^b	5,36
Janeiro/2004	23,38 ^{ab}	5,13	12,75 ^{ab}	2,97
Março/2004	40,90 ^{ab}	6,33	31,43 ^{ab}	17,65

Legenda: T₁ (valores médios de testosterona no procedimento de conteção), T₂ (valores médios de testosterona no procedimento de contenção e/ou extração), EPM(erro padrão médio). Letras diferentes significam diferenças estatísticas dentro do mesmo parâmetro.

Tabela 5.12- Valores médios da testosterona sérica (ng/mL) do Grupo B, no PC (T₁) e no PCE (T₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Data	Grupo B			
	T ₁ (ng/mL)	EPM	T ₂ (ng/mL)	EPM
Março/2003	29,91 ^a	23,10	22,56 ^a	13,03
Maio/2003	12,23 ^a	3,72	4,93 ^b	2,47
Julho/2003	5,30 ^b	3,48	3,53 ^b	1,77
Setembro/2003	10,81 ^b	2,81	5,31 ^b	2,66
Novembro/2003	4,93 ^b	1,99	3,49 ^b	1,75
Janeiro/2004	1,16 ^b	0,31	3,42 ^b	1,71
Março/2004	9,94 ^b	4,96	12,61 ^b	7,28

Legenda: T₁ (valores médios de testosterona no procedimento de conteção), T₂ (valores médios de testosterona no procedimento de contenção e/ou extração), EPM(erro padrão médio). Letras diferentes significam diferenças estatísticas dentro do mesmo parâmetro.

Tabela 5.13- Valores médios da testosterona sérica (ng/mL) do Grupo C, no PC (T₁) e no PCE (T₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Data	Grupo C			
	T ₁ (ng/mL)	EPM	T ₂ (ng/mL)	EPM
Março/2003	21,33 ^a	11,76	19,32 ^a	6,58
Maio/2003	14,98 ^a	2,87	8,86 ^b	1,67
Julho/2003	5,86 ^b	1,14	3,46 ^b	0,38
Setembro/2003	6,11 ^b	2,18	5,22 ^b	1,70
Novembro/2003	7,40 ^b	2,04	4,87 ^b	0,99
Janeiro/2004	1,83 ^b	1,49	1,26 ^b	0,97
Março/2004	1,97 ^b	1,27	1,37 ^b	0,66

Legenda: T₁ (valores médios de testosterona no procedimento de conteção), T₂ (valores médios de testosterona no procedimento de contenção e/ou extração), EPM(erro padrão médio). Letras diferentes significam diferenças estatísticas dentro do mesmo parâmetro.

No Grupo B, foram observadas diferenças estatisticamente significantes tanto nos valores de T_1 quanto nos de T_2 , em quase todos os meses de estudo, quando comparados ao valor médio do início do experimento, em março/03, conforme pode ser visto no tabela 5.12. Não houve diferenças significantes entre os valores de T_1 e de T_2 obtidos nas mesmas datas ao longo do experimento(Gráfico 5.17).

Gráfico 5.16- Representação gráfica da concentração média da testosterona sérica do Grupo A, no PC (T_1) e no PCE (T_2), com seus respectivos erros- padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Gráfico 5.17- Representação gráfica da concentração média da testosterona sérica do Grupo B, no PC (T_1) e no PCE (T_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Semelhante ao Grupo B, o Grupo C também apresentou diferenças estatisticamente significantes tanto nos valores de T_1 quanto nos de T_2 , em quase todos os meses de estudo, quando comparados ao valor médio do início do experimento, em março/03 (Tabela 5.13). Também não foram encontradas diferenças significantes entre os valores de T_1 e de T_2 obtidos nas mesmas datas ao longo de experimento (Gráfico 5.18).

Gráfico 5.18- Representação gráfica da concentração média da testosterona sérica do Grupo C, no PC (T_1) e no PCE (T_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Comparando-se os três grupos experimentais, em relação aos valores de T_1 , observamos que existem diferenças significantes entre os Grupos A e B em quase todos os meses do experimento, com exceção do início do estudo, em março/03, e no mês de novembro/03; entre os Grupos A e C também observamos diferenças estatísticas em quase todos os meses, com exceção dos meses de setembro/03 e novembro/03. Entre os Grupos B e C, as diferenças estatísticas são encontradas nos meses de março/03 e setembro/03, conforme pode ser observado na tabela 5.14 e no gráfico 5.19. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos valores de T_2 .

Tabela 5.14- Valores médios da testosterona sérica (ng/mL) dos Grupos A, B e C no PC (T₁), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	T ₁ (ng/mL)	EPM	T ₁ (ng/mL)	EPM	T ₁ (ng/mL)	EPM
Março/03	28,93 ^a	5,92	29,91 ^a	23,10	21,33 ^b	11,76
Maio/03	17,06 ^a	3,81	12,23 ^b	3,72	14,98 ^b	2,87
Julho/03	11,69 ^a	4,26	5,30 ^b	3,48	5,86 ^b	1,14
Setembro/03	5,80 ^a	1,68	10,81 ^b	2,81	6,11 ^a	2,18
Novembro/03	6,60 ^a	1,82	4,93 ^a	1,99	7,40 ^a	2,04
Janeiro/04	23,38 ^a	5,13	1,16 ^b	0,31	1,83 ^b	1,49
Março/04	40,90 ^a	6,33	9,94 ^b	4,96	1,97 ^b	1,27

Legenda: T₁ (valores médios de testosterona no procedimento de contenção), EPM (erros-padrão médio). Diferenças significantes entre os diferentes grupos nas mesmas datas estão assinaladas com letras diferentes.

Gráfico 5.19- Representação gráfica da concentração média da testosterona sérica nos Grupos A, B e C, no PC (T₁), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Apenas no Grupo A foi observada uma correlação positiva significativa e de baixa intensidade entre a testosterona e o peso dos animais ($r^2 = 0,1$ e $p < 0,01$). Não foram observadas correlações significantes entre os níveis séricos de T₁ ou de T₂ e o comprimento rostro-cloacal.

No Grupo A foram observadas correlações positivas significantes e de baixa intensidade entre os níveis séricos de testosterona e o número de eritrócitos/mm³ ($r^2 = 0,2$ e $p < 0,0001$), porcentagem de azurófilos ($r^2=0,1$ e $p < 0,01$) e hematócrito ($r^2=0,2$ e $p < 0,0004$). Correlações negativas significantes e de baixa intensidade foram encontradas entre os níveis séricos de testosterona e o número de linfócitos/mm³ ($r^2=0,1$ e $p < 0,01$), porcentagem de heterófilos degranulados ($r^2 = 0,2$ e $p < 0,0004$) e VCM ($r^2=0,1$ e $p < 0,005$).

No Grupo B não foram observadas correlações significantes entre os níveis séricos de testosterona e as células sanguíneas.

No Grupo C foi observada correlação positiva significativa e de baixa intensidade entre os níveis séricos de testosterona e a porcentagem de basófilos ($r^2 = 0,2$ e $p < 0,03$).

5.6 Resultados dos níveis de estrógeno sérico das fêmeas e sua relação com os valores biométricos e hematológicos

Os resultados dos níveis séricos de estrógeno no PC e no PCE dos grupos A, B e C estão apresentados nas tabelas 5.15, 5.16 e 5.17, respectivamente. No tabela 5.18 podemos observar os valores séricos de estrógeno no PC nos diferentes grupos.

Os valores da concentração de estrógeno sérico no começo do experimento (março/03), no PC (E₁) e no PCE (E₂), foram comparados com os valores dos demais meses de estudo.

No Grupo A não foram observadas diferenças estatísticas nos valores de E₁ e nem nos de E₂, quando comparados aos seus respectivos valores médios do início do experimento em março/03 (Tabela 5.15). Quando se compara os valores de E₁ com os de E₂, obtidos nas mesmas datas ao longo de todo o experimento, nota-se uma diferença estatística no mês de maio/03 (Gráfico 5.20).

No Grupo B não foi observada nenhuma diferença em relação aos valores de E₁ quando comparados ao valor médio do início do experimento, mas em relação aos valores de E₂ houve uma diferença significativa em março/04 (11,83ng/mL), quando comparado ao valor médio do início do experimento em março/03 (39,39ng/mL), conforme pode ser observado no tabela 5.16. Não houve diferenças significantes entre os valores de E₁ e E₂ obtidos nas mesmas datas ao longo de todo o experimento (Gráfico 5.21).

Tabela 5.15 - Valores médios do estrógeno sérico (pg/mL) do Grupo A no PC (E₁) e no PCE (E₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Data	Grupo A			
	E ₁ (pg/mL)	EPM	E ₂ (pg/mL)	EPM
Março/2003	50,54	4,98	46,31	10,63
Maio/2003	29,16*	11,15	74,93*	31,23
Julho/2003	29,51	10,23	49,94	22,16
Setembro/2003	21,71	5,22	21,2	11,14
Novembro/2003	28,32	9,06	36,98	13,17
Janeiro/2004	34,48	11,38	41,73	16,22
Março/2004	15,60	5,78	36,29	15,55

Legenda: E₁ (valores médios de estrógeno no procedimento de contenção (PC)), E₂ (valores médios de estrógeno no procedimento de contenção e/ou extração (PCE)), EPM(erro padrão médio). Diferenças estatísticas entre os valores de E₁ e E₂, obtidos na mesma data, estão assinaladas com asterisco (*).

Tabela 5.16 - Valores médios do estrógeno sérico (pg/mL) do Grupo B no PC (E₁) e no PCE (E₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Data	Grupo B			
	E ₁ (pg/mL)	EPM	E ₂ (pg/mL)	EPM
Março/2003	39,03	9,25	39,39 ^a	5,89
Maio/2003	NR		45,52 ^a	11,28
Julho/2003	37,77	5,08	42,00 ^a	5,25
Setembro/2003	47,80	16,11	24,62 ^{ab}	5,92
Novembro/2003	38,54	14,62	27,44 ^{ab}	2,69
Janeiro/2004	14,25	2,62	19,21 ^{ab}	2,07
Março/2004	15,09	0,41	11,83 ^b	1,83

Legenda: E₁ (valores médios de estrógeno no procedimento de contenção (PC)), E₂ (valores médios de estrógeno no procedimento de contenção e/ou extração (PCE)), EPM(erro padrão médio). NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes significam diferenças estatísticas dentro do mesmo parâmetro.

Tabela 5.17 - Valores médios do estrógeno sérico (pg/mL) do Grupo C no PC (E₁) e no PCE (E₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2004

Data	Grupo C			
	E ₁ (pg/mL)	EPM	E ₂ (pg/mL)	EPM
Março/2003	41,36	6,99	33,83	5,13
Maio/2003	29,48	5,55	49,46	18,74
Julho/2003	48,62	14,19	48,83	6,28
Setembro/2003	41,90	20,16	72,08	0,07
Novembro/2003	34,31	10,64	71,88	28,15
Janeiro/2004	27,10	12,95	26,64	9,64
Março/2004	31,83	9,58	25,97	8,17

Legenda: E₁ (valores médios de estrógeno no procedimento de contenção (PC)), E₂ (valores médios de estrógeno no procedimento de contenção e/ou extração (PCE)), EPM(erro padrão médio).

No Grupo C não foram observadas diferenças estatísticas nos valores de E_1 e nem nos de E_2 quando comparados aos seus respectivos valores médios do início do experimento (Tabela 5.17). Também não houve diferenças significantes entre os valores de E_1 e E_2 , obtidos nas mesmas datas, ao longo de todo o experimento (Gráfico 5.22).

Os valores de E_1 nos Grupos A e B ao final do experimento, embora não tenham apresentado diferenças estatísticas com os valores do início do estudo, apresentaram uma clara tendência à diminuição (Gráficos 5.20 e 5.21).

Gráfico 5.20 - Representação gráfica da concentração média de estrógeno sérico no Grupo A no PC (E_1) e no PCE (E_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre E_1 e E_2 na mesma data. São Paulo, 2004

Gráfico 5.21- Representação gráfica da concentração média de estrógeno sérico no Grupo B no PC (E_1) e no PCE (E_2), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Gráfico 5.22- Representação gráfica da concentração média de estrógeno sérico no Grupo C no PC (E₁) e no PCE (E₂), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Comparando-se os três grupos experimentais observamos diferenças estatísticas entre os Grupos A e C, e B e C no mês de março/04 em relação aos níveis de E₁, com o Grupo C apresentando os maiores valores (Tabela 5.18 e Gráfico 5.23). Em relação aos níveis de E₂ não foram observadas diferenças significantes entre os grupos (Gráfico 5.24).

Tabela 5.18 - Valores médios de estrógeno sérico (pg/mL) dos Grupos A, B e C no PC (E₁), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	E ₁ (ng/mL)	EPM	E ₁ (ng/mL)	EPM	E ₁ (ng/mL)	EPM
Março/03	50,54	4,981	39,03	9,25	41,36	6,99
Maio/03	29,16	11,15			29,48	5,55
Julho/03	29,51	10,23	37,77	5,08	48,62	14,11
Setembro/03	21,71	5,223	47,80	16,11	41,90	20,16
Novembro/03	28,32	9,064	38,54	14,62	34,31	10,64
Janeiro/04	34,48	11,38	14,25	2,62	27,11	12,95
Março/04	15,60 ^a	5,78	15,09 ^a	0,41	31,83 ^b	9,58

Legenda: E₁ (valores médios de estrógeno no procedimento de contenção (PC)), EPM (erro padrão médio). Diferenças significantes entre os diferentes grupos, nas mesmas datas, estão assinaladas com letras diferentes.

Gráfico 5.23 - Representação gráfica da concentração média do estrógeno sérico nos Grupos A, B e C no PC (E_1), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Gráfico 5.24 - Representação gráfica da concentração média do estrógeno sérico nos Grupos A, B e C no PCE (E_2), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Não foram observadas correlações significantes entre os níveis séricos de EI e EII e as variáveis: comprimento rostro-cloacal e peso das serpentes.

Ao correlacionar os níveis de estrógeno sérico com os dados hematológicos, observamos correlações positivas significantes e de média intensidade com o número de eritrócitos/mm³ nos Grupos A e B.

5.7 Resultados dos níveis séricos de corticosterona dos machos e sua relação com os valores biométricos, hematológicos e com os níveis séricos de testosterona

Os resultados dos níveis séricos de corticosterona no PC e no PCE dos grupos A, B e C estão apresentados nas tabelas 5.19, 5.20 e 5.21, respectivamente. Nas tabelas 5.22 e 5.23 podemos observar os valores séricos de estrógeno no PC e no PCE, respectivamente, nos diferentes grupos.

Nos machos do Grupo A não foram observadas diferenças significantes, ao longo do período de estudo, nos valores séricos de corticosterona no PC (C_{M1}), como também não foram observadas diferenças estatísticas nos valores séricos da corticosterona no PCE (C_2), conforme pode ser visto no gráfico 5.25. Quando se compara os valores de C_{M1} com os de C_{M2} nas mesmas datas observam-se, no Grupo A, diferenças significativas em todos os meses de estudo. Os valores médios de C_{M1} e de C_{M2} , com seus respectivos erros-padrão dos valores médios estão apresentados no tabela 5.19.

Nos machos do Grupo B foram observadas diferenças significantes, em relação aos níveis de C_{M1} de março/03, nos meses de setembro/03, janeiro/03 e março/03 (Gráfico 5.26). Quanto aos níveis de C_{M2} , as diferenças significantes foram vistas nos meses de julho/03 e setembro/03 quando comparados ao valor médio de C_{M2} no início do experimento, conforme pode ser visto no gráfico 5.26. Quando se compara os valores de C_{M1} com os de C_{M2} nas mesmas datas observam-se, no Grupo B, diferenças estatísticas em todos os meses de estudo. Os valores médios de C_{M1} e de C_{M2} , com seus respectivos erros-padrão dos valores médios, estão apresentados no tabela 5.20.

Tabela 5.19- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos machos do Grupo A no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Machos			
	C_{M1} (ng/mL)	EPM	C_{M2} (ng/mL)	EPM
Março/03	1751*	717	14854*	2789
Maio/03	3219*	878	19393*	7285
Julho/03	3125*	785	16358*	2691
Setembro/03	2527*	662	12390*	1600
Novembro/03	1595*	579	18866*	4890
Janeiro/04	4073*	1344	13689*	2948
Março/04	3249*	1472	20528*	4020

Legenda: C_{M1} (valores médios de corticosterona no PC), C_{M2} (valores médios de corticosterona no PCE), EPM (erro padrão médio). Diferenças significantes entre C_{M1} e C_{M2} na mesma data estão assinaladas com asterisco (*)

Tabela 5.20- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos machos do Grupo B no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Machos			
	C_{M1} (ng/mL)	EPM	C_{M2} (ng/mL)	EPM
Março/03	652*	417	9080*	3733
Maio/03	2683*	455	18051*	7210
Julho/03	2717*	480	47298*	19230
Setembro/03	11871*	3077	35732*	11317
Novembro/03	1160*	318	17145*	3479
Janeiro/04	5854*	3238	13749*	7071
Março/04	4330*	1168	10410*	4069

Legenda: C_{M1} (valores médios de corticosterona no PC), C_{M2} (valores médios de corticosterona no PCE), EPM (erro padrão médio). Diferenças significantes entre C_{M1} e C_{M2} na mesma data estão assinaladas com asterisco (*)

Tabela 5.21- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos machos do Grupo C no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Machos			
	C_{M1} (ng/mL)	EPM	C_{M2} (ng/mL)	EPM
Março/03	1724*	932	23793*	2223
Maio/03	10172*	2417	27462*	6289
Julho/03	8051*	2020	32092*	7951
Setembro/03	6584	2576	NR	
Novembro/03	2951*	1239	27724*	3878
Janeiro/04	10920*	3551	32961*	2079
Março/04	4273*	1240	22508*	1980

Legenda: C_{M1} (valores médios de corticosterona no PC), C_{M2} (valores médios de corticosterona no PCE), EPM (erro padrão médio). NR: ensaio hormonal não realizado. Diferenças significantes entre C_{M1} e C_{M2} na mesma data estão assinaladas com asterisco (*).

Nos machos do Grupo C foram observadas diferenças significantes, em relação aos níveis médios de C_{M1} de março/03, nos meses de maio/03, julho/03, setembro/03 e janeiro/04 (Gráfico 5.27). Quanto aos valores de C_{M2} , não houve diferenças significantes quando comparados ao valor médio do início do experimento, conforme representado no gráfico 5.27. No mês de setembro não conseguimos quantidade de soro suficiente para o ensaio hormonal de C_{M2} . Quando se compara os valores de C_{M1} com os de C_{M2} nas mesmas datas observam-se diferenças significativas em todos os meses de estudo (Tabela 5.21).

Gráfico 5.25- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica dos machos do Grupo A no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{M1} ou C_{M2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{M1} ou C_{M2}). São Paulo, 2004

Gráfico 5.26- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica dos machos do Grupo B no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{M1} ou C_{M2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{M1} ou C_{M2}). São Paulo, 2004

Gráfico 5.27- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica dos machos do Grupo C no PC (C_{M1}) e no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{M1} ou C_{M2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_1 ou C_2). São Paulo, 2004

Comparando-se estatisticamente os três grupos, observa-se que houve diferenças significantes nos valores de C_{M1} nos meses de maio/03 e julho/03 entre os Grupos A e C, e B e C; em setembro/03 entre os grupos A e B, e A e C; e em janeiro/04 entre os grupos A e C (Tabela 5.22). O Grupo C sempre apresentou os valores séricos mais altos de C_{M1} ao longo do estudo, com exceção de setembro/03 quando o Grupo B apresentou concentrações séricas mais elevadas (Gráfico 5.28).

Tabela 5.22- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos Grupos A, B e C no PC (C_{M1}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	C_{M1} (ng/mL)	EPM	C_{M1} (ng/mL)	EPM	C_{M1} (ng/mL)	EPM
Março/03	1751 ^a	717	652 ^a	417	1724 ^a	932
Maio/03	3219 ^a	878	2683 ^a	455	10172 ^b	2417
Julho/03	3125 ^a	785	2717 ^a	480	8051 ^b	2020
Setembro/03	2527 ^a	662	11871 ^b	3077	6584 ^b	2576
Novembro/03	1595 ^a	579	1160 ^a	318	2951 ^a	1239
Janeiro/04	4073 ^a	1344	5854 ^{ab}	3238	10920 ^b	3551
Março/04	3249 ^a	1472	4330 ^a	1168	4273 ^a	1240

Legenda: C_{M1} (valores médios de corticosterona no PC), EPM (erro padrão médio). Diferenças significantes entre os diferentes grupos nas mesmas datas são assinaladas com letras diferentes.

Em relação aos níveis de C_{M2} , as diferenças significantes foram vistas entre os Grupos A e C, e B e C nos meses de março/03, maio/03, novembro/03, janeiro/04 e março/04. Em julho/03 o Grupo A se diferenciou dos Grupos B e C. Em setembro/03 e julho/03 o Grupo A se mostrou estatisticamente diferente dos Grupos B e C (Tabela 5.23). O Grupo C apresentou os valores mais altos de C_{M2} , com exceção do mês de julho/03, quando o Grupo B apresentou concentrações séricas mais elevadas (Gráfico 5.29).

Tabela 5.23 - Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) dos Grupos A, B e C no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	C_{M2} (ng/mL)	EPM	C_{M2} (ng/mL)	EPM	C_{M2} (ng/mL)	EPM
Março/03	14854 ^a	2789	9080 ^a	3733	23793 ^b	2223
Maio/03	19393 ^a	7285	18051 ^a	7210	27462 ^b	6289
Julho/03	16358 ^a	2691	47298 ^b	19230	32092 ^b	7951
Setembro/03	12390 ^a	1600	35732 ^b	11317	NR	
Novembro/03	18866 ^a	4890	17145 ^a	3479	27724 ^b	3878
Janeiro/04	13689 ^a	2948	13749 ^a	7071	32961 ^b	2079
Março/04	20528 ^a	4020	10410 ^a	4069	22508 ^b	1980

Legenda: C_{M2} (valores médios de corticosterona no PC), EPM (erro padrão médio). Diferenças significantes entre os diferentes grupos nas mesmas datas estão assinaladas com letras diferentes. NR: ensaio hormonal não realizado.

Gráfico 5.28- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica nos Grupos A, B e C no PC (C_{M1}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Gráfico 5.29- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica nos Grupos A, B e C no PCE (C_{M2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. Ensaio hormonal não realizado: (NR). São Paulo, 2004

Não foram observadas correlações significantes entre os níveis séricos de C_{M1} e C_{M2} e as variáveis: comprimento rostro-cloacal e peso das serpentes.

Em relação à hematologia observamos poucas correlações significantes com os valores da corticosterona sérica. No Grupo B observamos uma correlação positiva significativa e de baixa intensidade com o VCM ($r^2 = 0,35$, $p < 0,03$). No Grupo C observamos uma correlação positiva significativa e de baixa intensidade ($r^2 = 0,35$, $p < 0,03$) com o número de trombócitos.

Não houve correlação significativa entre os níveis séricos de testosterona e a corticosterona no nosso experimento.

5.8 Resultados dos níveis séricos de corticosterona das fêmeas e sua relação com os valores biométricos, hematológicos e com os níveis séricos de estradiol

Os resultados dos níveis séricos de corticosterona no PC e no PCE dos grupos A, B e C estão apresentados nas tabelas 5.24, 5.25 e 5.26, respectivamente. Nas tabelas 5.27 e 5.28 podemos observar os valores séricos de estrógeno no PC e no PCE, respectivamente, nos diferentes grupos.

Nas fêmeas do Grupo A não foram observadas diferenças significantes, ao longo do período de estudo, nos valores do PC (C_{F1}). Na segunda colheita de sangue (C_{F2}) diferenças foram verificadas nos meses de julho/03, janeiro/04 e março/04, quando comparados aos valores do início do experimento, em março/03 (Gráfico 5.30). Comparando-se os valores de C_{F1} com os de C_{F2} nas mesmas datas observam-se, no Grupo A, diferenças nos meses de julho/03, janeiro/04 e março/04, conforme pode ser observado no tabela 5.24.

Nas fêmeas do Grupo B, assim como nas do Grupo A, não foram observadas diferenças significantes nos valores de C_{F1} ao longo do período de estudo. Em relação aos valores de C_{F2} , diferenças foram encontradas nos meses de maio/03 e setembro/03 quando comparados aos valores iniciais do experimento, em março/03 (Gráfico 5.28). Em maio/03 não foi possível realizar o ensaio hormonal para corticosterona por falta de soro. Comparando-se os valores de C_{F1} com os de C_{F2} nas mesmas datas, percebe-se que existem diferenças em todos os meses, com exceção de setembro/03 e novembro/03, conforme pode ser observado no tabela 5.25.

Nas fêmeas do Grupo C, também não foi observada nenhuma diferença nos valores médios de C_{F1} no decorrer do estudo, mas quando comparamos o valor médio de C_{F2} no começo do experimento, em março/03, com os valores aumentados de julho/03 e setembro/03 verificamos diferenças estatísticas significantes (Gráfico 5.32). Comparando-se os valores de C_{F1} com os de C_{F2} nas mesmas datas, observam-se diferenças significantes em todos os meses, com exceção de março/03, conforme apresentado no tabela 5.26.

Tabela 5.24-Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas do Grupo A no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Fêmeas			
	C_{F1} (ng/mL)	EPM	C_{F2} (ng/mL)	EPM
Março/03	5733	683	22630	9565
Maio/03	846	437	17536	5000
Julho/03	5177*	274	47907*	35253
Setembro/03	4566	6127	27818	21980
Novembro/03	641	2	20927	12658
Janeiro/04	9614*	15581	35501*	29133
Março/04	4028	317	50272	42474

Legenda: C_{F1} valores médios de corticosterona no PC), C_{F2} valores médios de corticosterona no PCE), EPM (erro padrão médio). Diferenças significantes entre C_{F1} e C_{F2} na mesma data estão assinaladas com asterisco (*)

Tabela 5.25- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas do Grupo B, no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Fêmeas			
	C_{F1} (ng/mL)	EPM	C_{F2} (ng/mL)	EPM
Março/03	6233*	7758	27917*	13382
Maio/03	NR		14183	2310
Julho/03	10503*	7055	42442*	25263
Setembro/03	18943	8922	15815	3023
Novembro/03	9288	7920	21770	16757
Janeiro/04	11998*	11927	26547*	14394
Março/04	3689*	2999	25289*	15367

Legenda: C_{F1} (valores médios de corticosterona no PC), C_{F2} (valores médios de corticosterona no PCE), EPM (erro padrão médio). NR: ensaio hormonal não realizado. Diferenças significantes entre C_{F1} e C_{F2} na mesma data estão assinaladas com asterisco (*)

Tabela 5.26- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas do Grupo C, no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Fêmeas			
	C_{F1} (ng/mL)	EPM	C_{F2} (ng/mL)	EPM
Março/03	4806	1629	15218	6500
Maio/03	12260*	3061	46160*	12624
Julho/03	7650*	3332	62143*	10333
Setembro/03	7932*	1570	63548*	10000
Novembro/03	5071*	1684	35499*	4526
Janeiro/04	4930*	963	31841*	3498
Março/04	3440*	1420	29976*	6218

Legenda: C_{F1} (valores médios de corticosterona no PC), C_{F2} (valores médios de corticosterona no PCE), EPM (erro padrão médio). Diferenças significantes entre C_{F1} e C_{F2} na mesma data estão assinaladas com asterisco (*)

Gráfico 5.30- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica das fêmeas do Grupo A no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre o mesmo parâmetro (C_{F1} ou C_{F2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{F1} ou C_{F2}). São Paulo, 2004

Gráfico 5.31- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica das fêmeas do Grupo B no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre o mesmo parâmetro (C_{F1} ou C_{F2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{F1} ou C_{F2}). São Paulo, 2004

Gráfico 5.32- Representação gráfica da da concentração média de corticosterona sérica das fêmeas do Grupo B no PC (C_{F1}) e no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes entre o mesmo parâmetro (C_{F1} ou C_{F2}) ao longo do estudo e/ou dos dois parâmetros (C_{F1} ou C_{F2}). São Paulo, 2004

Comparando-se estatisticamente os três grupos, observa-se que houve diferenças significantes nos valores de C_{F1} nos meses de maio/03 e novembro/03 entre os Grupos A e C; e nos meses de setembro/03 e novembro/03 entre os Grupos A e B (Tabela 5.27). O Grupo B apresentou os valores séricos mais altos de C_{F1} ao longo do estudo (Gráfico 5.33).

Tabela 5.27- Valores médios de corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas dos Grupos A, B e C no PC (C_{F1}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	C _{F1} (ng/mL)	EPM	C _{F1} (ng/mL)	EPM	C _{F1} (ng/mL)	EPM
Março/03	5733	683	6233	7758	4806	1629
Maio/03	846 ^a	436	NR		12260 ^b	3061
Julho/03	5177	274	10503	7055	7650	3332
Setembro/03	4566 ^a	6127	18943 ^b	8922	7932 ^{ab}	1570
Novembro/03	641 ^a	2	9288 ^b	7920	5071 ^b	1684
Janeiro/04	9614	15581	11998	11927	4930	963
Março/04	4028	317	3689	2999	3440	1420

Legenda: C_{F1} (valores médios de corticosterona no PC), EPM (erro padrão médio). NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes representam diferenças significantes em C_{F1} na mesma data em grupos diferentes.

Gráfico 5.33- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica nos Grupos A, B e C no PC (C_{F1}), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. Ensaio hormonal não realizado (NR). São Paulo, 2004

Em relação aos níveis de C_{F2} , as diferenças foram vistas nos meses de maio/03 e setembro/03 entre o Grupo C e os demais grupos (Tabela 5.28). O Grupo C apresentou os valores séricos mais altos de C_{F2} ao longo do estudo, com exceção do início do experimento, em março/03 e nos meses finais do estudo (janeiro/04 e março/04), conforme pode ser observado no gráfico 5.34.

Tabela 5.28- Valores médios de corticosterona sérica (ng/mL) das fêmeas dos Grupos A, B e C no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	C_2 (ng/mL)	EPM	C_2 (ng/mL)	EPM	C_2 (ng/mL)	EPM
Março/03	22630	9565	27917	13382	15218	6500
Maio/03	17536 ^a	5000	14183 ^a	2310	46160 ^b	12624
Julho/03	47907	35253	42442	25263	62143	10333
Setembro/03	27818 ^a	21980	15815 ^a	3023	63548 ^b	10000
Novembro/03	20927	12658	21770	16757	35499	4526
Janeiro/04	35501	29133	26547	14394	31841	3498
Março/04	50272	42474	25289	15367	29976	6218

Legenda: C_{F2} (valores médios de corticosterona no PCE), EPM (erro padrão médio). NR: ensaio hormonal não realizado. Letras diferentes representam diferenças significantes em C_{F2} na mesma data em grupos diferentes.

Gráfico 5.34- Representação gráfica da concentração média de corticosterona sérica nas fêmeas dos Grupos A, B e C no PCE (C_{F2}), com seus respectivos erros padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Não foram observadas correlações significantes entre os níveis séricos de C_{F1} e de C_{F2} e as variáveis: CRC e peso das serpentes.

Em relação à hematologia, não observamos nenhuma correlação significativa com os valores da corticosterona sérica nos animais dos Grupos B e C. O Grupo A apresentou correlações negativas significantes e de baixa intensidade com o VCM ($r^2 = 0,2$ / $p < 0,05$) e com os linfócitos ($r^2 = 0,3$ / $p < 0,04$); e uma correlação positiva significativa e de baixa intensidade com os azurófilos ($r^2 = 0,3$ / $p < 0,04$).

Apenas o Grupo B apresentou uma correlação significativa positiva e de baixa intensidade ($r^2 = 0,2$ / $p < 0,03$) entre os valores séricos de estrógeno e de corticosterona, antes do procedimento de contenção.

5.9 Resultados da relação entre os níveis séricos de corticosterona das fêmeas e dos machos

Os resultados dos níveis séricos de corticosterona no PC e no PCE das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) e dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) dos grupos A, B e C estão apresentados nas tabelas 5.29, 5.30 e 5.31, respectivamente.

Comparando-se os valores séricos de corticosterona no PC e no PCE entre fêmeas (C_{F1} e C_{F2}) e machos (C_{M1} e C_{M2}) do Grupo A, podemos perceber que os valores das fêmeas foram geralmente mais elevados do que os dos machos, embora não estatisticamente significantes (Tabela 5.29 e Gráfico 5.35).

Tabela 5.29- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) no PC e PCE das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) e dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) do Grupo A, com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Fêmeas		Machos	
	$C_{F1} \pm \text{EPM}$	$C_{F2} \pm \text{EPM}$	$C_{M1} \pm \text{EPM}$	$C_{M2} \pm \text{EPM}$
Março/03	5733 $\pm$ 394	22630 $\pm$ 5522	1751 $\pm$ 717	14854 $\pm$ 2789
Maio/03	845 $\pm$ 308	17536 $\pm$ 5000	3219 $\pm$ 878	19393 $\pm$ 7285
Julho/03	5177 $\pm$ 194	47907 $\pm$ 20354	3125 $\pm$ 785	16358 $\pm$ 2691
Setembro/03	4566 $\pm$ 3537	27818 $\pm$ 15543	2527 $\pm$ 662	12390 $\pm$ 1600
Novembro/03	641 $\pm$ 1	20927 $\pm$ 7308	1595 $\pm$ 579	18866 $\pm$ 4890
Janeiro/04	9614 $\pm$ 8996	35501 $\pm$ 16820	4073 $\pm$ 1344	13689 $\pm$ 2948
Março/04	4028 $\pm$ 224	50272 $\pm$ 30034	3249 $\pm$ 1472	20528 $\pm$ 4020

Legenda: C_{F1} (valores médios de corticosterona no PC das fêmeas), C_{F2} (valores médios de corticosterona no PCE das fêmeas), C_{M1} (valores médios de corticosterona no PC dos machos), C_{M2} (valores médios de corticosterona no PCE dos machos), EPM (erro padrão médio).

Tabela 5.30- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) no PC e PCE das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) e dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) do Grupo B, com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Fêmeas		Machos	
	$C_{F1} \pm \text{EPM}$	$C_{F2} \pm \text{EPM}$	$C_{M1} \pm \text{EPM}$	$C_{M2} \pm \text{EPM}$
Março/03	6233 $\pm$ 3879	27917 $\pm$ 5984	651 $\pm$ 417	9080 $\pm$ 3733
Maio/03	NR	14183 $\pm$ 2310	2683 $\pm$ 455	18051 $\pm$ 7210
Julho/03	10503 $\pm$ 3155	42442 $\pm$ 14585	2717 $\pm$ 480	47298 $\pm$ 19230
Setembro/03	18943 $\pm$ 3990	15815 $\pm$ 1745 ^a	8794 $\pm$ 3077	35732 $\pm$ 11317 ^b
Novembro/03	9288 $\pm$ 3960*	21770 $\pm$ 8378	1160 $\pm$ 318*	17145 $\pm$ 3479
Janeiro/04	11998 $\pm$ 5334	26547 $\pm$ 6437	5854 $\pm$ 3238	13749 $\pm$ 7071
Março/04	3689 $\pm$ 1731	25289 $\pm$ 6872	4330 $\pm$ 1168	10410 $\pm$ 4069

Legenda: C_{F1} (valores médios de corticosterona no PC das fêmeas), C_{F2} (valores médios de corticosterona no PCE das fêmeas), C_{M1} (valores médios de corticosterona no PC dos machos), C_{M2} (valores médios de corticosterona no PCE dos machos), NR: Dosagem hormonal não realizada. EPM (erro padrão médio). Diferenças estatísticas entre C_{F1} e C_{M1} , em uma mesma data, estão assinaladas com asterisco. Diferenças entre C_{F2} e C_{M2} , em uma mesma data, estão representadas por letras diferentes.

Tabela 5.31- Valores médios da corticosterona sérica (ng/mL) no PC e PCE das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) e dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) do Grupo C, com seus respectivos erros-padrão dos valores médios. São Paulo, 2004

Data	Fêmeas		Machos	
	$C_{F1} \pm \text{EPM}$	$C_{F2} \pm \text{EPM}$	$C_{M1} \pm \text{EPM}$	$C_{M2} \pm \text{EPM}$
Março/03	4806 $\pm$ 1629	15218 $\pm$ 6500	1724 $\pm$ 932	23793 $\pm$ 2223
Maio/03	12260 $\pm$ 3061	46160 $\pm$ 12624 ^a	10172 $\pm$ 2417	27461 $\pm$ 6289 ^b
Julho/03	7650 $\pm$ 3332	62143 $\pm$ 10333 ^a	8051 $\pm$ 2020	32092 $\pm$ 7951 ^b
Setembro/03	7932 $\pm$ 1570	63548 $\pm$ 10000	6584 $\pm$ 2576	
Novembro/03	5071 $\pm$ 1684	35499 $\pm$ 4526	2951 $\pm$ 1239	27723 $\pm$ 3878
Janeiro/04	4930 $\pm$ 963	31841 $\pm$ 3498	10920 $\pm$ 3551	32961 $\pm$ 2079
Março/04	3440 $\pm$ 1420	29976 $\pm$ 6218	4273 $\pm$ 1240	22508 $\pm$ 1980

Legenda: C_{F1} (valores médios de corticosterona no PC das fêmeas), C_{F2} (valores médios de corticosterona no PCE das fêmeas), C_{M1} (valores médios de corticosterona no PC dos machos), C_{M2} (valores médios de corticosterona no PCE dos machos), NR: Dosagem hormonal não realizada. Diferenças estatísticas entre C_{F2} e C_{M2} , em uma mesma data, estão representadas por letras diferentes. EPM (erro padrão médio).

Gráfico 5.35- Representação gráfica das concentrações médias de corticosterona no PC e no PCE dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) e das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) do Grupo A. São Paulo, 2004

No Grupo B podemos perceber que o perfil da reposta adrenocortical entre machos e fêmeas, tanto no PC como no PCE, foi muito parecido, com uma diferença estatística em novembro/03, em relação ao PC e em setembro/03, em relação ao PCE (Tabela 5.30 e Gráfico 5.36).

Gráfico 5.36- Representação gráfica das concentrações médias de corticosterona no PC e no PCE dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) e das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) do Grupo B. (NR): dosagem hormonal não realizada. São Paulo, 2004

No Grupo C os machos e as fêmeas responderam de maneira semelhante ao PC durante todo o ano, sem diferenças significativas. Em relação ao PCE, observamos diferenças estatísticas nos meses de maio/03 e julho/03, com as fêmeas apresentando valores mais elevados. (Tabela 5.31 e Gráfico 5.37).

Gráfico 5.37- Representação gráfica das concentrações médias de corticosterona no PC e no PCE dos machos (C_{M1} e C_{M2} , respectivamente) e das fêmeas (C_{F1} e C_{F2} , respectivamente) do Grupo C. (NR): dosagem hormonal não realizada. São Paulo, 2004

6 **DISCUSSÃO**

6. DISCUSSÃO

6.1 Análise dos resultados da corticosterona sérica

As jararacas, tanto os machos como as fêmeas, dos três grupos experimentais exibiram uma resposta adrenocortical aos procedimentos de contenção física e extração (PCE) compatíveis com aquela observada em situações de estresse, demonstrando que o PCE são atividades estressantes para os animais. Mesmo o Grupo A, o nosso grupo controle, apresentou níveis séricos aumentados de corticosterona no PCE, demonstrando que a contenção física no laço de Lutz também foi um processo estressante para estas serpentes. O PC representou os níveis séricos basais de corticosterona antes da indução do estresse da contenção física nos Grupos A e B e antes da indução do estresse da contenção física e da extração de veneno no Grupo C, pois foi realizado em até 120 segundos. Segundo Sapolsky et al. (2000) e Wingfield e Romero (2001), na maioria das espécies estudadas até hoje, as concentrações de glicocorticosteróide plasmático só começam a aumentar 3 minutos após o início do estímulo do agente estressor.

Os resultados dos experimentos mostram que as serpentes nascidas em cativeiro, apesar de terem sido mantidas em condições ambientais controladas, alimentadas, limpas e manejadas por pessoas desde que nasceram, responderam ao estresse da contenção física com aumento na concentração de corticosterona conforme os animais de vida livre citados em vários estudos (DUNLAP, 1995; MATHIES et al., 2001; MOORE et al., 2001).

Noventa minutos após o estímulo da contenção física (nos Grupos A e B) e da rotina de extração (no Grupo C), os animais apresentaram um aumento nos valores de C_1 de 653%, 415% e 524%, respectivamente. A corticosterona é elaborada em resposta às perturbações físicas ou sociais, sendo que a resposta aguda a um estímulo estressante e o conseqüente aumento nos níveis séricos de corticosterona representa um mecanismo adaptativo de defesa, facilitando a sobrevivência do indivíduo (JESSOP et al., 1999; WINGFIELD, 1994). A concentração de corticosterona sérica nas jararacas do nosso experimento variou de 651 a 18943ng/mL (concentrações médias de C_1) e de 9080 a 63548ng/mL (concentrações médias de C_2) valores bem mais elevados do que os encontrados na literatura para *T. s. parietalis* (10 a 140 ng/mL, valores de corticosterona basal e após a

contenção física, respectivamente) em Moore et al. (2001) e para *B. irregularis* (10 a 60 ng/mL, valores de corticosterona basal e após a contenção, respectivamente) em Mathies et al. (2001).

Os machos e as fêmeas dos três grupos experimentais noventa minutos após a contenção física por meio do laço de Lutz com subsequente venopunção, responderam ao estresse aumentando, em até oito vezes, os valores séricos da corticosterona. Segundo Valverde et al. (1999) a taxa da resposta adrenocortical é importante para os organismos vertebrados porque são os glicocorticosteróides que mediam os mecanismos compensatórios fisiológicos responsáveis pela restauração da homeostasia.

A resposta adrenocortical elevada, à contenção física (C_2), das jararacas do nosso estudo corroboram os dados de Moore et al. (2001), onde foi verificado que espécies que possuem períodos reprodutivos longos, como é o caso dos viperídeos brasileiros, exibem maiores concentrações de corticosterona em resposta a um estímulo estressante do que espécies que possuem períodos limitados de reprodução (MOORE et al., 2001; WINGFIELD, 1988)

As serpentes que não sofreram mudanças na rotina diária da sala desde o nascimento (Grupo A) apresentaram níveis séricos basais de corticosterona similares durante todo o período de estudo, sendo que as fêmeas apresentaram, quase sempre, valores mais elevados, principalmente nos de C_{F2} nos meses de julho/03, janeiro/04 e março/04. Uma hipótese para os valores mais elevados nestes meses seria a presença de um maior número de pessoas no ambiente nestes períodos (ex. estagiários, filmagens). Segundo Guillette et al. (1995) se um novo agente estressante é introduzido, uma nova resposta será iniciada, aumentando a resposta hormonal ao estresse. Ao nosso ver, as fêmeas deste grupo se incomodaram mais com a presença de novas pessoas na sala do que os machos. Após algumas horas ou mesmo dias, acreditamos que os níveis hormonais destas serpentes voltavam ao normal, pois os seus níveis de C_{F1} eram praticamente constantes ao longo do estudo. Mathies et al. (2001) observaram que os níveis plasmáticos de corticosterona no colubrídeo *B. irregularis* retornavam aos valores basais 3 dias após o estresse de captura.

Os machos transferidos para a sala de produção de veneno, contidos fisicamente no laço de Lutz para venopunção, mas não submetidos à rotina de extração (Grupo B), apresentaram valores séricos de C_{M1} e de C_{M2} próximos aos do Grupo A, indicando que eles não estranharam a mudança de rotina, embora tenham apresentado maiores valores de C_{M1}

em setembro/03 e de C_{M2} em julho/03 e setembro/03. Ao contrário dos machos do Grupo A, parece que a presença de um maior número de pessoas no ambiente durante o mês de julho (inclusão de um novo agente estressante) incomodou os machos do Grupo B, estimulando uma resposta adrenocortical mais acentuada neste período. As fêmeas deste grupo após a transferência de sala, com exceção de março/04, mantiveram concentrações de C_{F1} mais elevadas ao longo do experimento, embora não estatisticamente significantes, em relação à concentração do início do experimento e às das fêmeas do Grupo A, talvez sendo uma indicação de que essas fêmeas demoraram a se adaptar à nova rotina. Do mesmo modo que os machos, elas apresentaram uma elevação nos níveis de C_{F1} em setembro e de C_{F2} em julho. Uma explicação provável para o aumento de C_{M1} e de C_{F1} em setembro/03 talvez seja a presença constante de pessoas novas no mês de julho, não permitindo que os níveis séricos de corticosterona destas serpentes voltassem às suas concentrações basais anteriores.

Os machos transferidos para a sala de produção de veneno, contidos fisicamente no laço de Lutz para venopunção e submetidos à rotina de extração de veneno (Grupo C), apresentaram, quase sempre, os maiores valores séricos de C_{M1} e de C_{M2} ao longo do experimento, sendo que os seus níveis séricos de C_{M1} não voltaram aos valores basais do início do experimento, demonstrando que estes animais, poderiam estar sofrendo de estresse crônico. As fêmeas deste grupo, ao contrário, apresentaram níveis séricos de C_{F1} muito constantes durante todo o experimento e próximos aos das fêmeas do Grupo A. Como nos demais grupos e pelos mesmos motivos, houve uma elevação nos valores de C_{M2} e C_{F2} , nos meses de julho e setembro. As fêmeas deste grupo parecem ter se adaptado melhor à rotina de extração de veneno do que os machos e melhor do que as fêmeas do Grupo B que se encontravam na mesma sala, mas observamos que a resposta adrenocortical à indução do estresse foi mais elevada do que nas fêmeas dos outros grupos.

Mathies et al. (2001) observaram que as concentrações de corticosterona plasmática em fêmeas do colubrídeo *B. irregularis* eram maiores do que as dos machos, tanto antes como após a indução de estresse por captura, sendo que nesta espécie os machos são um pouco maiores que as fêmeas. No nosso estudo verificamos que as fêmeas são estatisticamente maiores que os machos mas, similarmente a Mathies et al. (2001), apresentaram valores séricos de C_1 e de C_2 maiores do que os machos, embora poucas vezes tais diferenças fossem estatisticamente significantes. Estudos com fêmeas de mamíferos, principalmente ratas, mostraram que fêmeas possuem níveis de corticosterona basal mais

altos e respostas adrenocorticais ao estresse mais elevadas do que os machos (JONES et al., 1972; LE MEVEL et al., 1979; YOUNG, 1996). Por outro lado, Elsey et al (1991), Tyrrell e Cree (1998) e Romero e Wikelski (2001), não observaram diferenças estatísticas sexuais na resposta adrenocortical de jacarés (*Alligator mississippiensis*), tuataras (*Sphenodon punctatus*) e iguanas marinhas (*Amblyrhynchus cristatus*), respectivamente.

Segundo Weber (1992) e Norris et al. (1997), a corticosterona possui efeitos marcantes no metabolismo energético, pois estimula a gliconeogênese e a mobilização de aminoácidos e lipídios do músculo esquelético e tecido adiposo, inibindo o crescimento. Esta afirmação pode explicar os pesos menores e, praticamente, constantes dos machos dos Grupos B e C ao longo do experimento que tiveram uma resposta adrenocortical maior ao agente estressante do que os machos do Grupo A. As fêmeas dos Grupos B e C também tiveram respostas adrenocorticais maiores que as fêmeas do Grupo A, embora tenham apresentado um ganho de peso ao final do experimento. Podemos supor através destas observações que, nas fêmeas, os efeitos da corticosterona no metabolismo energético possam ser menos marcantes do que nos machos, permitindo que mesmo sob o efeito de um agente estressante as fêmeas consigam produzir folículos com vitelo para a próxima estação reprodutiva. Segundo Wingfield e Ramenovsky (1999) e Wingfield e Romero (2001), a modulação adrenocortical é um mecanismo através do qual vertebrados podem mediar mudanças na taxa, duração e magnitude da síntese e liberação de glicocorticosteróides em resposta a um agente estressante, como em algumas espécies de tartarugas marinhas que suprimem a resposta adrenocortical à indução de estresse por captura para otimizar o sucesso reprodutivo, mesmo às custas da sua sobrevivência (JESSOP et al., 1999; VALVERDE et al., 1999).

6.2 Análise da relação entre os níveis séricos de corticosterona e testosterona nos machos

Segundo DeNardo e Sinervo (1994), Moore e Miller (1984) e Silverin (1998), durante a reprodução níveis elevados de corticosterona circulante em resposta a um agente estressante podem inibir a síntese de testosterona ou outros hormônios responsáveis pela reprodução, levando a um rompimento na fisiologia ou comportamento responsáveis pelo sucesso reprodutivo dos machos.

A concentração de testosterona nos três grupos experimentais diminuiu em resposta ao agente estressante, mas a magnitude relativa desta resposta não foi tão intensa quanto a observada com a corticosterona.

Em março/03 (verão) quando o experimento foi iniciado, as concentrações séricas de corticosterona estavam baixas e as de testosterona elevadas nos três grupos, coincidindo com o período de espermatogênese, segundo Almeida e Orsi (2002). Em maio/03, a concentração de corticosterona sérica aumentou e a de testosterona diminuiu, sugerindo uma resposta adrenocortical com possíveis reflexos negativos na concentração de testosterona. De maio/03 a novembro/03, houve uma diminuição gradativa nos níveis séricos de corticosterona nos machos, com exceção do mês de setembro/03 no Grupo B. Esta redução na resposta adrenocortical aos agentes estressantes poderia ter a função de conservar as reservas energéticas durante o período de reprodução (MARRA; HOLBERTON, 1998; ROBIN et al., 1998); ou poderia indicar que os animais estariam se adaptando ao estresse imposto a cada dois meses.

Durante este mesmo período (de maio/03 a novembro/03), os níveis de testosterona dos machos dos três grupos também apresentaram uma queda gradativa, como seria esperado nesta época do ano (final da estação do outono até início da estação da primavera). Estes dados corroboram os de Moore et al. (2001), que também observaram esta queda entre a estação do outono até a da primavera na serpente norte-americana *T. s. concinnus*, de vida livre, embora os valores da testosterona nesta espécie de colubrídeo tenham alcançado valores mais altos (60ng/mL no outono e 15ng/mL na primavera- valores obtidos antes do estresse de captura) do que os viperídeos sul-americanos deste estudo (*B. jararaca*) nascidos em cativeiro (30ng/mL no outono e 7 ng/mL na primavera – valores de T_1). Zacariotti (2004), utilizando soro sanguíneo para a dosagem hormonal de testosterona, também observou este perfil nos viperídeos *Crotalus durissus terrificus* recém-chegados da natureza, onde os valores encontrados por ele se assemelharam mais com os nossos, variando de 52,60ng/mL no verão a 8,89ng/mL no inverno.

Em janeiro/04 (verão), período de espermatogênese, os Grupos B e C apresentaram concentrações elevadas de C_{MI} . Embora não tenhamos observado nenhuma correlação estatística negativa entre a corticosterona e a testosterona, como Lance e Elsey (1986); Greenberg e Wingfield (1987); Moore et al. (1991); Mahmoud e Licht (1997) e Tyrrell e Cree (1998); é possível sugerir que o aumento nos níveis séricos de corticosterona

no período de espermatogênese nestes grupos possa ter induzido a diminuição dos valores da testosterona sérica, sendo que quanto maior foi a resposta adrenocortical, menor foi a concentração sérica de testosterona. Em março/04, quando os níveis séricos de C_{MI} diminuíram até quase alcançarem os valores basais do início do experimento, as concentrações de testosterona aumentaram nos Grupos A e B e se mantiveram baixas no Grupo C. Neste mês, o Grupo A apresentou uma concentração sérica de testosterona 41% maior do que no início do experimento, o Grupo B apresentou um pequeno aumento em relação ao mês de janeiro/04, mas ainda 67% menor do que em março/03 e o Grupo C não apresentou aumento algum nos níveis séricos de testosterona estando com uma concentração 91% menor do que no mesmo período de 2003.

As descrições de Salomão e Almeida-Santos (2002) para o ciclo reprodutivo do viperídeo sul-americano *C. d. terrificus* estão de acordo com os níveis séricos de testosterona encontrados nos machos do Grupo A, onde as maiores concentrações foram observados no verão e outono, pico da atividade de espermatogênese e fase de cópula, respectivamente.

Embora pareça existir uma correlação negativa entre os níveis séricos de corticosterona e de testosterona ao longo do estudo, o nosso experimento corrobora os de Lance e Elsey (1986); Moore et al. (1991) e Mathies et al. (2001), em que a corticosterona não se apresenta estatisticamente correlacionada à testosterona, conforme demonstrado nos Gráficos 6.1 ($r^2 = 0,09$, $p < 0,51$), 6.2 ($r^2 = 0,1$, $p < 0,2$) e 6.3 ($r^2 = 0,08$, $p < 0,52$).

Gráficos 6.1, 6.2 e 6.3- Correlação linear simples dos valores séricos de testosterona e corticosterona em machos de *B. jararaca*, nos diferentes grupos experimentais. São Paulo, 2004

Segundo Moore e Deviche (1988) e Wingfield e Silverin (1986) a diversidade do comportamento entre a corticosterona e a testosterona, apresentando algumas vezes correlações positivas e outras vezes correlações negativas, sugere a existência de múltiplos reguladores tanto do eixo adrenal como do gonadal que precisariam ser melhor estudados nos répteis.

Existem alguns mecanismos fisiológicos que poderiam explicar a transição entre uma correlação positiva ou negativa entre a testosterona e a corticosterona. Segundo Riley et al. (2004) na serpente vivípara *Nerodia* sp existe uma proteína plasmática ligante de esteróides com afinidade média à alta para testosterona, estradiol, progesterona e corticosterona, sendo que a afinidade maior é pela testosterona e o estradiol; porém, em concentrações altas de corticosterona plasmática, os hormônios esteróides sexuais podem ser desalojados.

Jennings et al. (2000) trabalhando com aves descreveu α -globulinas capazes de se ligarem à corticosterona e à testosterona no plasma sanguíneo, porém com menor afinidade pela última. Com o auxílio desta globulina, estes hormônios são levados às células portadoras de receptores. Concentrações altas de corticosterona podem desalojar a testosterona dos receptores, fazendo com que esta seja eliminada (DEVICHE et al., 2001).

Uma terceira explicação possível para a interação entre a testosterona e a corticosterona plasmática, segundo Knapp e Moore (1997) estudando lagartos *Urosaurus ornatus*, envolve um mineralocorticóide intracelular (MI) e receptores de glicocorticosteróides (RG). Devido às diferentes afinidades de ligação pela corticosterona, em concentrações baixas de corticosterona sérica o MI fica saturado. Os RG só se ligam à corticosterona quando esta se encontra em níveis elevados, como durante uma resposta a um agente estressante. É possível então, que os efeitos negativos da corticosterona sobre os níveis de testosterona plasmática ocorram através da ativação dos RG, quando os níveis de corticosterona plasmática estão muito elevados (MOORE; JESSOP, 2003).

É possível que situações similares ocorram em serpentes, onde concentrações elevadas de corticosterona possam diminuir o nível de testosterona plasmática, devido a presença de proteínas plasmáticas ligantes de esteróides ou à presença de MIs e RGs, como ocorreu com as jararacas dos Grupos B e C, nos meses de janeiro/04 e março/04, quando concentrações mais elevadas de C_{M1} e de C_{M2} , podem ter diminuído as concentrações de T_1 e

de T₂. Proteínas plasmáticas que se ligam a esteróides, assim como MI_S e RG_S, precisam ser mais estudados em serpentes.

A espermatogênese e o comportamento de acasalamento estão diretamente relacionados à testosterona (MOORE et al., 2000). Johnson et al. (1982) observaram uma coincidência entre os níveis plasmáticos de testosterona e a espermatogênese em *Agkistrodon piscivorus*, onde os níveis mais elevados de testosterona estavam relacionados à alta atividade espermatogênica. Zacariotti (2004), relatou que os defeitos espermáticos estavam mais presentes no inverno, em *C. d. terrificus*, quando os níveis de testosterona se encontravam mais baixos.

Desta maneira podemos pressupor que a resposta adrenocortical à presença de um agente estressante no período de espermatogênese e acasalamento, diminuem a concentração sérica de testosterona prejudicando a reprodução das serpentes mantidas na sala de produção de veneno (Grupos B e C), pois além destes animais poderem apresentar maiores defeitos espermáticos e, conseqüentemente, menor índice de fertilidade, poderiam não apresentar o comportamento reprodutivo necessário para o acasalamento. Acreditamos que as concentrações de testosterona à resposta adrenocortical variam de acordo com a fase reprodutiva em que os machos se encontram, ou seja, animais que são submetidos a um agente estressante na fase de espermatogênese e acasalamento têm os seus níveis de testosterona diminuídos em função de uma elevada resposta adrenocortical, mas se este agente estressante for introduzido na fase quiescente da reprodução, as concentrações altas de corticosterona não afetam tanto os níveis de testosterona sérica.

A concentração de testosterona e a resposta adrenocortical à contenção física se mostraram mais alteradas nos animais mantidos em uma sala de produção de veneno do que nos animais que não sofreram mudanças em sua rotina diária. Os machos que foram submetidos à extração de veneno tiveram as maiores concentrações de corticosterona e as menores taxas de testosterona ao longo do estudo, indicando que poderiam estar sofrendo de estresse crônico.

No Grupo A observou-se uma correlação positiva significativa e de baixa intensidade entre a testosterona e o peso dos animais, não observado nos demais grupos, sugerindo que o efeito anabólico da testosterona pode ser neutralizado pelo efeito catabólico da corticosterona.

6.3 Análise dos resultados da corticosterona sérica e sua relação com os níveis séricos de estradiol nas fêmeas

Nas fêmeas dos três grupos experimentais observamos que os valores de estradiol, basais ou induzidos pelo estresse da contenção física, durante o período de estudo, foram muito próximos, tanto na comparação intra como inter-grupos, com exceção do mês de março/04, quando o Grupo C apresentou um valor médio mais elevado, estatisticamente significativo. Os valores séricos de estradiol encontrados nas fêmeas (15,60 a 50,54 pg/mL) durante o período de estudo estão próximos aos valores encontrados por Almeida-Santos (2005) para fêmeas desta espécie na fase quiescente do ovário, sugerindo que os nossos animais não entraram na fase de vitelogênese ativa que ocorre do final do verão até o início do outono (ALMEIDA-SANTOS et al., 2004).

Existem duas explicações prováveis para este comportamento do estradiol sérico nas fêmeas dos três grupos experimentais. Estas fêmeas, que tinham completado 3 anos de vida no começo do experimento, supostamente iriam iniciar a vitelogênese ativa a partir de março/03 (ALMEIDA-SANTOS, 2005), mas as concentrações séricas mais elevadas de corticosterona, observadas a partir de maio/03 com o começo do protocolo de indução de estresse, podem ter inibido a secreção de quantidades séricas de estradiol suficientes para despertar a vitelogênese ativa. Segundo Nijagal e Yajurvedi (1999), ocorre um decréscimo significativo no número de oogônias, oócitos, níveis séricos de estradiol, além da ausência de folículos vitelogênicos nos ovários do lagarto *Mabuya carinata* quando tratados com corticosterona exógena.

A segunda explicação é a de que as fêmeas do nosso estudo, embora possuísem CRC maiores do que os 76 cm citados na literatura para fêmeas maduras da mesma espécie (JANEIRO-CINQUINI et al., 1993), poderiam não estar ainda sexualmente maduras, apresentando níveis séricos de estradiol mais baixos do que os apresentados por fêmeas maduras no período de vitelogênese. Não existem estudos a respeito da maturidade sexual de *B. jararaca* nascidas em cativeiro.

Vários estudos sugerem que o estradiol possui um papel importante na resposta mais acentuada ao estresse observada em fêmeas de mamíferos (BURGESS e HANDA, 1992; CAREY et al., 1995; VIAU e MEANEY, 1991) e que esta resposta é dependente da fase

reprodutiva em que as mesmas se encontram (VIAU e MEANEY, 1991). Phillips e Poolsanguan (1978) e Viau e Meaney (1991) mostraram nos seus estudos com ratas que os níveis de corticosterona plasmática, basais e após a indução do estresse, são mais elevados nas fases reprodutivas em que o estradiol está mais elevado. Apesar das jararacas do estudo provavelmente não terem entrado na vitelogênese ativa, estado na qual as concentrações de estradiol estariam altas, pudemos observar que os níveis séricos de corticosterona eram mais elevados quando os níveis de estradiol também estavam mais altos.

Acreditamos, assim como nos machos, que as concentrações de estradiol à resposta adrenocortical variam de acordo com a fase reprodutiva em que as fêmeas se encontram, ou seja, animais que são submetidos a um agente estressante na fase de vitelogênese têm os seus níveis séricos de estradiol diminuídos em função de uma elevada resposta adrenocortical, mas se este agente estressante for introduzido na fase quiescente da reprodução, as concentrações altas de corticosterona não afetam substancialmente os níveis hormonais.

6.4 Análise das diferenças dos níveis séricos de corticosterona entre machos e fêmeas

Conforme pode ser observado nos gráficos 5.32, 5.33 e 5.34, os níveis séricos de corticosterona basais entre machos e fêmeas do mesmo grupo tiveram um perfil semelhante, principalmente nos Grupos B e C, indicando que sexos diferentes respondem de maneira similar aos mesmos agentes estressantes. Em nosso estudo verificamos que as fêmeas apresentaram valores de corticosterona, basais e induzidos pelo estresse da contenção física e da extração, mais elevados do que os machos, embora nem sempre estas diferenças tenham tido significado estatístico, corroborando os dados de Mathies et al. (2001) que observaram níveis mais elevados de corticosterona plasmática em fêmeas do colubrídeo *B. irregularis* do que em machos, tanto antes como após a indução de estresse por captura. Estudos com mamíferos, principalmente em ratas, mostraram que as fêmeas também possuem níveis de corticosterona basal mais altos e respostas adrenocorticais ao estresse mais elevadas do que os machos (JONES et al., 1972; Le MEVEL et al., 1979; YOUNG, 1996). Segundo Burgess e

Handa (1992) trabalhando com ratas, o estradiol age na atividade do receptor de glicocorticosteróide e diminui o “feed-back” negativo, alterando a função do HPA.

Elsey et al. (1991); Romero e Wikelski (2001) e Tyrrell e Cree (1998) não observaram diferenças estatísticas sexuais na resposta adrenocortical de jacarés (*Alligator mississippiensis*), tuataras (*Sphenodon punctatus*) e iguanas marinhas (*Amblyrhynchus cristatus*), respectivamente. Trabalhos futuros precisam ser conduzidos para melhor esclarecer a interferência do sexo sobre a resposta adreno-cortical ao estresse.

6.5 Análise da hematologia e sua relação com os níveis séricos de corticosterona e hormônios esteróides sexuais

O estresse associado ao tempo necessário para retirar a serpente do seu recinto ou ambiente natural, contê-la e obter uma amostra sanguínea pode prejudicar as comparações de concentrações de corticosterona obtidas na literatura. Dunlap (1993) e Moore et al. (1991) observaram correlações positivas significantes entre o tempo gasto na colheita de sangue e a concentração de corticosterona. Desta maneira, nós cronometramos o tempo gasto (em segundos) desde a retirada do animal da sua gaiola até a colheita de sangue. Estipulamos um tempo máximo de 120 segundos, após o qual a colheita era interrompida. Na maioria das espécies estudadas, a concentração de glicocorticosteróides só começa a se elevar aproximadamente 3 minutos após o início de um estímulo estressante agudo (SAPOLSKY et al., 2000; WINGFIELD; ROMERO, 2001). Para pessoas com prática, este tempo é adequado para se conseguir as amostras sanguíneas.

Muitos dos parâmetros hematológicos observados nas jararacas do estudo possuem valores mínimos e máximos muito díspares e mostraram algumas diferenças quando comparados aos dados publicados previamente para outras serpentes da Família Viperidae. Parker (1977) encontrou valores médios de hematócrito mais elevados (31,9%) em *Crotalus atrox*; Freitas et al. (2003) e Troiano et al. (2000) encontraram valores médios de hemoglobina mais elevados (10-12g/dL) e valores médios relativos de linfócitos (50%), azurófilos (9,5%), trombócitos (6%) e basófilos (0,8%) diminuídos em *Bothrops alternatus*, *B. jararacassu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi diporus*. Grego et al. (2000) encontraram parâmetros hematológicos semelhantes aos da jararaca do presente estudo em *B. moojeni* e *B. alternatus*.

de Porto Primavera (SP), com exceção da contagem específica de linfócitos e basófilos que apresentaram valores médios maiores nas jararacas. Freitas et al. (2003) e Kolesnikovas et al. (2000) observaram valores médios similares ao do nosso estudo em *Bothrops* sp e *Crotalus* sp, respectivamente, mantidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do IB, conquanto os valores da contagem específica de basófilos nestes trabalhos tenham sido mais baixos.

Estas diferenças podem ocorrer devido a vários fatores como: a localização geográfica onde é realizado o estudo, as condições de colheita do sangue, as condições de vida dos animais - de vida livre ou mantidos em cativeiro, e a nomenclatura dos leucócitos adotada pelo pesquisador. Nós adotamos a nomenclatura proposta por Alleman (1999), que classifica os leucócitos de serpentes em linfócitos, azurófilos, heterófilos degranulados, heterófilos intactos e basófilos. Troiano et al. (2000), por exemplo, classificam as células sanguíneas em linfócitos, monócitos, azurófilos, heterófilos, eosinófilos e basófilos, dificultando a comparação dos dados.

A contagem específica dos basófilos das jararacas do nosso estudo foi maior do que os valores relatados para outros viperídeos. A princípio imaginamos que esta diferença pudesse ser uma característica de exemplares jovens de *Bothrops* sp (3 anos de idade), pois na maioria dos estudos hematológicos, os animais são obtidos da natureza sem se saber a idade do animal, mas Rameh de Albuquerque (comunicação pessoal)² também observou uma alta taxa de basófilos em seus estudos hematológicos com indivíduos desta mesma espécie. Portanto, valores altos de basófilos podem ser uma característica inata desta espécie.

No nosso estudo foram encontradas várias células imaturas de eritrócitos na circulação periférica dos animais dos três grupos. A retirada de 2mL de sangue a cada 60 dias pode ter estimulado o recrutamento destas células a partir dos sítios hematopoiéticos. Em mamíferos, apenas células maduras chegam à circulação em condições normais (WAUGH et al., 1984). Segundo Sano-Martins et al. (2002) em répteis as células endoteliais inibem claramente a passagem de células imaturas, embora seja comum a presença de 18 a 22% de células imaturas na circulação periférica devido a um sistema vascular bem desenvolvido adjacente à coluna vertebral (importante tecido hematopoiético) descrito por Zippel et al. (2001) em serpentes.

Os animais do Grupo A apresentaram uma queda no número de eritrócitos nos meses de setembro/03 e novembro/03, em ambos os sexos, embora os machos estivessem ganhando peso gradativamente e as fêmeas, neste mesmo período, tenham diminuído a sua

² Informação fornecida por Rameh de Albuquerque, L.C. em 2006 no Laboratório de Herpetologia do IB.

massa. Esta diminuição na contagem total de eritrócitos, apenas no grupo controle, foi inesperada e seu significado não pode ser determinado.

Aumento no hematócrito, mudança na contagem de células sanguíneas e a relação heterófilo/linfócito têm sido usados para determinar estresse em diversas espécies de répteis (AGUIRRE et al., 1995; DUGGAN, 1981; KREGER e MENCH, 1993; LANCE, 1990; MAHAPATRA et al., 1991; MOBERG, 1985).

Ao contrário do que foi observado por esses autores, nos nossos animais não observamos aumento do hematócrito em nenhum dos grupos e ainda foi detectada uma queda nos Grupos A e B. O Grupo A apresentou linfocitopenia no mês de janeiro/04, coincidindo com níveis séricos elevados de corticosterona para este grupo. O Grupo B, ao contrário, no seu pico de corticosterona (setembro/03) apresentou linfocitose, enquanto o Grupo C não teve seus valores de linfócitos alterados. Nos Grupos A, B e C, ocorreu discreta heterofilia em janeiro/04, sem significado estatístico, e que coincidiu com o pico de corticosterona em janeiro/04.

Segundo Orth et al. (1992), os glicocorticosteróides produzem uma diminuição marcante no número de linfócitos periféricos em humanos, devido a sua redistribuição do compartimento intravascular para o baço, linfonodos, duto torácico e medula óssea. Em camundongos e coelhos a corticosterona pode induzir lise dos linfócitos nestes tecidos (DOUGHERTY; WHITE, 1945). Em relação aos granulócitos, os glicocorticosteróides têm um efeito oposto, fazendo com que eles deixem a medula óssea e entrem na circulação sanguínea periférica.

Embora tenhamos observado correlações negativas significantes e de média intensidade entre os heterófilos e os linfócitos em todos os grupos experimentais, ao contrário de Aguirre et al. (1995) e Kamau et al. (2002) a relação heterófilo/linfócito não se mostrou um sinalizador eficiente para a detecção do estresse em nossos animais, pois não houve correlação estatística entre esta relação e os níveis séricos de corticosterona. Talvez fosse necessário um número maior de animais nos experimentos para verificarmos a eficiência desta relação na detecção do estresse. Segundo Vleck et al. (2000) para que a relação heterófilo/linfócito tenha validade é necessário examinar um número grande de animais e fazer leituras repetidas de um mesmo indivíduo, situação que não foi possível obter em nosso experimento.

Os resultados dos parâmetros hematológicos obtidos nas serpentes do nosso estudo corroboram as afirmações de vários autores (COULSON; HERNANDEZ, 1964; DESSAUER, 1970; WHITE; SOMERO, 1982) segundo os quais os vertebrados ectotérmicos apresentam uma grande variação na composição sanguínea, mesmo sob condições aparentemente favoráveis. Desta maneira acreditamos que desvios na composição média sanguínea não significam, necessariamente, função fisiológica comprometida. Semelhantemente, consideramos que há necessidade de estudos complementares antes da adoção de parâmetros hematológicos como sinalizadores apropriados de estresse em serpentes.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- Z** Os diagnósticos DPC®, DSL® e MPBiomedicals®, embora tenham sido desenvolvidos para uso em soro humano e o último em soro de roedores, se mostraram eficientes na detecção de hormônios esteróides séricos em jararaca.
- Z** As concentrações séricas baixas de corticosterona encontradas no PC e elevadas no PCE, demonstraram que o tempo de colheita sanguínea de 120 segundos foi eficiente na obtenção de valores basais de corticosterona.
- Z** Os machos do Grupo C foram os animais que apresentaram níveis basais de corticosterona mais elevados, indicando que a rotina de extração se mostrou um processo estressante, seguido dos machos do Grupo B, que não foram submetidos à extração de veneno, mas que tiveram a sua rotina modificada.
- Z** As concentrações séricas de testosterona à resposta adrenocortical variaram de acordo com a fase reprodutiva, ou seja, na fase de espermatogênese respostas adrenocorticais elevadas diminuíram os níveis séricos de testosterona, enquanto na fase quiescente da reprodução, concentrações elevadas de corticosterona não afetaram significativamente níveis os séricos de testosterona.
- Z** Os Grupos B e C apresentaram baixos níveis séricos de testosterona ao final do experimento (março/04) no período de espermatogênese. Como a espermatogênese e o comportamento de acasalamento estão diretamente relacionados à testosterona, é possível concluir que estes animais não teriam um comportamento reprodutivo adequado, o que acarreteria na diminuição de seu índice de fertilidade.
- Z** A ausência de vitelogênese ativa nas fêmeas do nosso estudo pode ter ocorrido devido à imaturidade sexual das serpentes, conquanto no final do experimento, quando as fêmeas atingiram quatro anos de idade, os constantes índices de estradiol sérico podem ter sido ocasionados pelo estresse a que estas fêmeas foram submetidas ao longo do estudo.

- Z** Os machos dos Grupos B e C, que foram transferidos para a SPV, apresentaram níveis de C_{M2} mais elevados do que os machos do Grupo A, indicando que os machos mantidos em SPV têm respostas adrenocorticais mais elevadas quando submetidos a novos agentes estressantes. As fêmeas dos três grupos apresentaram C_{F2} elevadas, podendo ser um indício de que as fêmeas sejam mais sensíveis à presença de pessoas estranhas na sala.
- Z** As fêmeas de *B. jararaca* apresentaram níveis séricos de corticosterona mais elevados no PC e no PCE do que os machos. Acreditamos que tal situação seja uma diferença inerente ao sexo e que esteja ligada aos níveis séricos de estradiol.
- Z** Os machos dos Grupos B e C apresentaram peso constante ao longo do estudo, confirmando os efeitos marcantes da corticosterona no metabolismo energético dos machos. Já os machos do Grupo A ganharam peso, sugerindo que o efeito catabólico da corticosterona possa ser neutralizado pelo efeito anabólico da testosterona.
- Z** Através do nosso estudo comprovamos que níveis séricos elevados de corticosterona alteram os níveis de hormônios esteróides sexuais, levando a um rompimento na fisiologia reprodutiva normal dos animais.
- Z** Ambos os sexos de cada grupo apresentaram perfis similares em relação aos níveis séricos basais de corticosterona, indicando que sexos diferentes respondem a um agente estressante de maneira semelhante, mas com diferenças na magnitude da resposta.
- Z** Embora o aumento no hematócrito, mudança na contagem de células sanguíneas e a relação heterófilo/linfócito tenham sido usados em outros trabalhos para determinar o estresse em répteis, no nosso estudo não observamos correlações estatisticamente significantes entre esses parâmetros sanguíneos e a concentração sérica de corticosterona, não podendo ser considerado um sinalizador de estresse nas jararacas.

- Z** Serpentes reprodutoras não devem ser submetidas à rotina de extração de veneno, devendo ser mantidas em salas onde o manejo seja estável.
- Z** Modificações no ambiente onde são mantidas as serpentes devem ser realizadas nos períodos em que os seus hormônios esteróides sexuais estão mais baixos (primavera e verão) para que as suas funções reprodutivas não sejam muito alteradas.

AGUIRRE, A. A.; BALAZS, G. H.; SPRAKER, T. R.; GROSS, T. S. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia midas*) with and without fibropapillomas. **Physiological Zoology**, v. 68, p. 831-854, 1995.

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. **Modelos Reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. 2005. 204 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. Sperm storage in males of the snake *Crotalus durissus terrificus* (Crotalinae: Viperidae) in southeastern Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 169-174, 2004.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morfologia e função do oviduto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p.109-112, 2002.

ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, v. 55, n. 2, p. 200-204, 1999.

ARAÚJO, F.A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S. e HADDAD, V. (Ed). **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Editora Saraiva, 2003, cap. 2, p. 6-12.

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.

BAUER, M. E. Estresse: como ele abala as defesas do corpo? **Ciência hoje**, v. 30, p. 21-25, 2002.

BONA-GALLO, A.; LICHT, P.; MACKENZIE, D. S; LOFTS, B. Annual cycles in pituitary and plasma gonadotropin, gonadol steroids and thyroid activity in the chinese cobra (*Naja naja*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 42, p. 477-493, 1980.

BONNET, X.; NAULLEAU, G. Are body reserves important for reproduction in male dark green snakes (Colubridae: *Coluber viridiflavus*)? **Herpetologica**, v. 52, p.137-146, 1996.

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

BOURNE, A. Androgens. In: PANG, P. K. T.; SCHREIBMAN, M. P.; JONES, R. E. (Ed.). **Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications**. San Diego: Academic Press, 1991, v. 4, pt. B, p. 33-66.

BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. (Ed.) **Patologia clínica veterinária**. 1982. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, p.2

BURGESS, L. H.; HANDA, R. J. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterona secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. **Endocrinology**, v.131, p. 1261-1269, 1992.

- CALLARD, I. P.; CHAN, D. K. O. Hormonal effects on liver glycogen and blood sugar level in the iguanid lizard *Dipsosaurus dorsalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 18, p. 552-556, 1972.
- CAMPBELL, T. W. Clinical Pathology. In: Mader, D.R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. Pennsylvania: WB Saunders, 1996, p. 248-257.
- CAREY, M. P.; DETERD, C. H.; KONING, J.; HELMERHORST, F.; KLOET, E. R. The influence of ovarian steroids on hypothalamic pituitary-adrenal regulation in the female rat. **Journal of endocrinology**, v. 144, p. 311-321, 1995.
- CHESTER-JONES, I. Evolutionary aspects of the adrenal cortex and its homologues. **Journal of Endocrinology**, v. 71, p. 3-32, 1977.
- CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress disorders. **Journal of the American Medical Association**, v. 267, p. 1244-1252, 1992.
- COTE, J.; CLOBERT, J.; MEYLAN, S; FITZE, P. S. Experimental enhancement of corticosterona levels positively affects subsequent male survival. **Hormones and Behavior**, v. 49, p. 320-327, 2006.
- COULSON, R. A. e HERNANDEZ, T. In: **Biochemistry of the alligator**. 1964. Baton Rouge: Louisiana State University Press.
- DE FALCO, M.; SCIARRILLO, R.; VIRGILIO, F.; FEDELE, V.; VALIANTE, S.; LAFORGIA, V.; VARANO, L. Annual variations of adrenal gland hormones in the lizard *Podarcis sicula*. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 190, p. 675-681, 2004
- DENARDO, D. F.; SINERVO, B. Effects of steroid hormone interaction on activity and home-range size of male lizards. **Hormones and Behavior**, v. 28, p. 273-287, 1994.
- DESSAUER, H. C. Blood Chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. In: **Biology of the reptilia**. Gans, C. (Ed.). 1970. New York: Academic Press.
- DEVENPORT, L.; KNEHANS, A.; SUNDSTROM, A.; THOMAS, T. Corticosterone's dual metabolic actions. **Life Science**, v. 45, p. 1389-1396, 1989.
- DEVICHE, P.; BREUNER, C.; ORCHINIK, M. Testosterone, corticosterona, and photoperiod interact to regulate plasma levels of binding globulin and free steroid hormone in dark-eyed juncos *Junco hyemalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, p. 67-77, 2001.
- DODDAMANI, L. S. Development of the adrenal gland in the tropical lizard *Calotes versicolor*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 117, p. 89-102, 2000.
- DOUGHERTY, T. F.; WHITE, A. Functional alterations in lymphoid tissue induced by adrenal cortical secretion. **American Journal of Anatomy**, v. 77, p. 81-116, 1945.
- DUGGAN, R. T. Plasma corticosteroids in marine, terrestrial and freshwater snakes. **Compendium of Biochemical Phisiology**, v. 68A, p. 115-118, 1981.
- DUNLAP, K.D; SCHALL, J.J. Hormonal alterations and reproductive inhibition in male fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) infected with the malarial parasite *Plasmodium mexicanum*. **Physiological Zoology**, v. 68, p. 608-621, 1995.

- 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.
- ELSEY, R. M.; LANCE, V.; JOANEN, T.; MCNEASE, L. Acute stress suppresses plasma estradiol levels in female alligators. **Comparative and Biochemical Physiology A**, v. 100, p. 649-651, 1991.
- 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. H. A bradykinin potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Britains Journal of Pharmacology**, v. 24, p. 163-169, 1965.
- FONSECA, F. Instituto Butantã. In: Comissão do IV Centenário da Cidade de São Paulo. **São Paulo em quatro séculos**. São Paulo: Instituto Histórico e Geográfico de S. Paulo, 1954. p. 302-306.
- FREITAS, G.; GREGO, K F.; RAMEH de ALBUQUERQUE, L. C.; ZACARIOTTI, R. L. Hematological reference intervals of recently-caught free-ranging South-American rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 60, p. 138, 2003.
- FRYE, F. L. Comparative histology. In: FRYE, F.L. (Ed.). **Reptile care: an atlas of diseases and treatments**. New Jersey: T.F.H Publications, 1991, cap. 14, p. 473-510.
- GABE, M. The adrenal. In: GANS, C. (Ed.). **Biology of the reptilia**. New York: Academic Press, 1970, v. 3.
- GAO, H. B.; SHAN, L. X.; MONDER, C.; HARDY, M. P. Supression of endogenous corticosterone levels in vivo increases the steroidogenic capacity of purified rat Leydig cells in vitro. **Endocrinology**, v. 137, p. 1714-1718, 1996.
- GIRLING, J. E. The reptilian oviduct: a review of structure and function and directions for future research. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 141-170, 2002.
- GREENBERG, N.; WINGFIELD, J. Stress and reproduction: reciprocal relationships. In: NORRIS, D.O.; JONES, R.E. (Ed.). **Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles**. New York: Plenum Press, 1987, p. 461-503
- GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. C. R.; ZACARIOTTI, R. L.; BELMONTE, M. A. Hematological values for the *Bothrops moojeni* and *Bothrops alternatus* species (Ophidia, Viperidae) from Porto Primavera - SP. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 59, p.141, 2000.
- GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Disease**, v. 27, p. 972-979, 1983.
- 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.
- HAWKEY, C. M.; DENNETT, T. B. Normal and abnormal red cells, granulocytes, lymphocytes, monocytes, and platelets.. In: **Color atlas of comparative veterinary hematology**. Iowa: Iowa State University Press, 1989, p. 14-44.

- HEBARD, W. B. e CHARIPPER, H. A. A comparative study of the morphology and histochemistry of the reptilian adrenal gland. **Zoologia**, v. 40, p. 101-127, 1955.
- HOOPEs, L. A.; LANDRY, A. M.; STABENAU, E. K. Physiological effects of capturing Kemp's ridley sea turtles, *Lepidochelys kempii*, in entanglement nets. **Canadian Journal of Zoology**, v. 1978, p. 1941-1947, 2000.
- ISHII, S. Gonadotropins. In: PANG, P.K.T.; SCHREIBMAN, M.P.; JONES, R.E. (Ed.). **Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications**. San Diego: Academic Press, 1991, v. 4, pt. B, p. 33-66.
- JACOB, V.; OOMEN, V. O. A comparison of the effects of corticosterona and cortisol on the intermediary metabolism of *Calotes versicolor*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 85, p. 86-90, 1992.
- JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; LEINZ, F. F.; FARIAS, E. C. Seasonal variation in weight and length of the testicles and the quantity of abdominal fat of the snake *Bothrops jararaca*. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, p. 33-36, 1993.
- JENNINGS, D. H.; MOORE, M. C.; KNAPP, R.; MATTHEWS, L.; ORCHINIK, M. Plasma steroid-binding globulin mediation of differences in stress reactivity in alternative male phenotypes in tree lizards, *Urosaurus ornatus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 120, p. 289-299, 2000.
- JESSOP, T. S. Modulation of the adrenocortical stress response in marine turtles (Cheloniidae): evidence for a hormonal tactic maximizing maternal reproductive investment. **Journal of Zoology of London**, v. 254, p. 57-65, 2001.
- JESSOP, T. S.; KNAPP, R.; WHITTIER, J. M.; LIMPUS, C. J. Dynamic endocrine responses to stress: evidence for energetic constraints and status dependence in breeding male green turtles. **General and Comparative Endocrinology**, v. 126, p. 59-67, 2002.
- JESSOP, T. S.; LIMPUS, C. J.; WHITTIER, J. M. Plasma steroid interactions during high-density green turtle nesting and associated disturbance. **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, p. 90-100, 1999.
- JOHNSON L. F.; JACOB, J.S.; TORRANCE, P.. Annual testicular and androgenic cycles of the cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus*) in Alabama. **Herpetologica**, v. 38, p.16-25, 1982.
- JONES, R. E.; BAXTER, D. C. Gestation, with emphasis on corpus luteum biology, placentation, and parturition. In: PANG, P.K.T.; SCHREIBMAN, M.P.; JONES, R.E. (Ed.). **Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications**. San Diego: Academic Press, 1991, v. 4, pt. A, p. 205-302.
- JONES, M. T.; BRUSH, F. R.; NEAME, R. L. B. Characteristics of fast feedback control of corticotrophin release by corticosteroids. **Journal of Endocrinology**, v. 55, p. 489-493, 1972.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995.
- KAMAU, J. M.; PATRICK, B. T.; MUSHI, E. Z. The effect of mixing and translocating juvenile ostriches (*Struthio camelus*) in Botswana on the heterophil to lymphocyte ratio. **Tropical Animal Health and Production**, v.34, p. 249-256, 2002.
- KNAPP, R.; MOORE, M. C. Male morphs in tree lizards have different testosterone responses to elevated levels of corticosterona. **General and Comparative Endocrinology**, v. 107, p. 273-279, 1997.

- KOLESNIKOVAS, C. K. M.; CATÃO-DIAS, J. L.; ALBUQUERQUE, L. C. R. e GREGO, K. F. Hematological values of brazilian pit vipers maintained in captivity. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 59, p.142, 2000.
- KREGER, M. D.; MENCH, J. A. Physiological and behavioral effects of handling and restraint in the ball python (*Python regius*) and the blue-tongued skink (*Tiliqua scincoides*). **Applied Animal Behavior Science**, v. 38, p. 323-336, 1993.
- LANCE, V. A. Evaluating pain and stress in reptiles. In: SCHAEFFER, D.O.; KLEINOW, K.M.; KRULISCH, L. (Ed.). **The care and use of amphibians, reptiles and fish in research**. Bethesda: SCAW, 1992, p. 101-106.
- LANCE, V. A. Stress in reptiles. In: EPPLE, A.; SCANES, C. G. E STETSON, M. H. (Eds.). **Prospects in Comparative Endocrinology**. 1990. New York: Wiley-Liss, p. 461-466.
- LANCE, V. A.; ELSEY, R. M. Stress-induced suppression of testosterone secretion in male alligators. **Journal of Experimental Zoology**, v. 239, p. 241-246, 1986.
- LE MEVEL, J. C.; ABITBOL, S.; BERAUD, G.; MANIEY, J. Temporal changes in plasma adrenocorticotropin concentration after repeated neurotropic stress in male and female rats. **Endocrinology**, v. 105, p. 812-817, 1979.
- LECETA, J.; ZAPATA, A. Seasonal variations in the immune response of the tortoise *Mauremys caspica*. A morphometrical, light microscopical study. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 9, p. 653-668, 1985.
- LICHT, P.; WOOD, J. F.; WOOD, F. E. Annual and diurnal cycles in plasma testosterone and thyroxine in the male green sea turtle *Chelonia mydas*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 57, p. 335-344, 1985.
- MAHAPATRA, M. S.; MAHATA, S. K.; MAITI, B. R. Effect of stress on serotonin, norepinephrine, and corticosterone contents in the soft-shelled turtle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.18, p.719-724, 1991.
- MAHMOUD, I. Y.; LICHT, P. Seasonal changes in gonadal activity and the effects of stress on reproductive hormones in the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 107, p. 359-372, 1997.
- MARRA, P. P.; HOLBERTON, R. L. **Corticosterone levels as indicators of habitats quality**: effects of habitat segregation in a migratory bird during the non-breeding season. **Oecologia**, v. 116, p. 284-292, 1998.
- MATHIES, T.; FELIX, T. A.; LANCE, A. Effects of trapping and subsequent short-term confinement stress on plasma corticosterone in the brown treesnake (*Boiga irregularis*) on Guam. **General and comparative Endocrinology**, v. 124, p. 106-114, 2001.
- McEWEN, B. et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Reviews**, v. 23, p. 79, 1997.
- MEAD, R. A.; EROSCHENKO, V. P.; HIGHFILL, D. R. Effects of progesterone and estrogen on the histology of the oviduct of the garter snake, *Thamnophis elegans*. **General Comparative Endocrinology**, v. 45, p. 345-354, 1981.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. e HADDAD, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Editora Saraiva, 2003, cap.I, p. 33-61.

- MICHAEL, A. E.; COOKE, B. A. A working hypothesis for the regulation of steroidogenesis and germ cell development in the gonads by glucocorticóides and 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 100, p. 55-63, 1994.
- MIZOCK, B. A. Alterations in carbohydrate metabolism during stress: a review of the literature. **American Journal of Medicine**, v. 98, p. 75-84, 1995.
- MOBERG, G. P. Biological response to stress: key to assessment of animal well-being? In: MOBERG, G. P. (Ed.). **Animal Stress**. Maryland: Bethesda, 1985, p. 27-49.
- MOORE, F. L.; DEVICHE, P. Neuroendocrine processing of environment information in amphibians. In: STETSON, M.H. (Ed.). **Processing of environmental information in vertebrates...** New York: Springer-Verlag, 1988, p. 19-45.
- MOORE, F. L.; MILLER, L. J. Stress-induced inhibition of sexual behavior: corticosterone inhibits courtship behaviors of a male amphibian (*Taricha granulosa*). **Hormones and Behavior**, v. 18, p. 400-410, 1984.
- MOORE, F. L.; ZOELLER, R. T. Stress-induced inhibition of reproduction: evidence of suppressed secretion of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in an amphibian. **General and Comparative Endocrinology**, v. 60, p. 252-258, 1985.
- MOORE, I. T.; GREENE, M. J.; MASON, R. T. Environmental and seasonal adaptation of the adrenocortical and gonadal responses to capture stress in two population of the male garter snake, *Thamnophis sirtalis*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 289, p. 99-108, 2001.
- MOORE, I. T.; JESSOP, T. S. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 39-47, 2003.
- MOORE, I. T.; LeMASTER, M. P.; MASON, R. T. Behavioural and hormonal responses to capture stress in the male red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. **Animal Behaviour**, v. 59, p. 529-534, 2000.
- MOORE, I. T.; THOMPSON, C. W.; MARLER, C. A. Reciprocal changes in corticosterone and testosterone levels following acute and chronic handling stress in the tree lizard, *Urosaurus ornatus*. **General Compendium of Endocrinology**, v. 81, p. 217-226, 1991.
- MOORE, M. C. E; LINDZEY, J. The physiological basis of sexual behavior in male reptiles. In: GANS, C. e CREWS, D. **Biology of the Reptilia**. Chicago: University Chicago Press, 1992, v. 18, p. 70-113.
- MORICI, L. A.; ELSEY, R. M; LANCE, V. A. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 279, p. 156-162, 1997.
- MUNCK, A.; GUYRE, P.; HOLBROOK, N. Physiological functions of glucocorticóides in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocrinology Review**, v. 5, p. 25-45, 1984.
- NATT, M.P.; HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, p. 735-738, 1952.
- NAULLEAU, G.; FLEURY, F. Cycles annuels de la testostéronémie et de la thyroxinémie chez *Vipera berus* L. (Reptilia: Viperidae) en relation avec le cycle sexuel et l'hivernage (Annual cycles of plasma testosterone and thyroxine levels in *Vipera berus* L. (Reptilia: Viperidae) in relation with

sexual cycle and hibernation). **Amphibia-reptilia**, v. 9, p. 33-42, 1988.

NAULLEAU, G.; FLEURY, F.; BOISSIN, J. Annual cycles in plasma testosterone and thyroxine in the male aspic viper *Vipera aspis* L., (Reptilia, Viperidae), in relation to the sexual cycle and hibernation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 65, p. 254-263, 1987.

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

NORRIS, D. O.; FELT, S. B.; WOODLING, J. D.; DORES, R. M. Immunocytochemical and histological differences in the interrenal axis of feral brown trout, *Salmo trutta*, in metal-contaminated waters. **General and Comparative Endocrinology**, v. 108, p. 343-351, 1997.

OLIVEIRA, J. L. Cronologia do Instituto Butantan (1888-1981) 1ª parte: 1888-1945. **Memórias do Instituto Butantan**, v 44/45, p. 11-79, 1981.

ORTH, D. N.; KOVACS, W. J.; DEBOLD, C. R. **The adrenal cortex**. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D. W. (Ed.). *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992, p. 489-620.

PALMER, B.; GUILLETTE, L. Jr. Oviductal proteins and their influence on embryonic development in birds and reptiles. In: DEEMING, D.C.; FERGUSON, M.W.J.(Ed). **Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 29-46.

PARKER, O. S. Some blood values of the western diamond-back rattlesnake (*Crotalus atrox*) from South Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 13, p. 269-272, 1977.

PHILLIPS, J. G.; POOLSANGUAN, W. A method to study temporal changes in adrenal activity in relation to sexual status in the female laboratory rat. **Journal of Endocrinology**, v. 77, p. 283-291, 1978.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. CARRAGHER, J. AND SUMPTER. J. P. Cortisol-induced lymphocitopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. **General Compendium of Endocrinology**, v. 53, p. 252-259, 1984

RILEY, D.; KLEIS-SAN FRANCISCO, S. M.; CALLARD, I. P. A plasma steroid hormone binding protein in the viviparous water snake, *Nerodia*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 71, p. 419-428, 1988.

RIVIER, R. J.; RIVEST, S. Effect on stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 523-532, 1991.

ROBIN, J.; BOUCONTET, L.; CHILLET, P.; GROSCOLAS, R. Behavioral changes in fasting emperor penguins: evidence for a "refeeding signal" linked to a metabolic shift. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. 746-753, 1998.

ROCHA-E-SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin: a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. **American Journal of Physiology**, v. 156, p. 261-273, 1949.

ROMERO, L. M.; WIKELSKI, M. Corticosterone levels predict survival probabilities of Galapagos marine iguanas during El niño events. **Proceedings of the Natinal Academy of Science**, v. 98, p. 7366-7370, 2001.

- ROSENFELD, G. Corante pancromático para hematologia e citologia humana. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 328-334, 1947.
- ROTH, J.A. Cortisol as mediator of stress. In: MOBERG, G.P (Ed.). **Animal stress**. Marylnad: Bethesda, 1985, p. 225-243.
- RUPIK, W. Early development of the adrenal glands in the grass snake *Natrix natrix* (Lepidossauria, Serpentes). **Advances in Anatamic Embryology and Cell Biology**, v. 164, p. 1-102, 2002.
- SAAD, A.; RIDI, R. E.; DEEB, S. E.; SOLIMAN, M. Corticosteroids and immune system in the lizard *Chalcides ocellatus*. **Development and Comparative Immunology**, v. 11, p. 141-151, 1988.
- SAINT GIRONS, M. C. Morphology of the circulating. In: GANS, C.; PARSON, T.C. (Ed.). **Biology of the reptilia**. New York: Academic Press, 1970, p. 73-91.
- SALOMÃO, M. G.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. The reproductive cycle of male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M.G.; GREEN, H. W. **Biology of the vipers**. 2002. Texas: Eagle Mountain Publishing. P. 507-514.
- SANO-MARTINS, I.S.; DABROWSKI, Z.; TABAROWSKI, Z.; WITKOWSKA-PELC, E.; DENELLE SPADACCI MORENA, D.; SPODARYK, K. Haematopoiesis and a new mechanism for the release of mature blood cells from the bone marrow into the circulation in snakes (Ophidia). **Cell and Tissue Research**, v.310, p. 67-75, 2002.
- SANO-MARTINS, I. S; SANTORO, M. L. Distúrbios hemostáticos em envenenamento por animais peçonhentos no Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.OS.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S. e HADDAD, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Editora Saraiva, 2003, cap. 31, p.289-310.
- SAPOLSKY, R. M. Neuroendocrinology of the stress response. In: BECKER, J. B.; BREEDLOVE, S. M.; CREWS, D. (Ed.). **Behavioral endocrinology**. Cambridge, MIT Press, 1992, p. 287-324.
- SAPOLSKY, R. M. Stress, social status and reproductive physiology in free-living baboons. In: CREWS, D. (Ed). **Psychobiology of reproductive behavior**. New York: Prentice – Hall, 1987, p. 291-322.
- SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrinology Review**, v. 21, p. 55-89, 2000.
- SCHRAMM, B. G.; CASARES, M.; LANCE, V. A. Steroid levels and reproductive cycle of the Galápagos tortoise, *Geochelone nigra*, living under seminatural conditions on Santa Cruz Island (Galápagos). **General and Comparative Endocrinology**, v. 114, p. 108-120, 1999.
- SCHUELL, G. W.; HARLOW, H. J.; ROSE, J. D.; KIRK, E. A.; MURCOCH, W. J. Levels of plasma corticosterona and testosterone in male copperheads (*Agkistrodon contortix*) following staged fights. **Hormones and behavior**, v.90, p. 60-68, 1996.
- SCHUELL, G. W.; HARLOW, H. J.; ROSE, J. D.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Annual Cycle of Plasma Testosterone in Male Copperheads, *Agkistrodon contortrix* (Serpentes, Viperidae): Relationship to Timing of Spermatogenesis, Mating, and Agonistic Behavior. **General and Comparative Endocrinology**, v. 105, p. 417-424, 1997.
- 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.
- SILVERIN, B. Behavioural and hormonal responses of the pied fly catcher to environmental stressors. **Animal Behavior**, v. 55, p. 1411-1420, 1998.
- SMITHSON, G.; COUSE, J. F.; LUBAHN, D. B.; KORACH, K. S.; KINCADE, P. W. The role of estrogen receptors and androgen receptors in sex steroid regulation of B lymphopoiesis. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 27-34, 1998.
- STEPHENS, D. B. Stress and its measurement in domestic animals: a review of behavioral and physiological studies under field and laboratory conditions. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 24, p. 179-210, 1980.
- TROIANO, J. C.; VIDAL, J. C.; GOULD, E. F. HEKER, J.; GOULD, J.; VOGT, A. U.; SIMONCINI, E.; AMANTINI, E.; DE ROODT, A. Hematological values of some Bothrops species (Ophidia – Crotalidae) in captivity. **Journal of Venomous .Animals and Toxins**, v. 6, n. 2, 2000.
- TYRELL, C. L.; CREE, A. Relationships between corticosterona concentration and season, time and confinement in a wild reptile (tuatara, *Sphenodon punctatus*). **General and Comparative Endocrinology**, v.110, p. 97-108, 1998.
- VALVERDE, R. A.; OWENS, D. W.; MACKENZIE, D. S.; AMOSS, M. S. Basal and stress-induced corticosterona levels in olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*) in relation to ther mass nesting behavior. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, p. 652-662, 1999.
- VAZ, E. **Fundamentos da história do Instituto Butantan e seu desenvolvimento**. São Paulo: Instituto Butantan. 1949. 123 p.
- VIAU, V.; MEANEY, M. J. Basal and stress hypothalamic-pituitary-adrenal activity in cycling and ovariectomized-steroid treated rats. **Endocrinology**, v. 129, p. 2503-2511, 1991.
- VLECK C. M., VERTALINO, N; VLECK, D.; BUCHER, T. L.. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie Penguins. **Condor**, v. 102, p. 392-400, 2000.
- WAUGH, R. E.; HSU, L. L.; CLARK, P.; CLARK Jr, A. Analysis of cell egress in bone marrow. In: MEISELMAN, H.J.; LICHTMAN, M.A.; LACELLE, P. (Ed). **White cell mechanics**: basic science and clinical aspects. New York: Alan R. Liss, 1984, p. 221-236.
- WEBER, J. Pathways for oxidative fuel provision to working muscles: Ecological consequences of maximal supply limitations. **Experientia**, v. 48, p. 557-564, 1992.
- WEIL, M.R. Comparison of plasma and testicular testosterone levels during the active season in the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 81, p. 585 – 587, 1985.
- WEIL, M. R.; ALDRIDGE, R. D. Seasonal androgenesis in the male water snake, *Nerodia sipedon*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 44, p. 44-53, 1981.
- WHITE, F. N.; SOMERO, G. Acid-base regulation and phospholipids adaptation to temperature: Time course and physiological significance of modifying the milieu for protein function. **Physiology Review**, v. 62, p. 40-90, 1982.
- WHITTIER, J. M.; TOKARZ, R R. Physiological regulation of sexual behavior in female reptiles. In: GANS,C.; CREWS, D. **Biology of the Reptilia**. Chicago: University Chicago Press, 1992, v. 18, p. 24-69.

WIDMAIER, E. P. Glucose homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis during development in rats. **American Journal of Physiology**, v. 259, p. E601-E613, 1990.

WILSON, B. S.; WINGFIELD, J. C. Correlation between female reproductive condition and plasma corticosterona in the lizard (*Uta stansburiana*). **Copeia**, v.3, p. 691-697, 1992.

WINGFIELD, J.C. Changes in reproductive function of free-living birds in direct response to environmental perturbations. In: STETSON, M. H. (Ed.). **Processing of Environmental Information in Vertebrates**. New York: Springer-Verlag, 1988. p. 121-148.

WINGFIELD, J. C. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. In: Davey, K.G.; Peter, R.E. e Tobe, S.S. (Ed.). **Perspectives in comparative endocrinology**. Ottawa: National Research Council of Canada, 1994, p.520-528.

WINGFIELD, J. C.; MANEY, D. L.; BREUNER, C. W.; JACOBS, J. D.; LYNN, S.; RAMENOFISKY, M.; RICHARDSON, R. D. Ecological bases of hormone-behavior interactions: The “emergency life history stage”. **American Zoology**, v. 38, p. 191-206, 1998.

WINGFIELD, J.C.; RAMENOFISKY, M. The Hypothalamo-pituitary-adrenal axis in comparative context. In: BALM, P. H. M. (Ed.). **Stress Physiology in animals**. England: Sheffield Academic Press, 1999, cap. 1, p. 3-44.

WINGFIELD, J. C.; ROMERO, L. M. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. In: MCEWEN, B.S.; GOODMAN, H.M (Ed.). **Handbook of physiology**. New York: Oxford University Press, 2001. Sec. 7, v. 4, p. 211-234.

WINGFIELD, J. C.; SILVERIN, B. Effects of corticosterona on territorial behavior of free-living male song sparrows *Melospiza melodia*. **Hormones and Behavior**, v. 20, p. 405-417, 1986.

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.

YAO, G.; LIANG, J.; HAN, X.; HOU, Y. In vivo modulation of the circulating lymphocyte subsets and monocytes by androgen. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1853-1860, 2003.

YOUNG, L. A.; PAVLOVSKA-TEGLIA, G.; STODULSKI, G.; HAU, J. E. Effect of group housing and oral corticosterone administration on weight gain and locomotor development in neonatal rats. **Animal Welfare**, v.5, p. 167-176, 1996.

ZACARIOTTI, R. L. Estudo longitudinal do espermograma e dos níveis de testosterona sérica de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) provavelmente da natureza do Estado de São Paulo. 2004.80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ZAPATA, A. G.; VARAS, A.; TORROBA, M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. **Immunology Today**, v. 13, p. 142-147, 1992.

ZERANI, M.; GOBBETTI, A. Corticosterone during the annual reproductive cycle and in sexual behavior in the crested newt, *Triturus carnifex*. **Hormones and behavior**, v. 27, p. 29-37, 1993.

ZIPPEL, K. C.; LILLYWHITE, H. B.; MLADINICH, C. R. J. New vascular system in reptiles: anatomy and postural hemodynamics of the vertebral venous plexus in snakes. **Journal of Morphology**, v. 250, p. 173-184, 2001.