SÁVIO STEFANINI SANT'ANNA

Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro:
caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA
e do comprimento materno e correlação com o uso do solo

São Paulo
2014

SÁVIO STEFANINI SANT'ANNA

Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro:
caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA
e do comprimento materno e correlação com o uso do solo

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 Luiz Catão Dias

São Paulo

2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3008
FMVZ

Sant'anna, Sérgio Stefanini

Malformações em viperídeos neotrópicos do sudeste brasileiro: caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA e do comprimento materno e correlação com o uso do solo / Sérgio Stefanini Sant'anna. – 2014.
95 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão Dias.

1. Anomalias congênitas. 2. *Bothrops jararaca*. 3. *Crotalus durissus*. 4. Dismorfologia. 5. Ensaio de cometa. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste Brasileiro: caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA e do comprimento materno e correlação com o uso do solo", protocolado sob o nº 2691/2012, utilizando 500 (quinhentos) camundongos, 180 (cento e oitenta) serpentes adultas e 3300 (três mil e trezentos) filhotes de serpentes, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/9/2012.

We certify that the Research "Malformations in neotropical viperids of southeastern Brazil: anatomical and pathological characterization, analysis of DNA integrity and maternal length and correlation with land use", protocol number 2691/2012, utilizing , under the responsibility Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/19/2012.

São Paulo, 22 de julho de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500. CEP 05503-900. São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Correlação entre a ocorrência de malformações congênitas em serpentes peçonhentas neotropicais e o uso agrícola do solo no sudeste brasileiro” **protocolo nº 812/11**, sob a responsabilidade de Sávio Stefanini Sant'Anna, está de acordo com os Princípios Éticos na 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) em reunião de 10/03/2011.

We certify that the research entitled “Correlation between the occurrence of congenital malformations in neotropical poisonous snakes and agricultural use of land in southeastern Brazil”, **protocol nº 812/11**, under the responsibility of Sávio Stefanini Sant'Anna, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 03/10/2011.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
03/2011 – 02/2013 Laboratório de Herpetologia	120 <i>Bothrops jararaca</i> adultas 60 <i>Crotalus durissus</i> adultas 270 filhotes de <i>Bothrops jararaca</i> 90 filhotes de <i>Crotalus durissus</i>

São Paulo, 17 de março de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 34863-2	Data da Emissão: 25/07/2013 18:14	Data para Revalidação*: 24/08/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Sávio Stefanini Sant'Anna	CPF: 130.023.398-22
Título do Projeto: Correlação entre a ocorrência de malformações congênitas em serpentes peçonhentas neotropicais e o uso agrícola do solo no sudeste brasileiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	colheita do material biológico	08/2012	03/2014
2	análise do material coletado	08/2012	06/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Ressalta-se que ao ICMBio/SISBIO cabe apenas a AUTORIZAÇÃO da pesquisa ora pleiteada pelo Biólogo MSc Sávio Stefanini Sant'Anna, Pesquisador Científico do Butantan e Doutorando em Patologia Experimental e Comparada junto a USP/FMVZ. Desta forma, sugerimos que a questão do recebimento, pelo Butantan, de serpentes coletadas de forma irregular, por pessoas NÃO HABILITADAS e NÃO AUTORIZADAS órgão competente, caracteriza uma TERCEIRIZAÇÃO DE COLETA, situação essa que carece ser oficialmente reportada ao IBAMA-SP, para que o mesmo possa analisar a questão à luz da legislação ambiental vigente, com vistas a se chegar a um denominador comum sobre essa prática do Butantan, qual seja a de receber, como 'doação', animais silvres entregues pela população em geral.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Kathleen Fernandes Grego	colaboradora	851.044.347-53	067170985 IFP-RJ	Brasileira
2	Marcelo Pires Nogueira de Carvalho	colaborador	333.781.038-17	43.299.894-9 SSP-SP	Brasileira
3	José Luiz Catão Dias	colaborador	029.597.888-00	8914397-8 SSP-SP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11366596

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 34863-2	Data da Emissão: 25/07/2013 18:14	Data para Revalidação*: 24/08/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Sávio Stefanini Sant'Anna	CPF: 130.023.398-22
Título do Projeto: Correlação entre a ocorrência de malformações congênitas em serpentes peçonhentas neotropicais e o uso agrícola do solo no sudeste brasileiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO PAULO	SP	Instituto Butantan	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Crotalus durissus, Bothrops jararaca
2	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Crotalus durissus, Bothrops jararaca

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue
---	-------------------------------	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	INSTITUTO BUTANTAN	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11366596

Página 2/4

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 34863-2	Data da Emissão: 25/07/2013 18:14	Data para Revalidação*: 24/08/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Sávio Stefanini Sant'Anna	CPF: 130.023.398-22
Título do Projeto: Correlação entre a ocorrência de malformações congênitas em serpentes peçonhentas neotropicais e o uso agrícola do solo no sudeste brasileiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11366596

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 34863-2	Data da Emissão: 25/07/2013 18:14	Data para Revalidação*: 24/08/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Sávio Stefanini Sant'Anna	CPF: 130.023.398-22
Título do Projeto: Correlação entre a ocorrência de malformações congênitas em serpentes peçonhentas neotropicais e o uso agrícola do solo no sudeste brasileiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 11366596

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANT'ANNA, Sávio Stefanini

Título: Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro: caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA e do comprimento materno e correlação com o uso do solo.

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: _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento _____

*À minha esposa, Ivone
E às minhas filhas,
Flávia e Débora que me fazem lembrar
diariamente como é bom viver*

AGRADECIMENTOS

Um trabalho como este não é fruto de quatro anos nem tampouco de uma única pessoa. Um trabalho como este só é possível com o amadurecimento de anos e a colaboração de muitos, muitos amigos. Alguns já conhecia, outros foram sendo agregados. Sinto-me privilegiado de poder agradecê-los.

Agradeço Prof. Doutor José Luiz Catão Dias, orientador e mestre, que desde o primeiro dia aceitou o desafio, e durante todo tempo sob sua orientação pude aprender muito sobre patologia, ciência, ética e tudo mais. Foram momentos de grande enriquecimento como cientista e pessoa.

À Wilson Fernandes, mais que meu chefe, meu guia nos caminhos da Herpetologia. Muito do que sou como pesquisador, devo a ele. Acolheu-me no Laboratório de Herpetologia me ensinou a amar as serpentes e o Butantan.

À Dra. Kathleen Fernandes Grego, grande amiga. Começamos juntos, trilhamos muitos caminhos científicos unidos e espero compartilhar com ela muito mais. Uma diretora com quem tenho muito orgulho de trabalhar.

À Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo, companheira de sala, com quem divido minhas aflições, mas que sempre tem uma palavra de conforto e que liberou os equipamentos quando precisei.

Ao Dr. Daniel Rodrigues Stuginski, amigo, ex-estagiário, mas que há muito me ultrapassou e com quem posso ficar horas e horas conversando sobre herpetologia.

À Marcelo Carvalho, com quem compartilhei o material coletado, e que em momentos de fraqueza durante o meu doutorado, trazia um sopro de esperança e ânimo com seus resultados

Aos assistentes de pesquisa Eliana e Marisa e aos técnicos do Laboratório de Herpetologia do IBu, Bruno, Cintia, Renato, Patrícia Abu, Patrícia, Jarbas, colegas que me ajudaram nas atividades com as serpentes.

À Karen, porque naqueles primeiros dias do cometa eu não teria conseguido sem você.

Aos várias bolsistas da FUNDAP/PAP que passaram nesses últimos anos pelo Laboratório de Herpetologia, Marília, Jeanine, Paula, Philipp, Ana Paula, Aline, Daniela, Diego, Bigal, Diego Rúbio. Sempre me auxiliaram a cuidar das jararacas e cascavéis e quando os filhotes nasciam me ajudavam a fazer as biometrias e necropsias.

Ao pessoal de apoio no Butantan, sem os quais o Laboratório de Herpetologia não anda: Rosângela, Luan, Toninho, Jovelino, Carlão, Dona Vera, Dona Lúcia, Cláudio, Josefa.

À Dra. Eliana Nakano e ao Dr. Alessandro Pinheiro, do Laboratório de parasitologia IBu, que me ensinaram a técnica do ensaio do cometa, contribuindo significativamente para o desenho final deste estudo.

À Ivan Novaski, técnico de imagem do LETA no IBu, que me acompanhou nos exames das lâminas no ensaio do cometa.

Aos estudantes, estagiários e pós-graduandos do Lapcom, apesar da pouca convivência, sempre foi muito prazeroso estar ao lado de vocês. Com muitos compartilhei horas em salas de aula, com outros momentos na WDA-LA, mas com todos a certeza de estarmos no mesmo barco. Alexandre, Angélica, Ralph, Kátia Groch, Cátia Dejuste, Marina, Cláudia, Stefanie, Roseli, Omar, Fabíola, Juliana, Sândara, Silmara, Valéria.e tantos outros.

Ao Jorge Oyakawa do Lapcom, pois quando eu chegava ao laboratório estava sempre disposto a ajudar, mesmo tendo centenas de outros afazeres.

Às Doutoradas Carla Batista Lorigados e Ana Carlonia B. de C. Fonseca Pinto do Departamento de Cirurgia da FMVZ, pelas sessões e auxílio na análise das imagens radiográficas das serpentes.

Aos técnicos em radiologia da FMVZ-USP, Hugo Idalgo e Reginaldo Barbosa pela paciência e colaboração em todos os momentos que necessitei.

À Dra. Eliana Reiko Matushima e ao Dr. Marcelo Barros Vaz Guimarães, dois profissionais que admiro muito, e que com seus relevantes e importantes comentários na Qualificação colaboraram com esse produto final.

Aos funcionários da Biblioteca da FMVZ, Virginie Buff D'Apice, ajudando de forma incondicional quando solicitados, especialmente à Estela Madruga, Evadne Azeredo Will, Sandra Toledo, Elza Faquim, Elena Tanganini, e Michelle Alves.

Ao Dr. Mário Ramos Barroso, amigo desde os tempos da faculdade, e que me ajudou nos mapas e análises geográficas

Ao Dr. Osvaldo Sant'Anna, representando o INCTTOX, que financiou os reagentes que necessitei para este estudo.

Aos meus pais, a quem devo agradecer sempre e por tudo.

À minha generosa família, Ivone, Flávia e Débora que souberam compreender a importância deste trabalho para mim e entenderam porque muitas vezes eu não pude dar a atenção que elas mereciam.

RESUMO

SANT'ANNA, S. S. **Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro:** caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA e do comprimento materno e correlação com o uso do solo [Malformations in Neotropical viperids of Southeastern Brazil: anatomical and pathological characterization, analysis of DNA integrity and maternal length and correlation with land use]. 2014. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Malformações ou anomalias congênitas são deformidades que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e que, no caso dos répteis podem ter diversas causas, como genética, temperatura, radiação ou contaminantes entre outros fatores. Este estudo verificou as malformações em filhotes recém-nascidos de jararaca (*Bothrops jararaca*) e cascavel (*Crotalus durissus*) de fêmeas prenhes recém-capturadas na natureza (323 e 41 ninhadas respectivamente) do sudeste brasileiro. Após o nascimento, os filhotes foram medidos, pesados e o sexo foi verificado. Realizamos análise macroscópica em busca de malformações perceptíveis e conduzimos exames radiográficos a fim de descrever e documentar as anomalias. As jararacas apresentaram 129 indivíduos malformados entre 5427 recém-nascidos (2,4%); e as cascavéis tiveram 50 serpentes malformadas em 391 nascidos (12,7%). Anomalias na coluna vertebral foram as mais comuns para as duas espécies, seguidas de fusão nas placas ventrais e malformações oculares. Os filhotes de jararaca apresentaram uma maior variedade de malformações como esquissossomia, cauda retorcida, bicefalia e hidrocefalia, não encontradas em cascavéis. O Ensaio do Cometa não apresentou diferença estatística significativa no índice de dano do DNA (ID) das células das mães que pariram filhotes normais e das que pariram filhotes malformados. Os dois grupos apresentaram células com diferentes graus de dano no DNA. Quando comparamos o tamanho das mães e a frequência de malformações encontramos uma regressão positiva ($r^2 = 0,67$). Devido à relação positiva entre idade e tamanho nos répteis concluímos que serpentes com idade mais avançada tendem a apresentar mais filhotes com malformações. O padrão de uso do solo (urbanização, agricultura, pecuária e vegetação nativa), foi correlacionado com a presença de filhotes com malformações, utilizando o Coeficiente de Spearman. Houve uma correlação positiva entre a presença de malformações e as áreas agrícolas ($r_s = 0,67$;

$p=0,01$), mas negativa quando comparados às áreas de vegetação nativa ($r_s = -0,57$; $p=0,03$). Não houve correlação entre a pecuária ou urbanização e malformações em jararaca. Malformações em cascavel não apresentaram quaisquer correlações com o padrão de uso do solo, sendo que tal condição pode ser resultado da baixa amostragem desta espécie no presente estudo. Serpentes são animais de topo de cadeia e se mostram como bons indicadores biológicos. A presença e diversidade de malformações apresentadas, aliadas ao fato de haver correlação com os padrões do uso do solo, demonstram a necessidade de se realizar um estudo mais aprofundado e interdisciplinar das causas destes fenômenos e um monitoramento destas espécies para se ter um panorama temporal do problema.

Palavras-chave: Anomalias congênitas. *Bothrops jararaca*. *Crotalus durissus*. Dismorfologia. Ensaio do cometa.

ABSTRACT

SANT'ANNA, S. S. **Malformations in neotropical viperids of southeastern Brazil: anatomical and pathological characterization, analysis of DNA integrity and maternal length and correlation with land use** [Malformações em viperídeos neotropicais do sudeste brasileiro: caracterização anatomo-patológica, análise da integridade do DNA e do comprimento materno e correlação com o uso do solo]. 2014. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Malformations or congenital anomalies are deformities that occur during embryonic development and in the case of reptiles may have several causes, such as genetics, temperature, radiation, contaminants and other factors. This study assessed malformations in newborn of pit viper (*Bothrops jararaca*) and South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) from wild captured pregnant females (323 and 41 litters respectively) in southeastern Brazil. Newborn snakes were measured, weighed, sexed and studied grossly and by radiography for the presence of malformations. We performed macroscopic analysis in search of noticeable defects and radiographic examinations conducted in order to describe and document the deficiencies. A hundred twenty -nine malformed pit vipers were identified from 5,427 births (2.4%), while 50 malformed rattlesnakes were found from 391 births (12.7%). Spinal abnormalities were the most common in both species, followed by fusion of ventral scales. Pit vipers showed a greater range of malformations including schistosomia, kinked tail, bicephaly and hydrocephaly. There was no statistically significant difference in the index of DNA damage (ID) determined by the Comet Assay in the erythrocytes of mothers that delivered normal litters compared to the erythrocytes of the ones that delivered malformed neonates, both groups containing cells with different degrees of DNA damage. When comparing the length of the pit viper mothers with the frequency of malformations, a positive regression ($r^2 = 0.67$) was found. Due to the positive relationship between age and size in snakes we conclude that older animals tend to have more malformed offspring. The patterns of land use (urbanization, agriculture, livestock and native vegetation) have been correlated with the presence of neonates with malformations. There was a positive correlation between the presence of malformations in pit viper neonates and agricultural areas ($r_s = 0.67$, $p = 0.01$) but a negative one when compared to areas of native vegetation ($r_s = -0.57$, $p = 0.03$). There was no correlation

between urbanization or livestock and malformations in pit vipers. Malformations in rattlesnake did not show any correlation with the pattern of land use, and such condition could be the result of the poor sampling of this species in the present study. As snakes are in the top of the animal food-chain they are good biological indicators. The presence and diversity of malformations presented, coupled with the correlation with the patterns of land use, demonstrate the need to undertake further interdisciplinary study of the causes of these phenomena and the behavior of these species to have a temporal overview of the problem.

Keywords: Congenital anomalies. *Bothrops jararaca*. *Crotalus durissus*. Dysmorphology. Comet assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1	Imagem de uma fêmea adulta de jararaca (<i>Bothrops jararaca</i>)	29
Figura 1.2	Distribuição da jararaca (<i>Bothrops jararaca</i>)	29
Figura 1.3	Imagem de uma fêmea adulta de cascavel (<i>Crotalus durissus</i>)	30
Figura 1.4	Distribuição da cascavel (<i>Crotalus durissus</i>)	31
Figura 2.1	Exemplos de malformações encontradas neste estudo	40
Figura 2.2	Malformações em <i>Bothrops jararaca</i>	41
Figura 3.1	Filhotes de jararaca (<i>Bothrops jararaca</i>) com malformações	55
Figura 3.2	Imagens dos nucleóides de <i>Bothrops jararaca</i> após o Ensaio do Cometa	56
Figura 3.3	Índices de Dano do DNA em jararaca	56
Figura 3.4	Regressão entre tamanho de jararaca e filhotes com malformações	57
Figura 4.1	Mapa das localidades de jararaca (<i>Bothrops jararaca</i>)	70
Figura 4.2	Correlação entre porcentagem da área urbanizada dos municípios e a frequência de malformações em filhotes de jararaca	71
Figura 4.3	Correlação entre o uso do solo por atividade agrícola (porcentagem da área do município) e a frequência de malformações em filhotes de jararaca	71
Figura 4.4	Correlação entre o uso do solo por atividade pecuária (porcentagem da área do município) e a frequência de malformações em filhotes de jararaca	72
Figura 4.5	Correlação entre o a porcentagem de área do município com vegetação nativa e a frequência de malformações em filhotes de jararaca	73
Figura 4.6	Mapa das localidades de cascavel (<i>Crotalus durissus</i>)	74
Figura 4.7	Correlação entre porcentagem da área urbanizada dos municípios e a frequência de malformações em filhotes de cascavel	75
Figura 4.8	Correlação entre o uso do solo por atividade agrícola (porcentagem da área da microrregião) e a frequência de malformações em filhotes de cascavel	75
Figura 4.9	Correlação entre o uso do solo por atividade pecuária (porcentagem da área do município) e a frequência de malformações em filhotes de cascavel	76
Figura 4.10	Correlação entre o a porcentagem de área do município com vegetação nativa e a frequência de malformações em filhotes de cascavel	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 CAPÍTULO I - MALFORMAÇÕES EM VIPERÍDEOS NEOTROPICAIS: UMA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA	33
2.1 INTRODUÇÃO	34
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.3 RESULTADOS	37
2.4 DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	45
3 CAPÍTULO II - ANÁLISE COMPARATIVA DA INTEGRIDADE DO DNA EM FÊMEAS DE JARARACAS (<i>BOTHROPS JARARACA</i>) PROGENITORAS DE FILHOTES MALFORMADOS	49
3.1 INTRODUÇÃO	50
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.3 RESULTADOS	54
3.4 DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	61
4 CAPÍTULO III - CORRELAÇÃO ENTRE AS MALFORMAÇÕES DE VIPERÍDEOS NEOTROPICAIS E O PADRÃO DE USO DO SOLO NO SUDESTE BRASILEIRO	65
4.1 INTRODUÇÃO	66
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	67
4.3 RESULTADOS	68
4.4 DISCUSSÃO	77
REFERÊNCIAS	81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS GERAIS	87
APÊNDICES	93

1 INTRODUÇÃO

Os humanos sempre tiveram as malformações como um fator presente na sua cultura. Desde os primórdios da humanidade existem indícios da preocupação com as anomalias congênitas, em esculturas do período neolítico da Ásia Menor de 6500 a.C. ou na mais antiga citação escrita datando de 4.000 anos, registrada em tábuas de argila na Babilônia (WARKANY, 1972). Para os Babilônios, que acreditavam no poder das estrelas e constelações, as malformações eram um reflexo dos astros e, portanto podiam ser usadas para prever o futuro tão bem quanto as próprias estrelas. Este aspecto permeou a cultura grega e romana e a palavra latina *monstrum* deriva de *mostrare* (BARROW, 1971), indicando a capacidade de previsão. Esta foi também a primeira forma de explicar o aparecimento de humanos e animais malformados, ou seja, uma manifestação dos céus. Ainda no campo do sobrenatural, quase todas as culturas criaram seres místicos, tanto deuses como demônios, e não é difícil de aceitar que tenham tido origem a partir de indivíduos, animais ou humanos, com anomalias congênitas. Como exemplos, temos Cérbero, o cão com três cabeças, a Hidra, um ser com várias cabeças de serpentes, e o deus romano Janus com duas cabeças, entre tantos outros (SCHUMACHER, 2004). Outra concepção muito difundida desde a Antiguidade e que até os dias de hoje encontramos resquícios na nossa cultura, é a chamada “impressão materna”. Esta teve grande aceitação até o século XIX, acreditando que os pensamentos maternos poderiam causar alterações na formação do bebê. Ainda hoje encontramos esta crença na cultura popular (SANTOS, 2005), tanto que devemos satisfazer os desejos de uma mulher grávida para que o bebê não nasça com as feições do desejo. Apesar de já existirem tentativas de explicações lógicas para o surgimento das malformações desde a antiguidade, até a época medieval perdurou o pensamento teológico e supersticioso da origem das anomalias.

A fundação da Anatomia como ciência por Vesalius, no século XVI, marcou o início da reorientação gradual de interpretação e explicação dos fenômenos de malformação, e ao final do séc. XVIII Etienne Geoffroy de Saint-Hilaire cunhou o termo Teratologia, do grego *terato* = monstro e *logos* = estudo (SCHUMACHER, 2004), que vem a ser a ciência que estuda as malformações congênitas. Mais recentemente começou-se a

usar o termo dismorfologia, já que o termo teratologia trata do estudo dos monstros e a maioria das anomalias não chega a ser monstruosidades (SMITH, 1966).

Na metade do séc. XX, as explicações para o nascimento de indivíduos com anomalias congênitas eram baseadas em causas ambientais específicas como a radiação, infecção (rubéola e toxoplasmose), deficiência do ácido fólico; causas genéticas específicas, como a relação entre genes dominantes e recessivos; e por último, causas não identificadas (FRASER, 1959). Mas a partir dos anos 60 um novo caminho se abriu devido ao uso do medicamento talidomida por mães durante a gestação. Talidomida é um derivado do ácido glutâmico usado no final dos anos 50 como sedativo. Passou também a ser utilizado contra enjoos e receitado para mulheres durante a gravidez (GHOREISHI, 2014). No entanto, no final de 1961 e início de 1962, vários autores começaram a relatar casos de malformações associados ao uso de talidomida por gestantes (MCBRIDE, 1961; LENZ et al., 1962; SPEIRS, 1962). Comprovou-se que o medicamento estava associado ao nascimento de bebês com malformações nos membros (focomelia, dismelia, amelia e hipoplasticidade óssea) e anomalias congênitas em orelha, coração e órgãos internos (FRANKS; MACPHERSON; FIGG, 2004). A partir desta descoberta, muitas mudanças ocorreram na liberação de novos medicamentos para a população, mas também se percebeu a influência de substâncias químicas exógenas como causa das malformações em humanos e outros animais.

Associado a esta tragédia, as questões de saúde e ambientais causaram um aumento significativo na quantidade de pesquisas e publicações sobre agentes teratogênicos e malformações congênitas (MORGAN et al., 1988). Atualmente, produtos a serem utilizados no mercado brasileiro, como medicamentos ou insumos agrícolas, necessitam passar por testes de teratogenicidade (BRASIL, 1989; 1997).

Simultaneamente, entre o final do século XIX e início do séc. XX, ocorreu um grande desenvolvimento do uso de produtos químicos na agricultura contra pragas e doenças, baseados em compostos inorgânicos (flúor, chumbo, arsênico, mercúrio entre outros). Esta foi chamada de primeira geração de agrotóxicos (ALVES FILHO, 2002). Em 1932, a síntese de um inseticida a base de tiocianato inaugura a segunda geração de agrotóxicos, que são compostos por organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (FARIA, 2009). O dicloro-difenil-tricloroetano ou DDT, por exemplo, foi usado largamente no pós Segunda Guerra Mundial até início dos anos 70 para controle de mosquitos vetores de doenças e na agricultura. No entanto, a publicação do livro

Primavera Silenciosa (*The Silent Spring*, CARSON (1962) aliada a artigos científicos (MOORE, 1967; RATCLIFFE, 1967; SELBY et al., 1969), demonstrando os perigos destes compostos que não eram específicos e persistiam no ambiente, fizeram com que os inseticidas clorados fossem banidos dos Estados Unidos da América em 1972 (COPE; LEIDY; HODGSON, 2004).

No Brasil, é a partir do pós-guerra que se intensifica o uso dos praguicidas. De acordo com Paschoal (1979), os primeiros produtos empregados no país para o controle de pragas foram os de origem mineral e vegetal. O primeiro inseticida orgânico - sintético a ser usado foi o DDT, introduzido no Brasil em fins de 1943, sob a denominação de Gesarol. Junto com o Estado do Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná são os estados que sofreram maior impacto do uso de praguicidas, ou pelo menos são os que se têm mais informações (PASCHOAL, 1979). O consumo de agrotóxicos, expresso em quantidades de ingrediente ativo, passou de 16 mil toneladas em 1964 (RUEGG et al., 1987) para 60,2 mil toneladas em 1991 (FUTINO; SILVEIRA, 1991; GOELLNER, 1993). Nos anos 80, o Brasil tornara-se o terceiro consumidor mundial de agrotóxicos, sobre uma estrutura institucional precaríssima, em termos de legislação, pesquisa, fiscalização, comercialização, formação, ética profissional e extensão rural (PASCHOAL, 1983). Esta situação continua, sendo que cerca de 50% dos agricultores que fazem uso de agrotóxicos não receberam orientação técnica para tal (IBGE, 2009). Neste contexto de uso, muitas vezes indiscriminado de praguicidas e fertilizantes químicos, é que sobrevive a fauna selvagem.

Independente da espécie animal em questão, existem princípios básicos na teratogenia. Entre estes, temos que a suscetibilidade ao agente teratogênico varia dependendo do estágio de desenvolvimento, e que as manifestações do agente são dose-dependente (WILSON, 1959).

A espécie humana possui cerca de 2-3% das crianças nascidas apresentando anomalias identificáveis ao nascer (ROGERS; KAVLOCK, 1998). Uma estimativa de Brent e Beckman (1990) creditam de 15-20% das malformações nos seres humanos a fatores genéticos, cerca de 10% a fatores ambientais e 65% a fatores desconhecidos. Se para espécie humana, que é uma das mais estudadas, a causa de mais da metade das malformações não é conhecida, o que se pode afirmar sobre os animais silvestres?

De maneira geral, a teratologia da fauna selvagem muitas vezes se restringe a relatos anedóticos (HELLGREN et al., 1984; LINNEHAN, 1989; POWELL et al., 2009).

Pesquisas que apresentam resultados envolvendo uma gama maior de indivíduos, como é o caso do estudo de Trupkiewicz, Gulland e Lowenstine (1997) com elefantes marinhos (*Mirounga angustirostris*), são raros. Para anfíbios esta situação é diferenciada. Desde a descoberta de diversos anfíbios com malformações em Minnesota (KAISER, 1997; SCHMIDT, 1997), muitos artigos surgiram com este grupo animal (ANKLEY et al., 2002; ANKLEY et al., 2004; TAYLOR et al., 2005).

Para os répteis, e principalmente para as serpentes, a grande maioria é relato de casos de bicefalia (AMARAL, 1926; BELLUOMINI, 1959; BELLUOMINI; LANCINI, 1960; BELLUOMINI, 1965; BELLUOMINI et al., 1978; ORÓS et al., 1997), associados a uns poucos casos de malformações na coluna (PENDLEBURY, 1976; BELLAIRS, 1981; ANDRADE; ABE, 1992; ROTHSCCHILD; SCHULTZE; PELLEGRINI, 2012).

A serpente *Bothrops jararaca* Wied 1824, ou jararaca (figura 1.1), é um viperídeo neotropical cuja distribuição vai do estado da Bahia ao Rio Grande do Sul no Brasil e norte da Argentina (figura 1.2)(CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 2004) coincidindo com o Domínio Morfoclimático Tropical Atlântico ou Mata Atlântica (AB'SABER, 1977). É uma espécie que habita desde áreas de Florestas Ombrófilas Densas até formações degradadas por ação antropogênica (capoeiras) e áreas de cultivo (SAZIMA, 1992). Apesar de ser encontrada em atividade durante o dia é uma espécie de hábitos noturnos, se alimentando de presas ectotérmicas (quilópodes, anfíbios e lagartos) quando jovem e modificando seu hábito alimentar à medida que cresce, passando a ingerir presas endotérmicas (roedores e aves) (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002). O ciclo reprodutivo é semelhante ao encontrado para outras *Bothrops*, com o período de reprodução no final do outono e início do inverno (abril-junho) e nascimentos no verão (janeiro-abril) (SAZIMA, 1992; ALMEIDA-SANTOS; SALOMÃO, 2002). Segundo Sazima (1992) o tamanho das ninhadas podem variar de 3 a 34 filhotes, com os filhotes nascendo com média de 24,5 cm (machos) e 25,3 cm (fêmeas) de comprimento rostro-cloacal (crl). Junto com outras *Bothrops* é responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil.

Figura 1.1 – Imagem de uma fêmea adulta de jararaca (*Bothrops jararaca*)

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Figura 1.2 - Distribuição da jararaca (*Bothrops jararaca*)

Fonte: (CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 2004).

A cascavel, ou *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758)(figura 1.3), é um viperídeo de ampla distribuição, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina (CAMPBELL;

LAMAR; BRODIE, 2004). No Brasil, é encontrada em ambientes de vegetação mais aberta, como cerrado, caatinga, campos, evitando as florestas úmidas como a Floresta Amazônica e Mata Atlântica (figura 1.4). Também por ser vista em áreas antropizadas como lavouras e pastagens e devido a ocupação humana tem sido encontrada em ambientes onde outrora não ocorriam (BASTOS; ARAÚJO; SILVA, 2005). Tem como característica marcante a presença de um guizo na ponta da cauda formado por anéis de queratina, que aumentam em número conforme a serpente realiza as ecdises. É uma serpente de ciclo reprodutivo bianual, semelhante ao da jararaca, com cópulas no outono-inverno e nascimentos no verão (SALOMÃO; ALMEIDA-SANTOS; PUERTO, 1995). Durante o período de cópula, machos realizam o comportamento de dança combate, no qual eles tentam subjugar o oponente sem, no entanto, utilizar de picadas ou mordidas (observação pessoal). Não apresenta mudança ontogenética na sua dieta sendo uma serpente basicamente rodentívora, mas se alimentando também de pequenos marsupiais, e raramente de lagartos (SANT'ANNA; ABE, 2007). É responsável por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos no Brasil, mas em algumas regiões esse número pode ser de 20-25% (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1991).

Figura 1.3 - Imagem de uma fêmea adulta de cascavel (*Crotalus durissus*)

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Figura 1.4 - Distribuição da cascavel (*Crotalus durissus*)

Fonte: (CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 2004).

Nos capítulos subsequentes iremos descrever, analisar, documentar e quantificar as malformações apresentadas pelos filhotes de jararaca e cascavel nascidos no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, de mães recém-capturadas na natureza (Capítulo 1 - este capítulo foi submetido à publicação como artigo ao *Jornal of Comparative Pathology*); comparar a integridade do DNA entre mães progenitoras de ninhadas com filhotes malformados com as que pariram filhotes macroscopicamente normais (Capítulo 2); e por último correlacionar a presença de filhotes apresentando anomalias congênicas com o padrão do uso do solo (agricultura, pecuária, vegetação nativa e área urbana) das localidades de procedência das mães (Capítulo 3).

2 CAPÍTULO I - MALFORMAÇÕES EM VIPERÍDEOS NEOTROPICAIS: UMA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Resumo

Malformações podem ocorrer em todas as espécies vivas, mas existem poucas informações quanto às anomalias que ocorrem em serpentes e sua frequência. Este estudo verificou as malformações em filhotes recém-nascidos de jararaca (*Bothrops jararaca*) e cascavel (*Crotalus durissus*) de fêmeas prenhes recém-capturadas na natureza (240 e 35 ninhadas respectivamente). Após o nascimento, os filhotes depois de medidos, pesados e do sexo ser verificado, foram analisados macroscopicamente quanto à presença de malformações perceptíveis. Exames radiográficos também foram conduzidos. A espécie *B. jararaca* apresentou 95 indivíduos malformados de 4087 recém-nascidos (2,3%); e *C. durissus* teve 36 serpentes malformadas de 324 nascimentos (11,1%). Anomalias na coluna vertebral foram as mais comuns para as duas espécies, seguidas de fusão nas placas ventrais e malformações oculares. *B. jararaca* apresentou uma maior variedade de malformações como esquistossomia (21 animais), cauda retorcida (13), bicefalia (3) e hidrocefalia (2). Este é o primeiro estudo de malformações em serpentes em que um grande número de recém-nascidos foi analisado, obtendo-se naturalmente as anomalias congênitas e suas frequências.

2.1 INTRODUÇÃO

Malformações congênitas têm sido descritas para os seres humanos (KALTER, 2003), animais domesticados e de laboratório, mas poucas informações existem quando se trata dos animais de vida selvagem. A etiologia das malformações ou mesmo o processo do seu desenvolvimento em animais silvestres não são esclarecidos, mas se sabe que, como em todos os animais, as anomalias surgem durante a formação dos órgãos no período de desenvolvimento embrionário, havendo períodos críticos que determinam a ocorrência ou não das malformações. Várias causas podem levar a formação de indivíduos com anomalias congênitas sendo que podemos agrupá-los em aspectos genéticos e/ou ambientais. Neste último grupo encontramos fatores como a temperatura, a umidade (BELLAIRS, 1981), contaminantes ambientais e radiação (WALLACH, 2007) e infecções por parasitas (JOHNSON et al., 2010).

No campo da Herpetologia, grande atenção tem sido dada aos anfíbios a partir de 1995, quando vários anuros apresentando deformidades e ausência de patas foram encontrados em Minnesota, USA (KAISER, 1997; SCHMIDT, 1997). A partir de então, outros estudos foram realizados focando as malformações em anfíbios (METEYER, 2000; OUELLET, 2000; JOHNSON et al., 2010). Muitas das publicações que abordam as malformações em répteis têm focado na relação entre malformações em quelônios e a contaminação ambiental (BISHOP, et al., 1991; BISHOP, et al., 1998; BELL; SPOTILA; CONGDON, 2006).

Em serpentes, a bicefalia ou dicefalia é a malformação mais reportada (WALLACH, 2007), com descrições em diversos grupos de serpentes neotropicais, incluindo bóídeos (CUNHA, 1968; ALBUQUERQUE et al., 2010), dipsadídeos (BELLUOMINI, 1959; BELLUOMINI; LANCINI, 1960; LAPORTA; SAWAYA; HOGE, 1983; LEMA, 1994) e viperídeos (AMARAL, 1926; VANZOLINI, 1947; BELLUOMINI et al., 1978; PÉREZ-HIGAREDA; SMITH., 1987; KLAUBER, 1997; MCALLISTER; WALLACH, 2006). Outras malformações são raramente descritas, incluindo microftalmia, fusão das escamas e malformações na coluna (PENDLEBURY, 1976; BELLAIRS, 1981; FEDERSONI JR, 1981; ANDRADE; ABE, 1992).

As espécies *Bothrops jararaca* (jararaca) e *Crotalus durissus* (cascavel sul-americana), são serpentes peçonhentas da família Viperidae, subfamília Crotalinae,

muito comuns no sudeste brasileiro, sendo que a jararaca ocupa ambientes florestais e áreas antropizadas e se alimenta principalmente de anuros quando jovem e de roedores na fase adulta (SAZIMA, 1992). A cascavel sul-americana é uma serpente que habita formações mais abertas, como Cerrado, e também áreas antropizadas, sendo que sua alimentação é basicamente formada por roedores e outros pequenos mamíferos (SANT'ANNA; ABE, 2007).

Este estudo teve por objetivo caracterizar as malformações encontradas em serpentes destas duas espécies.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Entre os anos de 2007 e 2012, espécimes recém-capturados de cascavel e jararaca entregues ao IB foram medidos (comprimento rostro-cloacal, CRC; e comprimento total, CT), pesados e, no caso das fêmeas adultas, analisadas quanto à presença de gestação por meio de exame ultrassonográfico. Todas as serpentes foram banhadas com Neguvon® (Trichlorfon) 0,2% e receberam em um intervalo de 15 dias duas doses de Ivomec® (Ivermectin) subcutânea (0,2 mg/kg) como medida profilática contra endoparasitas. Até o nascimento dos filhotes, as serpentes prenhes foram mantidas individualizadas em caixas plásticas com substrato de papelão corrugado e um pote de água, em uma sala climatizada (24-26°C e cerca de 70%UR) no Laboratório de Herpetologia do IB (LHIB). Neste período, foram oferecidos mensalmente camundongos (*Mus musculus*) vivos para alimentação (10-15% da massa das serpentes).

Após o nascimento ou aborto, os filhotes/natimortos foram medidos (comprimento rostro-cloacal - CRC e comprimento total - CT), o sexo foi verificado, eles foram pesados e analisados quanto à presença de malformações macroscopicamente perceptíveis. Os filhotes que apresentavam malformações foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ e encaminhadas à necropsia. Exames radiográficos laterolateral e ventrodorsal "*post mortem*" foram conduzidos a fim de auxiliar na análise e descrição das malformações. As radiografias digitais foram adquiridas utilizando-se equipamento radiológico (Raytech e Tecno Designer), de alta frequência, TD 500 HF, com mesa radiológica portando grade antidifusora e acoplado ao sistema de radiografia

computadorizado (Fuji, modelo FCR CÁPSULA X com PC) e cassetes com placa de fósforo (IP - Imaging Plate) com o detector de raios X, nos tamanhos 18 x 24 cm ou 24 x 30 cm, e analisadas em monitor LCD de 21.3 polegadas, 3.0 megapixels.

As malformações observadas foram classificadas de acordo com o descrito por Haschek, Rousseaux e Wallig (2010) e Rothschild, Schultze e Pellegrini (2012), nas seguintes condições:

A. Malformações da coluna vertebral:

1. Cifose: Corresponde a uma curvatura convexa anormal na coluna;
2. Lordose : Curvatura côncava anormal da coluna;
3. Escoliose: Curvatura lateral da coluna;

B. Malformações dos olhos:

4. Anoftalmia: ausência do globo ocular;
5. Microftalmia: olho de tamanho reduzido;
6. Bufoftalmia: olho de tamanho aumentado;

C. Malformações das escamas:

7. Fusão das escamas ventrais: escamas ventrais unidas;
8. Heteropia das escamas ventrais: presença de escamas semelhantes às ventrais na porção dorsal das serpentes;

D. Malformações da cabeça:

9. Bicefalia: serpente com duas cabeças;
10. Braquignatia: encurtamento da mandíbula;
11. Hidrocefalia: dilatação da caixa craniana, formando uma estrutura em forma de domo no topo da cabeça;
12. Micrognatia da maxila superior: encurtamento da maxila superior;
13. Fenda labial: defeito na formação do lábio superior;
14. Cabeça deformada: formato da cabeça anormal, frequentemente em formato de cônico;

E. Malformações do corpo:

15. Esquistossomia: fechamento incompleto do corpo, com ou sem extrusão das vísceras;
16. Cauda retorcida: ponta da cauda retorcida;
17. Cauda incompleta: segmento de cauda ausente;

18. Nanismo: serpente com comprimento rostro-cloacal nitidamente menor, mas mais robusta que uma serpente normal.

2.3 RESULTADOS

Entre os anos de 2007 e 2012, 240 fêmeas de *B. jararaca*, capturadas na natureza, pariram no LHIB. Em 18,8% (45/240) ninhadas, ao menos um dos filhotes apresentou malformações. O número total de filhotes foi de 4087 (uma média de 17 filhotes por ninhada). Os nascimentos ocorreram preferencialmente entre os meses de fevereiro e março, sendo que poucos nascimentos ocorreram nos meses de dezembro (três ninhadas), janeiro (11) e abril (sete). O CRC mínimo das fêmeas prenhes de *B. jararaca* foi de 83 cm e o máximo de 147 cm. O número de fêmeas prenhes da espécie *C. durissus* foi 35, com um número total de 324 filhotes (média de 9,5 filhotes por ninhada), sendo que 42,9% (15/35) ninhadas apresentaram malformações congênitas. Os nascimentos ocorreram principalmente nos meses de janeiro a março, com três ninhadas nascendo nos meses de dezembro, abril e maio (uma ninhada em cada mês). O CRC das fêmeas prenhes de *C. durissus* variou de 77 a 100 cm. Alguns teratogênicos apresentavam apenas uma alteração morfológica, mas comumente eram encontradas mais de uma alteração.

Um total de 4411 filhotes foi estudado e destes 131 apresentaram malformações, das quais 67,2% (88/131) exibiram múltiplas malformações e 32,8 (43/131) somente um tipo de malformação. A espécie *B. jararaca* apresentou um total de 95 indivíduos malformados de 4087 animais nascidos (2,3%) (tabela 2.1). Para *C. durissus*, apresentou 11,1% de serpentes malformadas (36/324) (tabela 2.1). As malformações mais comuns foram aquelas associadas à coluna vertebral, sendo que 74,8% das serpentes apresentaram ao menos uma malformação no esqueleto axial. A fusão das escamas, unindo partes do corpo, foi encontrada em 22,1% das serpentes com anomalias, sendo que apenas duas serpentes, uma de cada espécie, apresentaram fusão sem relação com deformidades na coluna. Nestes dois casos a fusão ocorreu em poucas escamas contíguas.

Não houve um lado preferencial para ocorrência de malformações oculares, sendo que as mesmas foram observadas em um ou nos dois olhos da mesma serpente. Microftalmia e a anoftalmia ocorreram em uma mesma serpente. Os casos de bufoftalmia presentes na amostra ocorreram nos dois olhos de uma das jararacas, sendo que nos outros casos apenas um dos lados foi afetado.

Duas jararacas apresentaram no dorso uma formação de escamas, semelhantes às encontradas no ventre. Nos dois casos ocorreram conjuntamente cifoscolioses severas e rotações do corpo no eixo longitudinal.

Braquignatia foi visto em jararacas e cascavéis, assim como malformação do lábio superior. Todas as outras deformações congênitas de cabeça só ocorreram em jararacas. Três jararacas apresentaram bicefalia. Em uma delas as cabeças estavam completamente formadas e separadas na região anterior da coluna vertebral. Na segunda, as duas cabeças estavam unidas pela região posterior do crânio e o terceiro animal apresentou uma cabeça normal e uma cabeça com formato irregular.

A esquistossomia ocorreu na região torácica ou abdominal dos teratogênicos e, dependendo da extensão, os órgãos internos estavam exteriorizados. As caudas também apresentaram malformação, podendo se apresentar bem mais curtas que o normal, estando incompletas ou retorcidas. Apesar de algumas serpentes apresentarem como única malformação a deformidade da cauda (dois animais), a maioria das jararacas apresentou também cifoscolioses pelo corpo.

O último tipo de alteração congênita apresentada foi denominado “nanismo”. Neste caso o CRC da serpente foi cerca de metade do normal, sem alteração no valor da massa, dando ao animal aspecto marcadamente robusto.

Tabela 2.1 - Malformações encontradas em *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* entre os anos de 2007-2012. Entre parênteses a proporção da malformação em relação ao total de serpentes com malformações (95 *B. jararaca* e 36 *C. durissus*)

Malformação		<i>Bothrops jararaca</i>		<i>Crotalus durissus</i>	
Coluna vertebral	Cifose	64	67,4%	27	75,0%
	Escoliose	32	33,7%	11	30,6%
	Lordose	12	12,6%	4	11,1%
Olhos	Anoftalmia	3	3,2%	3	8,3%
	Microftalmia	-	-	1	2,8%
	Bufoftalmia	5	5,3%	1	2,8%
Escamas	Fusão das escamas	24	25,3%	5	13,9%
	Heterotopia das escamas	2	2,1%	-	-
Cabeça	Bicefalia	3	3,2%	-	-
	Hidrocefalia	2	2,1%	-	-
	Braquignatia	9	9,5%	2	5,6%
	Lábio leporino	2	2,1%	1	2,8%
	Micrognatia da maxila superior	1	1,1%	-	-
	Malformação da cabeça	5	5,3%	-	-
Corpo	Esquistossomia	21	22,1%	-	-
	Cauda retorcida	13	13,7%	-	-
	Cauda incompleta	2	2,1%	-	-
	nanismo	1	1,1%	-	-

-, malformação não observada

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Figure 2.1- Exemplos de malformações encontradas neste estudo

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Legenda: a) *Crotalus durissus* com severas malformações na coluna vertebral (cifoses, escolioses e lordoses); b) Imagem radiográfica da mesma serpente; c) *Bothrops jararaca* com cifoses e lordoses na coluna; d) Microftalmia em *C. Durissus*; e) Braquignathia em *B. jararaca*; f) Anoftalmia e fenda labial em *B. jararaca*. As barras representam escala de 1 cm.

Figure 2.2 – Malformações em *Bothrops jararaca*

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Legenda: a) Bicefalia b) Radiografia da mesma serpente; classificada como teratódimo opódimo c) Cauda retorcida; d) Nanismo. As barras representam escala de 1 cm.

2.4 DISCUSSÃO

A quantidade relativa de animais com deformidades congênitas foi maior em *C. durissus* do que em *B. jararaca* (cerca de cinco vezes maior). Esses dados podem estar relacionados tanto a fatores intrínsecos da espécie quanto a relação que estas espécies têm com o ambiente. Enquanto as cascavéis habitam áreas mais abertas como cerrados e canaviais, as jararacas tendem a ser encontradas em ambientes com maior quantidade de vegetação. No entanto a diversidade de malformações foi maior em jararacas do que em cascavéis, o que pode ser explicado pelo fato da amostra de jararacas ser maior que a

de cascavéis propiciando a chance de encontrar uma maior variabilidade de malformações.

As malformações da coluna vertebral foram as mais comuns encontradas nas duas espécies de serpentes estudadas. Algumas vezes elas ocorreram isoladas, por exemplo, uma única escoliose no final do corpo perto da cloaca, mas, geralmente, as serpentes possuíam variações mais complexas em várias partes do corpo, com cifoses e escolioses ocorrendo conjuntamente (cifoscolioses) ou então cifoses e lordoses (cifolordoses). Neste caso, as serpentes quando nasciam vivas mostravam uma grande dificuldade de locomoção. As cifoscolioses quando ocorrem na porção posterior do animal não impedem o desenvolvimento do mesmo, mas quando ocorrem perto da cabeça dificultam a ingestão das presas que, no caso das serpentes, são sempre ingeridas inteiras. Adultos das espécies estudadas coletados na natureza podem apresentar até várias cifoses e/ou escolioses, sempre com ângulos bem suaves, mas são raros (três em 5667 *C. durissus*; e uma entre 5964 *B. jararaca*, que foram entregues ao IB, Sant'Anna e Grego, dados não publicados). Poucos são os dados de literatura que apresentam este tipo de malformação. Riches (1967) comenta sobre uma ninhada de *Natrix maura* que não pode eclodir do ovo com sucesso por conta de malformações na coluna e corpo (fusão das escamas ventrais) e Pendlebury (1976) descreve malformações semelhantes para indivíduos de uma ninhada de *Crotalus v. viridis*. Nestes dois trabalhos, e em muitos dos animais observados na nossa amostra, as malformações de coluna estão associadas à fusão das escamas ventrais. Em 33% das serpentes nascidas no IB houve relação entre alterações na coluna e fusão das escamas; sendo que apenas três serpentes apresentaram fusão de algumas poucas escamas ventrais sem que isso refletisse em alterações na coluna. Pouco se sabe sobre as causas e mecanismos de como essas alterações na coluna ocorrem, entretanto para Ahboucha e Gamrani (2001) a malformação no esqueleto axial de vertebrados está relacionada ao órgão subcomissural, uma glândula cerebral localizada no teto do diencéfalo e que seu produto estaria relacionada ao controle da morfogênese do esqueleto.

Jararacas e cascavéis são espécies de hábitos crepusculares (SAZIMA, 1992; TOZETTI, 2007) e possuem a fosseta loreal (um órgão termorreceptor) que auxilia na predação e defesa. Portanto, malformações oculares, mesmo sendo uma desvantagem, não são incompatíveis com o desenvolvimento das espécies estudadas. Corroborando

com esta afirmação, o IB, nos últimos dez anos, recebeu duas cascavéis adultas que apresentavam microftalmia do olho direito.

A esquistossomia foi uma das alterações mais frequentes, mas assim como outras só foi encontrada nas jararacas. O fechamento incompleto do ventre dos animais durante a sua formação, e em muitos casos a extrusão dos órgãos internos, debilitou os animais que vinham a óbito em menos de 24 horas depois do nascimento. A cauda retorcida pode ser prejudicial já que, no caso da *B. jararaca*, os indivíduos jovens se alimentam de anfíbios e realizam um comportamento denominado engodo caudal (SAZIMA, 1991). Nesta espécie, e em outras *Bothrops*, a ponta da cauda possui coloração mais clara que o resto do corpo e a serpente realiza movimentos ondulatórios de forma a parecer uma pequena larva e atrair anfíbios. A impossibilidade de realizar este tipo de artifício durante comportamento predatório é um fator que pode comprometer o seu índice de aproveitamento na predação.

Os três casos de bicefalia encontrados ocorreram apenas nas jararacas, apesar da literatura citar casos em cascavéis. De acordo com a classificação de Nakamura (1938), depois ampliada por Belluomini (1965), dois exemplares tinham as duas cabeças unidas pelo esqueleto axial, sendo denominados *teratódimos deródimos*, já que possuem duas cabeças e dois pescoços independentes. Estes casos diferiram entre si, pois enquanto num deles as duas cabeças estavam completamente desenvolvidas e apresentam um aspecto normal, no outro, uma das cabeças se apresenta malformada. Um terceiro caso foi classificado como *teratódimo opódimo*, já que o crânio se apresentou bifurcado. A incidência da bicefalia na amostra foi de três casos em 4087 serpentes ou 73/100000, bem acima dos 1/100000 encontrados por Belluomini (1959). Esta discrepância de incidências pode ser explicada por duas razões:

1. A incidência apresentada por Belluomini (1959) estaria subestimada, pois levou em conta a chegada de indivíduos adultos e jovens ao IB, não levando em conta os que nasceram na natureza com tal deformidade e morreram antes de serem capturados.
2. Alterações ambientais podem estar provocando um aumento na taxa de malformações nas serpentes. É sabido que nas últimas décadas houve um aumento no uso de defensivos agrícolas, fertilizantes e contaminantes ambientais que podem de forma direta ou indireta estar relacionados a um aumento de malformações nos animais. Como exemplo podemos citar casos que ocorreram

com os anfíbios (JOHNSON et al., 2010) e tartarugas (BISHOP, et al., 1991; BISHOP, et al., 1998; BELL; SPOTILA; CONGDON, 2006).

Outros trabalhos já haviam citado a ocorrência de malformações em serpentes, entretanto ainda existe uma lacuna muito grande no que diz respeito à classificação destas malformações e a frequência com que elas ocorrem. Serpentes são carnívoros ectotérmicos que pouco se deslocam, podendo se tornar ótimos bioindicadores ou espécies sentinela (SELCER, 2005). Estudos mais detalhados devem ser realizados verificando o papel de fatores genéticos e ambientais na ocorrência destas malformações (WALLACH, 2007).

REFERÊNCIAS

- AHBOUCHA, S.; GAMRANI, H. Differences in protein expression in the subcommissural organ of normal and lordotic lizards (*Agama impalearis*). **Metabolic Brain Disease**, v. 16, n. 3-4, p. 219-226, 2001.
- ALBUQUERQUE, N. R.; ARRUDA, W. S.; COSTA, A. S.; GALHARTE, R. C.; VARGAS, L. G.; MORENO, I. H. A dicephalic yellow anaconda snake, *Eunectes notaeus* (Serpentes: Boidae), from Southern Pantanal, Brazil. **Journal of Natural History**, v. 44, n. 31-32, p. 1989-1994, 2010.
- AMARAL, A. Collectanea ophiologica. 13. Bicephalia em ophidios. **Revista Museu Paulista**, v. 15, p. 95-101, 1926.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Malformações em ninhadas de caíçaca, *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae). **Memórias Instituto Butantan**, v. 54, p. 61-67, 1992.
- BELL, B.; SPOTILA, J. R.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 3, p. 457-465, 2006.
- BELLAIRS, A. D. A. Congenital and developmental diseases. In: COOPER, J. E. e JACKSON, O. F. (Ed.). **Disease of the reptilia**. London: Academic Press, 1981. v.II, p.469-485.
- BELLUOMINI, H. E. Bicefalia em *Xenodon merremii* (Wagler 1824) (Serpentes). **Memórias Instituto Butantan**, v. 28, p. 85-90, 1959.
- BELLUOMINI, H. E.; LANCINI, A. R. Bicefalia em *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hall lowell) 1845 (Serpentes). Descrição de um teratódimo deródimo. **Memórias Instituto Butantan**, v. 29, p. 175-180, 1960.
- BELLUOMINI, H. E. Serpenti bicefali. Revisione del materiale esistente nell'Istituto Butantan, Dipartimento di Zoologia e nell'Istituto Pinheiros, São Paulo-Brasile. **Archivo Zoologico Italiano**, v. 50, p. 129-144, 1965.
- BELLUOMINI, H. E.; DE BIASI, P.; PUORTO, G.; BORELLI, V. Bicefalia em *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti).(Serpentes: Viperidae, Crotalinae). **Memórias Instituto Butantan**, v. 40, p. 41-77, 1978.
- BISHOP, C. A.; BROOKS, R. J.; CAREY, J. H.; NG, P.; NORSTROM, R. J.; LEAN, D. R. S. The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra s. serpentina*) from Ontario, Canada. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 33, n. 4, p. 521-547, 1991.

BISHOP, C. A.; NG, P.; PETTIT, K. E.; KENNEDY, S. W.; STEGEMAN, J. J.; NORSTROM, R. J.; BROOKS, R. J. Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes—St Lawrence River basin (1989–1991). **Environmental Pollution**, v. 101, n. 1, p. 143-156, 1998.

CUNHA, O. R. Um teratódimo deróidimo em jibóia (*Constrictor constrictor constrictor* [Linn., 1766]) (Ophidia; Boidae). **Boletim Museu Paraense Emilio Goeldi**, v. 67, n. 123, p. 1-17, 1968.

FEDERSONI JR, P. A. Casos teratogênicos em *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). **Memórias Instituto Butantan**, v. 42-43, p. 49-64, 1981.

HASCHEK, W. M.; ROUSSEAUX, C. G.; WALLIG, M. A. Developmental pathology. In: HASCHEK, W. M., ROUSSEAUX, C. G., WALLIG, M. A. (Ed.). **Fundamentals of toxicologic pathology**. London: Academic Press, 2010, p.633–671.

JOHNSON, P. T. J.; REEVES, M. K.; KREST, S. K.; PINKNEY, A. E. A decade of deformities: advances in our understanding of amphibian malformations and their implications. In: SPARLING, D. W., LINDER, G., BISHOP, C. A., KREST, S. (Ed.). **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. Pensacola: CRC Press/Taylor & Francis, 2010, p.511-536.

KAISER, J. Deformed frogs leap into spotlight at health workshop. **Science**, v. 278, n. 5346, p. 2051-2052, 1997.

KALTER, H. Teratology in the 20th century: environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, n. 2, p. 131-282, 2003.

KLAUBER, L. M. **Rattlesnakes**: their habits, life histories, and influence on mankind. Berkeley: University of California Press, 1997, v. 1. 740 p.

LAPORTA, L. L.; SAWAYA, P.; HOGE, A. R. Bicephalous Snake—*Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) Colubridae. **Boletim de Fisiologia Animal da Universidade de São Paulo**, v. 7, p. 79-84, 1983.

LEMA, T. Descrição de um exemplar com bifurcação axial de *Echinanthera cyanopleura* (Cope, 1885) (Serpentes, Colubridae, Xenodontinae). **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 16, n. 2, p. 113-117, 1994.

MCALLISTER, C. T.; WALLACH, V. Discovery of a dicephalic western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox* (Serpentes: Viperidae), from Texas, with a summary of dicephalism among members of the genus *Crotalus*. **Journal Arkansas Academy Science**, v. 60, p. 67-73, 2006.

METEYER, C. U. **Field guide to malformations of frogs and toads**: with radiographic interpretations. Madison: US Department of the Interior, 2000. 20 p.

NAKAMURA, K. Studies on some specimens of double monsters of snakes and tortoises. **Memoirs of the College of Science, Kyoto Imperial University, series B**, v. 14, p. 171-192, 1938.

OUELLET, M. Amphibian deformities: current state of knowledge. In: SPARLING, D. W., LINDER, G., BISHOP, C. A., KREST, S (Ed.). **Ecotoxicology of amphibians and reptiles**. Pensacola: SETAC Press, 2000, p.617-661.

PENDLEBURY, G. B. Congenital defects in the brood of a prairie rattlesnake. **Canadian Journal of Zoology**, v. 54, n. 11, p. 2023-2025, 1976.

PÉREZ-HIGAREDA, G.; SMITH., H. M. A two-headed snake, *Bothrops asper*, from southern Veracruz, Mexico. . **Bulletin Maryland Herpetological Society**, v. 23, n. 2, p. 72-73, 1987.

RICHES, R. J. Notes on a clutch of eggs of the viperine snake (*Natrix maura*). **British Journal Herpetology**, v. 4, n. 1, p. 14-16, 1967.

ROTHSCHILD, B. M.; SCHULTZE, H.-P.; PELLEGRINI, R. **Herpetological osteopathology: annotated bibliography of amphibians and reptiles**. New York: Springer, 2012

SANT'ANNA, S. S.; ABE, A. S. Diet of the rattlesnake *Crotalus durissus* in southeastern Brazil (Serpentes, Viperidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 42, n. 3, p. 169-174, 2007.

SAZIMA, I. Caudal luring in two Neotropical pitvipers, *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu*. **Copeia**, v. 1991, n. 1, p. 245-248, 1991.

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: Campbell, J. A. e Brodie, E. D. R. (Ed.). **Biology of pitvipers**. Texas: Selva, 1992, p. 199-216.

SCHMIDT, C. W. Amphibian deformities continue to puzzle researchers. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 7, p. 324A-326A, 1997.

SELCER, K. W. Reptile ecotoxicology: studying the effects of contaminants on populations. In: GARDNER, S. C. E OBERDÖRSTER, E. (Ed.). **Toxicology of reptiles**. New perspectives: toxicology and the environment. Boca Raton: Taylor and Francis, 2005, p.267-290.

TOZETTI, A. M. **Uso do ambiente, atividade e ecologia alimentar da cascavel (*Crotalus durissus*) em área de cerrado na região de Itirapina**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 93 p.

VANZOLINI, P. E. Notas sôbre um deródimo de *Crotalus durissus terrificus* (Laur.). **Papéis Avulsos Departamento Zoologia**, v. 8, n. 24, p. 273-283, 1947.

WALLACH, V. Axial bifurcation and duplication in snakes. Part I. A synopsis of authentic and anecdotal cases. **Bulletin of the Maryland Herpetological Society**, v. 43, n. 2, p. 57-95, 2007.

3 CAPÍTULO II - ANÁLISE COMPARATIVA DA INTEGRIDADE DO DNA EM FÊMEAS DE JARARACAS (*BOTHROPS JARARACA*) PROGENITORAS DE FILHOTES MALFORMADOS

Resumo

Malformações são anomalias congênitas que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e que no caso dos répteis pode ter diversas causas, desde genética até temperatura, radiação ou contaminantes ambientais. Serpentes prenhes da espécie *Bothrops jararaca* recém-capturadas da natureza e que pariram filhotes em cativeiro foram separadas em grupos que apresentaram filhotes com malformações (6) e filhotes normais (7). O índice de dano do DNA (ID) pelo Ensaio do Cometa das mães dos dois diferentes grupos foi comparado, não havendo diferença estatística entre eles. Os dois grupos apresentaram células com diferentes graus de dano no DNA. Quando comparamos o tamanho das mães e a frequência de malformações encontramos uma regressão positiva ($r^2 = 0,67$). Devido à relação positiva entre idade e tamanho nos répteis concluímos que serpentes com idade mais avançada tendem a apresentar mais filhotes com malformações. As causas não são conhecidas, mas podem estar relacionadas ao processo de envelhecimento dos animais.

3.1 INTRODUÇÃO

Malformações são alterações morfológicas, muitas vezes incompatíveis com a vida, que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, resultado de erros de comunicação química ou de translação da informação genética (METEYER, 2000). De acordo com Bellairs (1981) as malformações nos répteis podem ter origem genética ou ambiental (temperatura, umidade, radiação e contaminantes ambientais), sendo que muitas vezes as causas ainda são desconhecidas. Estudos que relacionam malformações e poluentes ou contaminantes ambientais nos répteis são raros e se resumem às tartarugas *Chelydra serpentina* (BISHOP et al., 1991) e *Chrysemys picta* (BELL; SPOTILA; CONGDON, 2006), ao aligátor *Alligator mississippiensis* (GUILLETTE JR et al., 1994) e ao jacaré *Caiman latirostris* (POLETTA et al., 2009). Como forma de avaliar a exposição a contaminantes e seus efeitos em répteis tem sido sugerido o uso do Ensaio do Cometa (“comet assay” ou “single-cell gel electrophoresis”) (MITCHELMORE; ROWE; PLACE, 2005). Esta técnica tem aplicações para testar a genotoxicidade de novas substâncias químicas, monitorar contaminantes genotóxicos no ambiente e auxiliar nas pesquisas de dano e reparo do ácido desoxirribonucleico (ADN, ou do inglês DNA) (COLLINS, 2004). O Ensaio do Cometa tem sido usado para estudos ecotoxicológicas em plantas, moluscos, anelídeos, peixes, anfíbios e mamíferos (COTELLE; FERARD, 1999), e recentemente em tartarugas marinhas (CALIANI et al., 2014), iguanas (CABARCAS-MONTALVO; OLIVERO-VERBEL; CORRALES-ALDANA, 2012), teiús (SCHAUMBURG et al., 2012) e jacarés (POLETTA et al., 2008). Em serpentes, este ensaio já foi realizado em alguns colubrídeos norte-americanos (BRONIKOWSKI, 2008), e em viperídeos dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, (MIYAMOTO; VIDAL; MELLO, 2005; MIYAMOTO; MELLO, 2007), mas não para avaliações ecotoxicológicas.

Na espécie humana, a idade materna também é reconhecida como um fator que eleva a incidência de malformações (MAC MAHON; MC KEOWN, 1953; MILHAM JR; GITTELSON, 1965; KALTER, 2003; MUNNÉ, SANTIAGO et al., 2007). Esta relação é bem estudada nas anomalias cromossômicas (MUNNÉ, et al., 1995; MUNNÉ, SANTIAGO et al., 2007), mas também foi demonstrada a relação entre a idade materna e malformações como hidrocefalia, fissura labiopalatal e acondroplasia (MILHAM JR; GITTELSON, 1965). Na literatura de medicina veterinária de animais selvagens consultada, estudos correlacionando idade e malformações são exceção, mas é lícito supor que os processos

de envelhecimento dos organismos e células atuem de maneira semelhante nos vertebrados e, conseqüentemente, é possível que serpentes mais velhas tenham maiores taxas de filhotes com malformações. Pelo fato dos ossos longos dos répteis manterem nas suas extremidades tecido cartilaginoso, estes animais podem apresentar crescimento contínuo, em contraste com os mamíferos (ROMER, 1956). A idade e o tamanho do corpo são positivamente correlacionados, portanto é possível categorizar as serpentes quanto à idade de acordo com o tamanho (DUELLMAN, 1994),

Serpentes peçonhentas são entregues pela população ao Instituto Butantan. Estas são mantidas em cativeiro para extração de veneno que será utilizado para produção de soro antiofídico e pesquisas toxinológicas. Notou-se que fêmeas prenhes vindas da natureza apresentavam frequências elevadas de filhotes com malformações (ver capítulo 1). A razão das anomalias é desconhecida, podendo ter relação com fatores intrínsecos (genéticos) e/ou extrínsecos (ambientais). O objetivo deste estudo foi verificar dois aspectos que podem estar direta ou indiretamente relacionados à produção de filhotes malformados. O primeiro diz respeito ao grau de dano do DNA apresentado pelas mães e se este estaria relacionado ou não às frequências de filhotes com malformações. O segundo aspecto foi verificar se mães com dimensões corporais maiores teriam uma tendência a gerar mais filhotes com anomalias, já que em répteis o tamanho está associado positivamente com a idade.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

- Serpente *Bothrops jararaca*

Serpentes fêmeas de jararaca (*Bothrops jararaca*), recém-capturadas entre os meses de setembro de 2007 a janeiro de 2014, foram recebidas pelo Instituto Butantan. No Laboratório de Herpetologia elas foram medidas (comprimento rostro-cloacal, CRC) e sua massa verificada. Por meio de exame ultrassonográfico foi confirmado o estado de prenhez. Os espécimes foram vermifugados com ivermectina 0,2mg/kg e banhados em solução de triclorfon 0,2%. Em seguida foram individualizados em caixas plásticas contendo papelão corrugado como substrato e água *ad libitum* em pote plástico.

Mensalmente as serpentes foram alimentadas com camundongos de 30 g (2 a 3 camundongos/serpente). Assim que pariram, os filhotes foram avaliados (medidos e pesados) e as malformações observadas foram descritas (ver capítulo I). Para o Ensaio do Cometa foram utilizadas serpentes que deram entrada no Instituto Butantan entre setembro de 2013 e janeiro de 2014.

- Separação dos eritrócitos

A amostra de sangue foi colhida das mães por meio da punção da veia caudal de três a cinco dias após o nascimento dos filhotes, com seringas heparinizadas. Para separação dos eritrócitos, 0,3 mL de sangue foi acrescido de 1,7 mL do meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute). Foi feito um gradiente de Percoll com RPMI de 100, 80, 64 e 25 % em tubo tipo Falcon de 2 mL cada fase. Feito o gradiente, a solução de sangue foi cuidadosamente introduzida no tubo formando uma quinta fase. Este material foi centrifugado por 30 minutos a 3000 rpm (1620 G). O anel de eritrócitos formado foi cuidadosamente retirado com uma pipeta Pasteur e colocado num segundo tubo tipo Falcon ao qual se completou o volume de 5 mL com RPMI 1640. Novamente foi realizada uma centrifugação, agora por 10 minutos a 1000 rpm (180 G). Os eritrócitos se depositaram no fundo e o sobrenadante foi retirado. Novamente foi completado até 5 mL de RPMI e foi realizada uma nova centrifugação como a anterior. Após o sobrenadante ser retirado, foi completado com RPMI 1640 até 1 mL (MIYAMOTO, 2003). Todas as centrifugações foram realizadas a 25°C. O teste de viabilidade das células foi realizado com *Trypan Blue* e utilizado somente amostras com viabilidade igual ou maior que 95% de células viáveis (LOUIS; SIEGEL, 2011).

- Ensaio do cometa

As amostras de eritrócitos foram diluídas em RPMI 1640 até a concentração de 10^6 células/mL. Cinco microlitros de cada uma destas soluções foram diluídos em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão e então colocados em lâminas previamente preparadas com uma película de 1,5 % de agarose normal. Por cima de cada lâmina foi colocada uma lamínula e em seguida o conjunto foi resfriado. Depois de cerca de 3

minutos as lâminas foram delicadamente retiradas e as lâminas contendo as agaroses permaneceram por 30 minutos na geladeira em solução de lise (2, 5 M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 1% sarcosinato de sódio, 10% DMSO). As lâminas foram então incubadas por 20 minutos na cuba de eletroforese horizontal contendo solução alcalina (300 mM NaOH, 200 mM EDTA, pH 13). A eletroforese foi realizada em seguida por 10 minutos a 25V e 300 mA a 4°C. Ao final as lâminas foram enxaguadas três vezes com solução de neutralização (0,4 M Tris) a intervalos de 5 minutos e fixadas em álcool etílico absoluto (MIYAMOTO, 2003).

Para a leitura utilizou-se 50 µl de brometo de etídio diluído em água Milli-Q (20µg/mL) nas lâminas rehidratadas por 5 minutos. Estas foram lidas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51) equipado com filtro Band pass U-MWIBA 3

- Análise dos dados

Cem células de cada lâmina foram contadas e verificou-se a presença de migração de DNA. Células sem migração de DNA foram consideradas como nível 0 (n_0); células com nível de migração menor que o diâmetro do nucleóide¹, como nível 1 (n_1); se o nível de migração fosse semelhante ao diâmetro do nucleóide como nível 2 (n_2), se fosse maior como nível 3 (n_3) e se não houvesse uma região de nucleóide definida como nível 4 (n_4). Para cada indivíduo verificou-se a quantidade de células (entre as cem contadas) em cada nível e calculou-se o seguinte índice de dano do DNA (RODRIGUEZ FERREIRO et al., 2002; POLETTA et al., 2008):

$$ID = n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4$$

Os IDs de serpentes que pariram filhotes com malformações e normais foram comparados utilizando o teste t de Student.

Para verificar se havia correlação entre o tamanho dos animais e o ID dos mesmos foi utilizado o índice de Correlação de Spearman (r_s) com nível de significância de 0,05.

Para análise de regressão entre o tamanho das serpentes e frequência de malformações as serpentes que pariram foram agrupadas em classes de tamanho de 10

¹ Ao se realizar o Ensaio do Cometa, o tratamento remove membranas, citoplasma, nucleoplasma e quase todas as histonas das células, deixando apenas o ácido ribonucleico (ARN ou RNA em inglês), proteínas e o ácido desoxirribonucleico (ADN ou DNA em inglês) A este conjunto chama-se nucleóide (COLLINS, 2004).

cm em 10 cm e arranjadas em um gráfico com a frequência de malformações em cada classe.

3.3 RESULTADOS

- Ensaio do cometa

Cinquenta fêmeas prenhes de jararaca foram entregues no Instituto Butantan. Elas vieram dos estados de Santa Catarina (7), Minas Gerais (2) e São Paulo (35). O restante não possuía origem definida. Os dados relativos aos locais de origem estão apresentados no capítulo 3. Entre os meses de janeiro e março de 2014, as jararacas pariram um total de 622 filhotes (razão sexual 1:1), com ninhadas de 4 a 28 filhotes (média de 13 filhotes por ninhada). Dezesete filhotes (0,03%) nasceram com malformações, sendo que a maioria era natimorta, ou não conseguiu romper a membrana que os envolvia ao nascer, morrendo em seguida. Alguns mostraram mais de um tipo de malformação, apresentando alterações na coluna vertebral, esquistossomia, cabeça reduzida, cauda incompleta, hidrocefalia, microftalmia e fusão das escamas.

Alterações na coluna vertebral foram as malformações mais encontradas (n=12), sendo que os indivíduos apresentaram cifoses, escolioses e lordoses. Enquanto alguns apresentaram discretos desvios de colunas, outros apresentaram complexas sequências de malformações como mostrado na figura 1. Nestes casos a fusão de escamas estava sempre associada às anomalias de coluna. Outro tipo de malformação apresentada pelos filhotes foi a esquistossomia ou não fechamento das escamas do corpo (n=4; figura 1). Esta variou de 0,5 cm até 3,0 cm, sempre a partir da região umbilical, local de ligação do filhote com o saco vitelínico. Em três animais ocorreu a extrusão de órgãos pela fissura apresentada, todas maiores de um cm. Todas as outras alterações só foram encontradas uma única vez.

Figura 3.1 - Filhotes de jararaca (*Bothrops jararaca*) com malformações.

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Legenda: a) filhote com alterações na coluna; b) filhote com alterações na coluna e esquistossomia; c) filhote com alterações severas na coluna; d) filhote com alterações na coluna e esquistossomia. Barra nas fotos correspondem a 1 cm.

Tanto serpentes que pariram ninhadas com filhotes com malformações como aquelas que pariram ninhadas somente com filhotes normais apresentaram danos no DNA em todos os níveis. Na figura 2 podemos visualizar os diversos níveis de dano de DNA e como se apresentam no Ensaio do Cometa. Comparando os ID das serpentes que pariram malformados ao das que pariram jararacas normais não se encontrou diferença entre os mesmos ($t=1,03$, $p=0,326$, $gl=10$, Figura 3.3). Enquanto que as serpentes que pariram filhotes normais tiveram uma média de 106,4 de ID (mínimo =60; máximo= 192; desvio padrão = 52,7, $n=6$) as que pariram filhotes com malformações apresentaram um ID médio de 134,0 (min= 80; max=190; dp= 43,5; $n=7$). Não houve correlação entre os IDs e o tamanho das mães ($r_s= -0,2035$; $p=0,52$).

Figura 3.2 - - Imagens dos nucleóides de *Bothrops jararaca* após o Ensaio do Cometa.

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Legenda: a) nível 0; b) nível 1; c) nível 2; d) nível 3 e e) nível 4

Figura 3.3 – Índices de Dano do DNA em jararaca

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Legenda: Valores de média, desvio padrão, máximo e mínimo de Índice de Dano do DNA (ID) em serpentes *Bothrops jararaca* que pariram filhotes normais (7) e filhotes malformados (6) (teste t= 1,03, p=0,326, gl=10)

- Malformações e o tamanho das mães

Para esta análise utilizamos todas as serpentes que pariram filhotes malformados entre os anos de 2007 e 2014 que possuíam as medidas de crc (n=297). Realizou-se uma análise de regressão, cujo resultado demonstra que há uma regressão positiva entre o tamanho da serpente (crc) e a frequência de malformações (fm) ($fm=0,00028crc - 0,0094$; $r^2=0,672$; $F=8,20$; $p=0,046$)(figura 4).

Figura 3.4 – Regressão entre tamanho de jararaca e filhotes com malformações.

Fonte: (SANT'ANNA, 2014).

Legenda: Regressão entre o tamanho das mães (n=297) e a frequência de filhotes com malformações (115/5061). (Equação da reta, $y=0,00028x - 0,0094$; $r^2=0,672$; $F=8,20$; $p=0,046$)

3.4 DISCUSSÃO

Animais expostos a contaminantes ambientais podem apresentar maiores quantidades de dano no DNA, caso esses contaminantes sejam genotóxicos e o Ensaio do Cometa, por ser um teste de elevada sensibilidade para detectar este tipo de dano, tem sido muito utilizado nos estudos ecotoxicológicos (JHA, 2008). Embora seja um ensaio amplamente utilizado em estudo de animais aquáticos e mamíferos, poucos são os casos de uso deste ensaio para répteis (POLETTA et al., 2008) e principalmente serpentes (e.g. MIYAMOTO; VIDAL; MELLO, 2005; MIYAMOTO; MELLO, 2007; BRONIKOWSKI, 2008).

A influência dos contaminantes ambientais sobre indivíduos, população ou comunidade é um importante aspecto a ser considerado do ponto de vista ecotoxicológico e de preservação das espécies (POLETTA et al., 2008). Neste estudo investigamos se serpentes prenhes de vida livre recebidas pelo Instituto Butantan e que pariram filhotes malformados no Laboratório de Herpetologia apresentaram maiores ID. Tais resultados poderiam indicar maior contato com agentes genotóxicos e, de maneira indireta, explicar a presença das malformações encontradas. Alterações somáticas não são transmitidas à próxima geração, portanto não são os danos que visualizamos no DNA dos eritrócitos os responsáveis pelas malformações. Entretanto eles indicam se determinados indivíduos têm um maior grau de dano de DNA, que como já foi visto pode ser causado por agentes genotóxicos como agrotóxicos (POLETTA, et al., 2009) e radiação (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999), que por sua vez também são responsáveis por malformações em répteis (BELLAIRS, 1981). Neste caso um alto grau de dano de DNA nos eritrócitos aliado a geração de filhotes com malformações sugeriria um forte componente ambiental como responsável pela anomalia. Nossos resultados não demonstraram diferenças significativas do ID para as amostras estudadas. No entanto temos que lembrar que a amostra é reduzida e que mesmo obtendo médias superiores para as serpentes com filhotes malformados os desvios padrão nas duas classes foram elevados, fazendo com que não houvesse diferença estatística. Outro fator importante são as diferenças individuais quanto à presença de xenobióticos, tanto na capacidade de tolerância como também na questão do sistema de reparo dos danos no DNA (EATON; KLAASSEN, 1996; AKCHA; VINCENT HUBERT; PFHOL-LESZKOWICZ, 2003). Apesar do ID médio das nossas amostras ser semelhante ao encontrado para outros répteis como o *Caiman latirostris* (POLETTA et al., 2008) e *Tupinambis meriane* (SCHAUMBURG et al., 2012), foi muito diferente ao observado para *Iguana iguana* (CABARCAS-MONTALVO; OLIVERO-VERBEL; CORRALES-ALDANA, 2012), que apresentaram diferentes valores para região de uma zona rural próxima há uma mina de carvão e uma área de reserva natural. O valor elevado do desvio padrão na nossa amostra pode ser explicado pelo fato que os indivíduos por nós analisados tinham diferentes idades e vinham de diferentes localidades, portanto diferentes graus de contato com possíveis agentes genotóxicos. Os dados do Ensaio do Cometa de Miyamoto, Vidal; Mello (2005), com o gênero *Bothrops*, não puderam ser comparados já que utilizaram outro método para análise do dano do DNA, mas demonstraram que dentro do mesmo gênero houve variação. Nesse estudo, os

autores correlacionaram estas variações aos diferentes habitats ocupados pelas espécies. De acordo com Zúñiga-González et al. (2000) a espécie, o sexo e a idade dos indivíduos são fatores importantes nas análises relativas ao dano do DNA.

Estudos ecotoxicológicos se fazem necessários em países que utilizam grandes quantidades de insumos agrícolas nas suas lavouras, como o Brasil (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001; FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007). As serpentes por serem animais de topo de cadeia se mostram como boas espécies bioindicadoras (MANOLIS; WEBB; BRITTON, 2002) e o ensaio do Cometa um teste fácil, relativamente barato e de boa sensibilidade, portanto muito útil para estudos de ecotoxicologia (MITCHELMORE; ROWE; PLACE, 2005). No entanto, não temos conhecimento dos padrões basais para as serpentes, nem como as diferentes espécies respondem aos contaminantes genotóxicos.

Quanto às frequências de malformação e o tamanho das serpentes, a regressão linear foi significativa e positiva. Portanto, nossos resultados indicam que quanto maior a serpente maior a frequência de malformações nos filhotes. Apesar das críticas de Halliday e Verrell (1988) ao uso do tamanho como um indicativo da idade nos anfíbios, os autores concordam que em muitos répteis a relação entre a idade e o tamanho segue uma curva de Bertalanffy. Portanto, adotando esta premissa para nossa amostra, serpentes maiores ou mais velhas apresentaram maior frequência de filhotes com malformações. Em *Bothrops jararaca* existe uma correlação positiva entre o tamanho da mãe e o número de filhotes (JANEIRO-CINQUINI, 2004), seguindo o que ocorre em outras espécies de serpentes (ALDRIDGE, 1979; SEIGEL; FORD, 1987). Desta maneira pode haver um fenômeno compensatório, pois mesmo que o tamanho tenha uma influência negativa no “fitness” do indivíduo, já que fêmeas maiores produzem mais filhotes com malformações, um número maior de filhotes estará sendo produzido. A razão de existir uma relação positiva entre o tamanho da serpente e frequência de malformações não é conhecida, mas podemos sugerir que sendo fêmeas com idades mais avançadas tenham tido mais tempo de contato com contaminantes ambientais e/ou que o próprio processo de envelhecimento seja responsável pelas anomalias nos filhotes. Em aligátor (*Alligator Missipiensis*) fêmeas, vivem de 50 a 60 anos, mas após 30 anos tem uma diminuição na fecundidade e aumento no número de embriões com anomalias (FERGUSON, 1984).

Não há estudos em serpentes que relacionem a idade materna e a ocorrência filhotes com anomalias, mas a idade dos pais é um fator que tem destaque nos estudos

de reprodução humana. Ainda há controvérsias se a idade do pai é um fator que aumenta o risco de malformações (ZHU et al., 2005). Porém, a idade da mãe é um fator bem conhecido de risco de malformações e síndromes cromossômicas (MUNNÉ, S et al., 1995; MUNNÉ, SANTIAGO et al., 2007; KÄLLÉN, 2014). Apesar de não haver informações consolidadas em répteis, é lícito supor que processos semelhantes de senescência e incremento de malformações na prole possam ocorrer também em serpentes.

Mesmo a teratologia ou dismorfologia sendo uma ciência que tem atraído o interesse da comunidade científica, ainda pouco se sabe sobre as causas que levam às malformações. Esse desconhecimento é ainda maior quando se trata de animais silvestres (LEIPOLD, 1980). Até onde sabemos, o presente trabalho é a primeira abordagem realizada no Brasil da aplicação do Ensaio do Cometa associado às malformações em répteis. Contudo, acreditamos que novos estudos integrados que analisem desde os danos no DNA em indivíduos comprometidos até estudos de ecotoxicologia serão fundamentais para que possamos melhor entender o comportamento das populações e comunidades animais nos agroecossistemas.

REFERÊNCIAS

- AKCHA, F.; VINCENT HUBERT, F.; PFHOL-LESZKOWICZ, A. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1-2, p. 21-32, 2003.
- ALDRIDGE, R. D. Female reproductive cycles of the snakes *Arizona elegans* and *Crotalus viridis*. **Herpetologica**, v. 35, n. 3, p. 256-261, 1979.
- BELL, B.; SPOTILA, J. R.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 3, p. 457-465, 2006.
- BELLAIRS, A. D. A. Congenital and developmental diseases. In: COOPER, J. E. E JACKSON, O. F. (Ed.). **Disease of the reptilia**. London: Academic Press, 1981. v.II, p.469-485.
- BISHOP, C. A.; BROOKS, R. J.; CAREY, J. H.; NG, P.; NORSTROM, R. J.; LEAN, D. R. S. The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra s. serpentina*) from Ontario, Canada. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 33, n. 4, p. 521-547, 1991.
- BRONIKOWSKI, A. M. The evolution of aging phenotypes in snakes: a review and synthesis with new data. **Age**, v. 30, n. 2-3, p. 169-176, 2008.
- CABARCAS-MONTALVO, M.; OLIVERO-VERBEL, J.; CORRALES-ALDANA, H. Genotoxic effects in blood cells of *Mus musculus* and *Iguana iguana* living near coal mining areas in Colombia. **Science of The Total Environment**, v. 416, p. 208-214, 2012.
- CALIANI, I.; CAMPANI, T.; GIANNETTI, M.; MARSILI, L.; CASINI, S.; FOSSI, M. C. First application of comet assay in blood cells of Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). **Marine Environmental Research**, v. 96, p. 68-72, 2014.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.
- COTELLE, S.; FERARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. **Environmental and molecular Mutagenesis**, v. 34, n. 4, p. 246-255, 1999.
- DUELLMAN, W. E. **Biology of amphibians**. Baltimore: JHU Press, 1994. 677 p.
- EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York (NY): McGraw-Hill, 1996. v.1, p.13-48.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007.

FERGUSON, M. W. J. Craniofacial development in *Alligator mississippiensis*. In: FERGUSON, M. W. J. **The Structure, Development and Evolution of Reptiles**, London: Academic Press, 1984, p. 223-273.

GUILLETTE JR, L. J.; GROSS, T. S.; MASSON, G. R.; MATTER, J. M.; PERCIVAL, H. F.; WOODWARD, A. R. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 8, p. 680, 1994.

HALLIDAY, T. R.; VERRELL, P. A. Body size and age in amphibians and reptiles. **Journal of Herpetology**, v. 22, n. 3, p. 253-265, 1988.

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

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008.

KÄLLÉN, B. Genetic and non-genetic factors in the origin of congenital malformations. In: KÄLLÉN, B. (Ed.). **Epidemiology of human congenital malformations**. New York: Springer, 2014, p. 5-8.

KALTER, H. Teratology in the 20th century: environmental causes of congenital malformations in humans and how they were established. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, n. 2, p. 131-282, 2003.

LEIPOLD, H. W. Congenital defects of zoo and wild mammals: a review. In: MONTALI, R. ; MIGAKI, G. (Ed.). **The comparative pathology of zoo animals**. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1980, p. 457-470.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: STODDART, M. J. (Ed.). **Mammalian cell viability**. New York: Springer, 2011, p. 7-12.

MAC MAHON, B.; MC KEOWN, T. The incidence of harelip and cleft palate related to birth rank and maternal age. **American Journal of Human Genetics**, v. 5, n. 2, p. 176-183, 1953.

MANOLIS, S. C.; WEBB, G. J.; BRITTON, A. R. Crocodilians and other reptiles: bioindicators of pollution. In: MARKICH, S. J.; JEFFREE, R. A. (Ed.). **The Finniss River; a natural laboratory of mining impacts: past, present and future**. Sydney: ANSTO, 2002, p. 65-69.

METEYER, C. U. **Field guide to malformations of frogs and toads: with radiographic interpretations**. Madison: US Department of the Interior, 2000. 20 p.

MILHAM JR, S.; GITTELSON, A. M. Parental age and malformations. **Human Biology**, v. 37, n. 1, p. 13-22, 1965.

MITCHELMORE, C. L.; ROWE, C. L.; PLACE, A. R. Tools for assessing contaminant exposure and effects in reptiles. In: GARDNER, S. C. E OBERDÖRSTER, E. (Ed.). **Toxicology of reptiles**. New perspectives: toxicology and the environment. Boca Raton: Taylor and Francis, 2005, p. 63-122.

MIYAMOTO, M. **Organização cromatínica, fragmentação de DNA e morte celular em eritrócitos circulantes de algumas espécies de serpentes**. (Dissertação). Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2003. 99 p.

MIYAMOTO, M.; VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in snake erythrocytes. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, n. 1, p. 15-27, 2005.

MIYAMOTO, M.; MELLO, M. L. S. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in erythrocytes of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae), infected with the protozoan, *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae). **Cell Biology International**, v. 31, p. 494-499, 2007.

MUNNÉ, S.; ALIKANI, M.; TOMKIN, G.; GRIFO, J.; COHEN, J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 2, p. 382-391, 1995.

MUNNÉ, S.; CHEN, S.; COLLS, P.; GARRISI, J.; ZHENG, X.; CEKLENIK, N.; LENZI, M.; HUGHES, P.; FISCHER, J.; GARRISI, M. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. **Reproductive Biomedicine**, v. 14, n. 5, p. 628-634, 2007.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. D. N.; MATTOS, R.; MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p. 130-135, 2001.

POLETTA, G. L.; LARRIERA, A.; KLEINSORGE, E.; MUDRY, M. D. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 2, p. 202-209, 2008.

POLETTA, G. L.; LARRIERA, A.; KLEINSORGE, E.; MUDRY, M. D. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 2, p. 95-102, 2009.

RODRIGUEZ FERREIRO, G.; CENCINO BADIÁ, L.; LOPEZ-NIGRO, M.; PALERMO, A.; MUDRY, M.; GONZÁLEZ ELIO, P.; CARBALLO, M. A. DNA single strand breaks in

peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. **Toxicology Letters**, v. 132, n. 2, p. 109-115, 2002.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, n. 1-2, p. 225-254, 1999.

ROMER, A. S. **Osteology of the reptiles**. Chicago: University of Chicago Press, 1956

SCHAUMBURG, L. G.; POLETTA, G. L.; SIROSKI, P. A.; MUDRY, M. D. Baseline values of micronuclei and comet assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, n., p. 99-103, 2012.

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

ZHU, J. L.; MADSEN, K. M.; VESTERGAARD, M.; OLESEN, A. V.; BASSO, O.; OLSEN, J. Paternal age and congenital malformations. **Human Reproduction**, v. 20, n. 11, p. 3173-3177, 2005.

ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G.; TORRES-BUGARÍN, O.; LUNA-AGUIRRE, J.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; ZAMORA-PEREZ, A.; GÓMEZ-MEDA, B. C.; VENTURA-AGUILAR, A. J.; RAMOS-IBARRA, M. L.; RAMOS-MORA, A.; ORTÍZ, G. G.; GALLEGOS-ARREOLA, M. P. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 467, n. 1, p. 99-103, 2000.

4 CAPÍTULO III - CORRELAÇÃO ENTRE AS MALFORMAÇÕES DE VIPERÍDEOS NEOTROPICAIS E O PADRÃO DE USO DO SOLO NO SUDESTE BRASILEIRO

Resumo

As espécies de répteis tem sofrido um declínio global, sendo que as razões para esse declínio muitas vezes tem relação com as ações antropogênicas. Perda ou degradação do habitat e poluição ambiental estão entre as principais causas para este declínio. Este estudo pesquisou a existência de correlação entre o padrão de uso do solo e malformações em duas espécies de viperídeos neotropicais, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus*, jararaca e cascavel respectivamente. Malformações em filhotes destas duas espécies nascidos em cativeiro, mas de mães recém-capturadas na natureza, foram correlacionadas com o padrão de uso do solo (urbanização, agricultura, pecuária e vegetação nativa), utilizando o Coeficiente de Spearman. Malformações em *B. jararaca* mostrou correlação positiva com as áreas agrícolas ($r_s = 0,67$; $p = 0,01$) e correlação negativa quanto às áreas de vegetação nativa ($r_s = -0,57$; $p = 0,03$). Não houve correlação entre a pecuária ou urbanização e malformações em jararaca. Malformações em cascavel não apresentaram quaisquer correlações com o padrão de uso do solo, sendo que tal condição pode ser resultado da baixa amostragem desta espécie no presente estudo.

4.1 INTRODUÇÃO

O declínio de espécies de anfíbios é um tema muito debatido e estudado pelos herpetólogos, no entanto, o declínio de répteis não tem gerado as mesmas preocupações e atitudes por parte da comunidade científica (GIBBONS et al., 2000). Entre as causas citadas para esse declínio, várias estão relacionadas às ações do homem como perda ou degradação do habitat e poluição ambiental (GIBBONS et al., 2000; IRWIN; IRWIN, 2005). Neste contexto a região tropical torna-se um foco importante já que abriga grande diversidade de répteis, tem tido grandes áreas disponibilizadas para agricultura, além de utilizar insumos agrícolas, alguns já banidos por muitos países (HOPKINS, 2000). As malformações podem ser causadas por fatores genéticos ou ambientais, sendo que temperatura, umidade, irradiação e contaminantes são considerados como potenciais agentes teratogênicos para répteis (BELLAIRS, 1981). O modo como alterações ambientais afetam as populações tem sido investigado e estudos correlacionando malformações em testudíneos e ambiente apontam principalmente os contaminantes ambientais como causa das anomalias (BISHOP, et al., 1998; BELL; SPOTILA; CONGDON, 2006; DE SOLLA; FERNIE; ASHPOLE, 2008; HOPKINS; WILLSON; HOPKINS, 2013). Poucos estudos têm sido realizados verificando a correlação entre o padrão do uso do solo e a ofiofauna, e é principalmente a redução e fragmentação do habitat que norteiam essas pesquisas (LUISELLI; CAPIZZI, 1997; ANDERSON; ROSENBERG, 2011; BREINNGER et al., 2011).

No Brasil, áreas naturais têm sido transformadas em áreas de cultivo e pastagens, ou então tem sofrido mudanças quanto ao uso e ocupação do solo (RIBEIRO et al., 2009; BARONA et al., 2010). O impacto que estas mudanças tem causado à fauna em geral é pouco conhecido, e em relação às serpentes é quase inexistente. O presente trabalho teve por objetivo correlacionar o padrão de uso do solo no sudeste brasileiro e as malformações encontradas em serpentes das espécies *Bothrops jararaca* (Wiedt, 1824) e *Crotalus durissus* Linnaeus 1758, dois viperídeos neotropicais que habitam áreas antropizadas e áreas de vegetação nativa. Indivíduos recém-nascidos normais e malformados oriundos de serpentes da natureza foram estudados no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (LHIB) (ver capítulo1).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Entre os anos de 2007 e 2014 serpentes fêmeas adultas de jararaca, *Bothrops jararaca* (n=2499) e de cascavel, *Crotalus durissus* (n=1713) recebidas pelo Instituto Butantan (IB) por meio de doação e entrega pela população foram analisadas no Laboratório de Herpetologia do IB. Foi verificado seu estado reprodutivo através de exame ultrassonográfico e medidos seu comprimento rostro-cloacal (CRC) e massa. As fêmeas que apresentavam folículos desenvolvidos foram banhadas com Neguvon® (Trichlorfon) 0,2% e receberam em um intervalo de 15 dias duas doses de Ivomec® (Ivermectin) subcutânea (0,2 mg/kg) como medida profilática contra ecto e endoparasitas. Elas foram mantidas em salas climatizadas (temperatura variando entre 24 e 26°C e umidade de cerca de 70%), em caixas individuais com substrato de papelão corrugado e água “ad libitum” até o momento da parição. Mensalmente foram oferecidos camundongos (*Mus musculus*) vivos para as serpentes (10 a 15% da massa das serpentes). Assim que os filhotes nasceram ou foram abortados, os mesmos foram medidos (CRC), pesados, o sexo foi averiguado, e foram analisados quanto à presença de malformações congênitas que pudessem ser percebidas macroscopicamente. Os filhotes malformados que nasceram vivos foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ e prontamente submetidos à necropsia completa. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelos Comitês de Ética Animal do Instituto Butantan (protocolo nº812/11) e da Faculdade de Medicina e Veterinária da Universidade de São Paulo (protocolo nº2686/2012).

A informação quanto ao local de captura das serpentes fêmeas prenhes foi o município, e este foi o nível de organização utilizado para que as análises e mapas fossem gerados. Os dados dos municípios foram obtidos do IBGE (2009) e complementados com as informações da Organização Não Governamental Mata Atlântica sobre áreas de vegetação nativa (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2014) além de mapas e gráficos da Mapstore (MAPSTORE, 2013). Foram obtidas quatro classes de informações por município (áreas de agricultura, de pastagem, de vegetação nativa e urbana). Os mapas foram gerados através do software Diva-Gis 7.5 e para análise estatística optamos pelo Coeficiente de Correlação de Spearman (r_s) para cada uma das classes de informações sobre os municípios (teste não paramétrico, pois a frequência de

malformações não obedecia a uma distribuição normal). O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para verificar a razão sexual (relação machos/fêmeas) dos animais nascidos. A análise estatística foi feita com o software Prism 6 da GraphPad Software Inc. Em todos os testes o nível de significância foi $p=0,05$.

4.3 RESULTADOS

Entre os meses de janeiro e abril dos anos de 2007 a 2014, 323 jararacas pariram 5427 filhotes (média= 16,8 desvio padrão= 8,0) sendo que em 73 ninhadas (22,6%) observou-se ao menos um filhote com malformação. Apesar do elevado número de cascavéis que deram entrada no IB apenas 41 estavam prenhes e chegaram ao final da gestação. Estas geraram 391 filhotes ($x=9,54$; $dp= 7,0$), sendo que cerca de metade das ninhadas (21) apresentou ao menos uma cascavel com malformação. A razão sexual (macho:fêmea) para jararaca foi de 1:1 ($\chi^2 = 0,06$; $p= 0,81$) e cascavel 1:1,2 ($\chi^2= 1,7$; $p=0,20$).

Enquanto que 2,4% das jararacas (129/5427) apresentaram anomalias ao nascer, 12,8% das cascavéis apresentaram alguma malformação (50/391). As malformações encontradas estão descritas no capítulo 1.

Origem - Jararaca - As localidades de origem das jararacas (tabela A do apêndice) corresponderam às áreas originalmente cobertas por Florestas Ombrófilas Densas pertencendo ao Domínio da Mata Atlântica (Figura 4.1). Historicamente, muitas destas áreas sofreram e continuam a sofrer forte pressão antrópica, como desmatamentos, introdução de agricultura, pastagens e urbanização, embora algumas poucas localidades permaneçam bem preservadas. As áreas de agricultura corresponderam em média a 10% por município, enquanto as áreas destinadas à pastagem corresponderam em média a 22%. Enquanto alguns municípios possuíam 91% de sua área ocupada por estrutura urbana, outros chegavam a ter uma área ínfima de urbanização. De acordo com o levantamento realizado pela Organização Não-Governamental SOS Mata Atlântica (2014), os municípios amostrados variaram de 0 a 84% (média de 26%) de vegetação nativa, composta não só por Floresta Ombrófila

Densa mas também outras áreas naturais não florestadas (cerrado, mangue, restinga, etc.) (Tabela 4.1)

Tabela 4. 1 - Médias e intervalos máximo e mínimo do uso do solo dos municípios de procedência das serpentes preñhes de jararaca (*Bothrops jararaca*) e cascavel (*Crotalus durissus*)

Área	Jararaca		Cascavel	
	Média (%)	Intervalo (%)	Média (%)	Intervalo (%)
Agrícola ¹	10,5	0-60	18,3	0-60
Pecuária ¹	22,2	0-56	42,8	20-95
Urbana ²	18,0	0-91	10,3	0-89
Vegetação nativa ²	26,0	0-84	10,8	1-34

Fonte: 1 – (MAPSTORE, 2013)

2 – (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE 2014)

Como alguns municípios tiveram uma amostragem baixa optamos por utilizar apenas as localidades com sete ou mais ninhadas, para que pudéssemos obter uma amostra populacional representativa das diferentes localidades. A primeira análise foi a correlação entre a área urbanizada dos municípios e a presença de filhotes de jararaca malformados (figura 4.2). Como o valor de p foi muito superior a 0,05, aceitou-se a hipótese nula de que não há correlação entre a urbanização e o índice de malformações ($r_s=0,14$; $p=0,64$).

Figura 4.1 – Mapa das localidades de jararaca (*Bothrops jararaca*)

Fonte: (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2014).

Legenda: Municípios das jararacas que pariram no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan entre 2007 e 2014, com a distribuição original do domínio da Mata Atlântica e áreas remanescentes de vegetação nativa.

As áreas agrícolas dos municípios utilizados na análise são compostas basicamente por agricultura temporária (milho, cana, hortaliças, legumes) e correspondem à região denominada cinturão verde da Grande São Paulo, responsável pelo abastecimento de parte dos produtos hortifrutigranjeiros consumidos na região. Neste caso, houve uma correlação positiva entre a quantidade de áreas agrícolas e a frequência de malformações ($r_s = 0,67$; $p = 0,01$) (figura 4.3).

Figura 4.2 - Correlação entre porcentagem da área urbanizada dos municípios* e a frequência de malformações em filhotes de jararaca ($r_s = 0,14$; $p=0,64$) entre os anos de 2007 e 2014

*Fonte: (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2014).

Figura 4.3 - Correlação entre o uso do solo por atividade agrícola (porcentagem da área do município)* e a frequência de malformações em filhotes de jararaca ($r_s = 0,67$; $p=0,01$) entre os anos de 2007 e 2014

*Fonte: (MAPSTORE, 2013).

Entre a área de pastagem e as malformações não obtivemos qualquer padrão de correlação ($r_s=0,21$; $p=0,48$) (figura 4.4). Por outro lado, quando verificamos a quantidade de vegetação nativa e o número de malformações encontramos uma correlação negativa ($r=-0,54$; $p=0,046$), indicando que áreas com maior vegetação nativa apresentaram menores índices de malformações (figura 4.5).

Figura 4.4 - Correlação entre o uso do solo por atividade pecuária (porcentagem da área do município*) e a frequência de malformações em filhotes de jararaca ($r_s = 0,21$; $p=0,48$) entre os anos de 2007 e 2014

*Fonte: (MAPSTORE, 2013).

Figura 4.5 - Correlação entre o a porcentagem de área do município com vegetação nativa e a frequência de malformações em filhotes de jararaca ($r_s = -0,54$; $p=0,046$) entre os anos de 2007 e 2014

*Fonte: (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2014).

Origem - Cascavel – A vegetação original das localidades de origem das cascavéis (tabela B do apêndice) possuía uma maior fitodiversidade. Majoritariamente, observou-se a presença de Cerrados e Florestas Estacionais Semidecíduas e/ou Decíduas (figura 4.6). São áreas com maiores atividades agrícola e pecuária e menores áreas de urbanização e vegetação nativa (tabela 1)

Devido ao pequeno número de ninhadas por localidade, os dados dos municípios foram agrupados em função da microrregião (IBGE, 2009).

Figura 4.6 - Mapa das localidades de cascavel (*Crotalus durissus*)

Fonte: (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2014).

Legenda: Municípios das cascavéis que pariram no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan entre 2007 e 2014, com a distribuição original do domínio da Mata Atlântica e áreas remanescentes de vegetação nativa.

As correlações entre as frequências de filhotes malformados de cascavel quanto ao padrão de uso do solo por urbanização, agricultura, pecuária e áreas de vegetação nativa apresentaram valores de p muito superiores a 0,05, portanto, em todas as análises não podemos rejeitar a hipótese nula, qual seja, a de que não há correlação entre essas variáveis e as malformações (figuras de 4.7 a 4.10).

Figura 4.7 - Correlação entre porcentagem da área urbanizada dos municípios* e a frequência de malformações em filhotes de cascavel ($r_s = -0,18$; $p = 0,55$) entre os anos de 2007 e 2014

*Fonte: (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2014).

Figura 4.8 - Correlação entre o uso do solo por atividade agrícola (porcentagem da área da microrregião*) e a frequência de malformações em filhotes de cascavel ($r_s = -0,23$; $p = 0,45$) entre os anos de 2007 e 2014

*Fonte: (MAPSTORE, 2013).

Figura 4.9 - Correlação entre o uso do solo por atividade pecuária (porcentagem da área do município) e a frequência de malformações em filhotes de cascavel ($r_s = -0,33$; $p=0,28$) entre os anos de 2007 e 2014

*Fonte: (MAPSTORE, 2013).

Figura 4.10 - Correlação entre a porcentagem de área do município com vegetação nativa e a frequência de malformações em filhotes de cascavel ($r_s = -0,13$; $p=0,66$) entre os anos de 2007 e 2014

*Fonte: (SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2014).

Tendo em vista os resultados apresentados no capítulo 2 foi feita a correlação entre a frequência de malformações e o tamanho médio das serpentes nos municípios acima analisados. O tamanho médio destas 197 serpentes foi 109,0 cm de crc, com

amplitude de 86-143 cm e desvio padrão de 10,0 cm. Não houve correlação entre comprimento crc médio das jararacas mães por município (crc_m) e frequência de malformações ($r_s = -0,11$; $p = 0,71$); crc_m e porcentagem de áreas agrícolas ($r_s = -0,16$; $p = 0,58$) ou crc_m e áreas nativas ($r_s = 0,02$; $p = 0,93$).

4.4 DISCUSSÃO

Jararacas se apresentaram mais prolíficas que as cascavéis, sendo que os dados encontrados para jararaca são semelhantes a trabalhos anteriores tanto para o número médio de filhotes por ninhada quanto para o período reprodutivo (JANEIRO-CINQUINI; LEINZ; ISHIZUKA, 1990; SAZIMA, 1992; ALVES; ARAÚJO; WITT, 2000; JANEIRO-CINQUINI, 2004). A relação sexual também foi semelhante à encontrada por Sazima (1992) e Alves, Araújo e Witt (2000), mas divergiu dos dados apresentados por Breno et al. (1990). Cascavéis apresentaram taxas reprodutivas inferiores às descritas em outros trabalhos para mesma espécie, porém de subespécies diferentes (SOLÓRZANO; CERDAS, 1988; LIRA-DA-SILVA; QUEIROZ; NUNES, 1994). Em serpentes o mecanismo de determinação dos sexos é genético através do sistema de cromossomos ZW/ZZ, onde o indivíduo heterozigoto é fêmea e o homozigoto é macho (BEČAK, 1966). A amostragem influencia fortemente esta relação e quanto maior o número de ninhadas de serpentes observadas mais perto se chega da razão sexual 1:1. Este fato pode explicar a razão sexual em cascavéis obtidas neste trabalho, pois quando incluímos amostras de anos anteriores, a razão sexual passa a ser mais igualitária (observação pessoal). No entanto, não podemos descartar a hipótese de uma taxa diferencial de sobrevivência de embriões dos diferentes sexos (VIETS et al., 1994).

Em relação à taxa de malformações, as cascavéis apresentaram índices quase cinco vezes superiores às observadas em jararacas, apesar do número bem menor de fêmeas prenhes e nascimentos. Sendo as malformações de origem genética ou ambiental (BELLAIRS, 1981), ou mesmo a associação de ambos os fatores, podemos verificar que as cascavéis originaram-se em localidades com áreas de vegetação natural inferiores às jararacas, enquanto que as áreas de agricultura e pastagem foram superiores. Se estas malformações estão ocorrendo por conta de uma influência ambiental, esta diferença

marcante entre jararacas e cascavéis pode ter uma forte relação com a ocupação do solo e destruição das áreas de vegetação natural.

A correlação entre a ocupação do solo por área urbana ou a pecuária e as malformações em jararacas, apresentou valores não significantes. Estas serpentes, apesar de eventualmente serem encontradas em áreas urbanas, não tem esse tipo de habitat como preferencial, e nossos resultados sugerem que a intensa urbanização de alguns municípios não chega a afetar estas serpentes quanto ao aumento de anomalias congênitas. Quando comparadas às áreas agrícolas, as frequências de malformações mostraram uma correlação positiva (0,67) e significativa. Quanto maior a área agrícola no município maior a frequência de malformações. Estas são áreas que possuem propriedades rurais pequenas e que possuem culturas temporárias e perenes incluindo hortaliças, frutas e legumes (SÃO PAULO, 2008). Correlação também foi observada quando comparamos malformações e área com vegetação nativa, mas neste caso a correlação foi negativa (-0,57). Regiões com maiores áreas de vegetação nativa tiveram frequências muito baixos de malformação. Na grande maioria das localidades as áreas de vegetação nativa são de Floresta Ombrófila Densa, um habitat típico para populações deste viperídeo (SAZIMA, 1992).

A ausência de correlações entre o comprimento rostro cloacal das jararacas progenitoras e padrões de uso de solo demonstra que existem fêmeas de diversos tamanhos nos diferentes municípios analisados, portanto as correlações encontradas entre malformações e uso do solo não são devidos ao tamanho das fêmeas e sim, possivelmente, a ação antrópica nestas localidades.

Para as cascavéis nenhuma das correlações apresentou significância e em todos os casos as hipóteses nulas (inexistência de correlação) foram aceitas. Diferentemente das jararacas, o número de ninhadas por microrregião não ultrapassou três, sendo que algumas microrregiões possuíam apenas uma ninhada amostrada. Este fato pode ter colaborado para a falta de correlação entre o uso do solo com as malformações em cascavéis, já que não podemos garantir a representatividade da população por apenas uma ou duas ninhadas. Como uma alternativa a esta hipótese, é lícito propor que não exista uma correlação entre as malformações em cascavéis e a antropização do ambiente. A espécie *Crotalus durissus* é uma serpente que se adapta muito bem a áreas abertas e muitas vezes antropizadas (TOZETTI; MARTINS, 2008). Sawaya, Marques e Martins (2008) encontraram a espécie em grande quantidade em

áreas alteradas e Bastos, Araújo e Silva (2005) relatam uma possível invasão de cascavéis em áreas de Mata Atlântica que sofreram desmatamentos. No entanto, estudos complementares, como o continuado monitoramento dos nascimentos, se fazem necessários para descartar ou não a hipótese da influência da ocupação do solo por agricultura ou pastagens na reprodução desta espécie.

A influência da alteração do habitat em serpentes foi observada em *Boa constrictor occidentalis* (CARDOZO; CHIARAVIGLIO, 2008) que teve seus parâmetros reprodutivos (condição corporal, proporção de fêmeas reprodutivas e volume testicular) reduzidos. Chin et al. (2013), por outro lado, não encontraram qualquer efeito adverso nos parâmetros reprodutivos analisados em cobra d'água *Nerodia sipedon* com variadas taxas de mercúrio na mãe ou nos filhotes.

Não há trabalhos correlacionando as malformações e o ambiente para serpentes, mas na herpetologia esta correlação é documentada em tartarugas (BISHOP, et al., 1998; BELL; SPOTILA; CONGDON, 2006; DE SOLLA; FERNIE; ASHPOLE, 2008; HOPKINS; WILLSON; HOPKINS, 2013) e anfíbios (BISHOP, et al., 1999; ANKLEY et al., 2004; TAYLOR et al., 2005). Em todos os casos acima citados, acredita-se que a causa tenha sido a presença de contaminantes ambientais como metais pesados ou insumos agrícolas e seus resíduos. Esta pode ser também a causa dos maiores índices de malformações em municípios com maior atividade agrícola quando comparados aos municípios com extensas áreas de vegetação nativa, como observamos para jararaca. Há análises ecotoxicológicas em répteis bem documentadas que determinaram as taxas de contaminantes nos tecidos, mas estas carecem de uma luz sobre o significado biológico destas contaminações (HOPKINS, 2000). Por outro lado, não podemos descartar também a hipótese de que as diferenças ambientais drásticas que existem entre áreas agrícolas e Florestas Ombrófilas não tenham permitido que as serpentes encontrassem microhabitats em condições ideais para o desenvolvimento das ninhadas (CARDOZO; CHIARAVIGLIO, 2008).

A lista brasileira de répteis ameaçados de extinção possui cinco espécies de serpentes, sendo que três pertencem ao gênero *Bothrops* (MARTINS et al., 2008). As alterações atuais e passadas no ambiente afetam não só pela diminuição das áreas em si, mas também por todos os outros aspectos que ainda são pouco conhecidos, incluindo a própria a poluição ambiental. Este pode ser um dos fatores responsável pelo declínio de populações de répteis, mas que precisam de maiores estudos a curto e longo prazo para

melhores tomadas de decisão nas ações de proteção da herpetofauna (RODRIGUES, 2005). Portanto, estudos ecotoxicológicos e de história natural devem ser desenvolvidos conjuntamente para que estas questões possam ser esclarecidas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. L. M.; ARAUJO, M. L.; WITT, A. A. Aspectos da biologia reprodutiva de *Bothrops jararaca* em cativeiro (Serpentes, Viperidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 89, n., p. 187-192, 2000.
- ANDERSON, C. D.; ROSENBERG, M. S. Variation in association with anthropogenic habitat edges exhibited by the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) in St. Louis County, Missouri. **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 1, p. 50-55, 2011.
- ANKLEY, G. T.; DEGITZ, S. J.; DIAMOND, S. A.; TIETGE, J. E. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, n. 1, p. 7-16, 2004.
- BARONA, E.; RAMANKUTTY, N.; HYMAN, G.; COOMES, O. T. The role of pasture and soybean in deforestation of the Brazilian Amazon. **Environmental Research Letters**, v. 5, n. 2, p. 1-9, 2010.
- BASTOS, E. G. M.; ARAÚJO, A. F. B.; SILVA, H. R. Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 812-815, 2005.
- BEÇAK, W. Constituição cromossômica e mecanismo de determinação do sexo em ofídios sul-americanos. II. Cromossomos sexuais e evolução do cariótipo. **Memórias Instituto Butantan**, v. 33, p. 775, 1966.
- BELL, B.; SPOTILA, J. R.; CONGDON, J. High incidence of deformity in aquatic turtles in the John Heinz National Wildlife Refuge. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 3, p. 457-465, 2006.
- BELLAIRS, A. D. A. Congenital and developmental diseases. In: COOPER, J. E. E JACKSON, O. F. (Ed.). **Disease of the reptilia**. London: Academic Press, 1981. v.II, p.469-485.
- BISHOP, C. A.; NG, P.; PETTIT, K. E.; KENNEDY, S. W.; STEGEMAN, J. J.; NORSTROM, R. J.; BROOKS, R. J. Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes—St Lawrence River basin (1989–1991). **Environmental Pollution**, v. 101, n. 1, p. 143-156, 1998.
- BISHOP, C. A.; MAHONY, N. A.; STRUGER, J.; NG, P.; PETTIT, K. E. Anuran development, density and diversity in relation to agricultural activity in the Holland River Watershed, Ontario, Canada (1990–1992). **Environmental Monitoring Assessment**, v. 57, n. 1, p. 21-43, 1999.

BREINNGER, D. R.; BOLT, M. R.; LEGARE, M. L.; DRESE, J. H.; STOLEN, E. D. Factors influencing home-range sizes of eastern indigo snakes in Central Florida. **Journal of Herpetology**, v. 45, n. 4, p. 484-490, 2011.

BRENO, M. C.; YAMANOUYE, N.; PREZOTO, B. C.; LAZARI, M. F. M.; TOFFOLETTO, O.; PICARELLI, Z. P. Maintenance of the snake *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) in captivity. **The Snake**, v. 22, p. 126-130, 1990.

CARDOZO, G.; CHIARAVIGLIO, M. Landscape changes influence the reproductive behaviour of a key 'capital breeder' snake (*Boa constrictor occidentalis*) in the Gran Chaco region, Argentina. **Biological Conservation**, v. 141, n. 12, p. 3050-3058, 2008.

CHIN, S. Y.; WILLSON, J. D.; CRISTOL, D. A.; DREWETT, D. V. V.; HOPKINS, W. A. High levels of maternally transferred mercury do not affect reproductive output or embryonic survival of northern watersnakes (*Nerodia sipedon*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 3, p. 619-626, 2013.

DE SOLLA, S. R.; FERNIE, K. J.; ASHPOLE, S. Snapping turtles (*Chelydra serpentina*) as bioindicators in Canadian Areas of Concern in the Great Lakes Basin. II. Changes in hatching success and hatchling deformities in relation to persistent organic pollutants. **Environmental Pollution**, v. 153, n. 3, p. 529-536, 2008.

GIBBONS, J. W.; SCOTT, D. E.; RYAN, T. J.; BUHLMANN, K. A.; TUBERVILLE, T. D.; METTS, B. S.; GREENE, J. L.; MILLS, T.; LEIDEN, Y.; POPPY, S. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians **BioScience**, v. 50, n. 8, p. 653-666, 2000.

HOPKINS, B. C.; WILLSON, J. D.; HOPKINS, W. A. Mercury exposure is associated with negative effects on turtle reproduction. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 5, p. 2416-2422, 2013.

HOPKINS, W. A. Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 2391-2393, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009.

IRWIN, L.; IRWIN, K. Global threats affecting the status of reptile populations. In: GARDNER, S. C. E OBERDÖRSTER, E. (Ed.). **Toxicology of reptiles**. New perspectives: toxicology and the environment. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005, p.10-34.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; LEINZ, F. F.; ISHIZUKA, M. M. Body size-litter relationships and some characteristics of litters in *Bothrops jararaca*. **Bulletin of the Chicago Herpetological Society**, v. 25, n. 5, p. 84-85, 1990.

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

LIRA-DA-SILVA, R. M.; QUEIROZ, I. B. D.; NUNES, T. B. Contribution to reproductive biology of snakes in Bahia, Brazil: I. viviparous. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 11, n. 2, p. 187-193, 1994.

LUISELLI, L.; CAPIZZI, D. Influences of area, isolation and habitat features on distribution of snakes in Mediterranean fragmented woodlands. **Biodiversity & Conservation**, v. 6, n. 10, p. 1339-1351, 1997.

MAPSTORE. **Mapas temáticos do Brasil**: Uso do solo. Mapstore, 2013.

MARTINS, M.; MOLINA, F. B.; MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. Panorama geral dos répteis ameaçados do Brasil. In: Machado, A. B. M., Drummond, G. M., Paglia, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, 2008. p.327-334.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

RODRIGUES, M. T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, v. 1, n., p. 87-94, 2005.

SÃO PAULO (Estado). SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo - LUPA 2007/2008**. São Paulo: SAA/CATI/IEA, 2008. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>>. Acesso em: 01jul. 2014.

SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M. Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 127-149, 2008.

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J. A. E BRODIE, E. D. R. (Ed.). **Biology of pitvipers**. Texas: Selva, 1992, p.199-216.

SOLÓRZANO, A.; CERDAS, L. Biología reproductiva de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus* (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica. **Revista Biología Tropical**, v. 36, n. 2A, p. 221-226, 1988.

SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica Período 2012-2013**. Relatório técnico. p. 61, 2014. Disponível em: <<http://mapas.sosma.org.br/dados/>>. Acesso em: 05 jan 2014.

TAYLOR, B.; SKELLY, D.; DEMARCHIS, L. K.; SLADE, M. D.; GALUSHA, D.; RABINOWITZ, P. M. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 11, p. 1497-1501, 2005.

TOZETTI, A. M.; MARTINS, M. Habitat use by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in south eastern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 42, n. 19-20, p. 1435-1444, 2008.

VIETS, B. E.; EWERT, M. A.; TALENT, L. G.; NELSON, C. E. Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. **Journal of Experimental Zoology**, v. 270, n. 1, p. 45-56, 1994.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos grandes avanços na área da teratologia, ou dismorfologia, em humanos e animais de laboratório, o conhecimento sobre as malformações ou anomalias congênitas ainda possui uma grande lacuna quando se trata de animais silvestres (LEIPOLD, 1980). Após os anos sessenta e setenta do século 20, ficou claramente demonstrado que a fauna e flora além serem atingidas de uma maneira direta e rápida pelas ações antropogênicas como desmatamentos, caça, introdução de espécies exóticas e etc., também estão sendo prejudicadas de uma maneira lenta, silenciosa e despercebida, pelos contaminantes e poluentes que lançamos no ambiente. O declínio das populações de anfíbios que vem ocorrendo por todo o planeta (HOULAHAN et al., 2000; STUART et al., 2004), sem que saibamos quais são as causas e como interromper este processo, talvez seja o alerta mais recente que tenhamos tido para nos focar neste problema. A ciência que relaciona o ambiente e contaminantes é a ecotoxicologia, uma vertente científica em amplo desenvolvimento nos últimos anos. Artigos e livros têm sido publicados como intuito de compreendermos melhor o que está acontecendo com o ambiente e fauna/flora que nele sobrevive. Casos de malformações em animais silvestres induzidos por contaminantes ambientais estão sendo comprovados, assim como outros processos que acometem a vida selvagem.

O Brasil é um país megadiverso em termos biológicos, mas que possui grande parte do território destinado à agricultura e que nas últimas décadas aumentou significativamente o uso de pesticidas, fertilizantes e herbicidas na agropecuária (FUTINO; SILVEIRA, 1991). No entanto não tem se dado a devida atenção aos cuidados com o uso destes insumos agrícolas pelas pessoas que lidam no campo. Como muitos destes produtos acabam se dirigindo aos corpos de água, têm surgido muitos estudos de contaminação em animais aquáticos, principalmente peixes (MATSUSHITA; SOUZA, 1994; BIDONE et al., 1997; VIDAL, 2010). Mas falta uma discussão aprofundada sobre o que tem ocorrido com os vertebrados terrestres brasileiros nos agroecossistemas.

Por serem animais de topo de cadeia e distribuídos em diversos tipos de habitats as serpentes se mostram como bons indicadores biológicos. Também as escolhemos por estarem apresentando um conjunto de alterações patológicas, as anomalias congênitas, visíveis e identificáveis. Os viperídeos, por nós estudados, apresentaram uma grande diversidade de malformações em diversas partes do corpo,

principalmente a jararaca (*Bothrops jararaca*). Também demonstramos que há uma correlação entre as malformações observadas em filhotes de jararaca e os padrões do uso do solo. Áreas com maiores atividades agrícolas apresentaram correlação positiva com as frequências de malformações, ao mesmo tempo em que localidades com maiores áreas de vegetação nativa apresentaram uma correlação negativa. Em relação à cascavel (*Crotalus durissus*) não foi possível chegar a uma conclusão definitiva, talvez devido à pequena amostragem. Também não foi possível identificar se está ocorrendo um aumento ou não nas malformações, ou se as mesmas estão modificando, pela ausência de pesquisas sistemáticas no passado. No entanto cabe, a partir deste estudo, realizar um monitoramento destas espécies para que possamos ter um panorama temporal do problema.

Esse foi apenas um início. Novas dúvidas surgiram, mas fica claro para quem se aventurar neste campo a necessidade de compor grupos multidisciplinares que atuem desde a biologia dos animais no campo, passando pelas enfermidades, toxicologia e chegando ao nível celular. O ensaio do cometa (ou "*single cell gel electrophoresis*") é uma ferramenta que tem tido grande destaque nos estudos de ecotoxicologia, pois de uma maneira relativamente barata, rápida e simples consegue analisar direta e individualmente problemas ocorridos no DNA das células.

Este estudo, a nosso ver, contribui significativamente para a discussão da influência antropogênica sobre a fauna de vertebrados terrestres no Brasil no que tange à sua relação com a agropecuária, abrindo perspectivas para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS GERAIS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul: Primeira aproximação. **Geomorfologia**, v. 52, n., p. 1-21, 1977.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M.; SALOMÃO, M. G. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W., HOGGREN, M., DOUGLAS, M. E. (Ed.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, 2002, p.445-462.
- ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil**: controle social e interesses corporativos. São Paulo: Annablume 2002. 188 p.
- AMARAL, A. Collectanea ophiologica. 13. Bicephalia em ophidios. **Revista Museu Paulista**, v. 15, p. 95-101, 1926.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Malformações em ninhadas de caíçaca, *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae). **Memórias Instituto Butantan**, v. 54, p. 61-67, 1992.
- ANKLEY, G. T.; DIAMOND, S. A.; TIETGE, J. E.; HOLCOMBE, G. W.; JENSEN, K. M.; DEFOE, D. L.; PETERSON, R. Assessment of the risk of solar ultraviolet radiation to amphibians. I. Dose-dependent induction of hindlimb malformations in the northern leopard frog (*Rana pipiens*). **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 13, p. 2853-2858, 2002.
- ANKLEY, G. T.; DEGITZ, S. J.; DIAMOND, S. A.; TIETGE, J. E. Assessment of environmental stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 58, n. 1, p. 7-16, 2004.
- BARROW, M. V. A brief history of teratology to the early 20th century. **Teratology**, v. 4, p. 119-129, 1971.
- BASTOS, E. G. M.; ARAÚJO, A. F. B.; SILVA, H. R. Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 812-815, 2005.
- BELLAIRS, A. D. A. Congenital and developmental diseases. In: COOPER, J. E. E JACKSON, O. F. (Ed.). **Disease of the reptilia**. London: Academic Press, 1981. v.2, p.469-485.
- BELLUOMINI, H. E. Bicefalia em *Xenodon merremii* (Wagler 1824) (Serpentes). **Memórias Instituto Butantan**, v. 28, p. 85-90, 1959.
- BELLUOMINI, H. E.; LANCINI, A. R. Bicefalia em *Leptodeira annulata ashmeadii* (Hall lowell) 1845 (Serpentes). Descrição de um teratódimo deródimo. **Memórias Instituto Butantan**, v. 29, p. 175-180, 1960.

BELLUOMINI, H. E. Serpenti bicefali. Revisione del materiale esistente nell'Istituto Butantan, Dipartimento di Zoologia e nell'Istituto Pinheiros, São Paulo-Brasile. **Archivo Zoologico Italiano**, v. 50, p. 129-144, 1965.

BELLUOMINI, H. E.; DE BIASI, P.; PUORTO, G.; BORELLI, V. Bicefalia em *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). (Serpentes: Viperidae, Crotalinae). **Memórias Instituto Butantan**, v. 40, p. 41-77, 1978.

BIDONE, E. D.; CASTILHOS, Z. C.; CID DE SOUZA, T. M.; LACERDA, L. D. Fish contamination and human exposure to mercury in the Tapajós River Basin, Pará State, Amazon, Brazil: a screening approach. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, n. 2, p. 194-201, 1997.

BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e de outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução Nº 251, de 07.08.1997 – Dispõe sobre a pesquisa de novos fármacos, vacinas e testes diagnósticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1997.

BRENT, R. L.; BECKMAN, D. A. Environmental teratogens. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 66, n. 2, p. 123-163, 1990.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. **The venomous reptiles of the Western hemisphere**: Comstock Pub. Associates Ithaca, 2004, v.1. 1032 p.

CARSON, R. P. **The silent spring**. New York: Houghton Mifflin, 1962. 375 p.

COPE, W. G.; LEIDY, R. B.; HODGSON, E. Classes of toxicants: use classes. In: HODGSON, E. (Ed.). **A textbook of modern toxicology**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004, p 49-74.

CUPPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acidente crotálico na infância: aspectos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e abordagem terapêutica. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 24, n., p. 87-96, 1991.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência**, v. 5, n. 2, p. 345-358, 2009.

FRANKS, M. E.; MACPHERSON, G. R.; FIGG, W. D. Thalidomide. **The Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1802-1811, 2004.

FRASER, F. C. Causes of congenital malformations in human beings. **Journal of Chronic Disease**, v. 10, n., p. 97-110, 1959.

FUTINO, A. M.; SILVEIRA, J. M. J. F. A indústria de defensivos agrícolas no Brasil. **Agricultura em São Paulo**, v. 38, n. Tomo especial p. 1-43, 1991.

GHOREISHI, K. Thalidomide. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of toxicology**. Oxford: Academic Press, 2014, p.523-526.

GOELLNER, C. I. **Utilização dos defensivos agrícolas no Brasil**: análise do seu impacto sobre o meio ambiente e a saúde humana. São Paulo: Artgraph, 1993. 102 p.

HELLGREN, E. C.; LOCHMILLER, R. L.; THOMAS, M. W.; GRANT, W. E. Cyclopia, congenital limb deformity, and osteomyelitis in the collared peccary, *Tayassu tajacu* (L.). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 4, p. 354-357, 1984.

HOULAHAN, J. E.; FINDLAY, C. S.; SCHMIDT, B. R.; MEYER, A. H.; KUZMIN, S. L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 752-755, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2006**: secondary title. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2009.

KAISER, J. Deformed frogs leap into spotlight at health workshop. **Science**, v. 278, n. 5346, p. 2051-2052, 1997.

LEIPOLD, H. W. Congenital defects of zoo and wild mammals: a review. In: MONTALI, R.; MIGAKI, G. (Ed.). **The comparative pathology of zoo animals**. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1980, p.457-470.

LENZ, W.; PFEIFFER, R. A.; KOSENOW, W.; HAYMAN, D. J. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 279, n. 7219, p. 45-46, 1962.

LINNEHAN, R. M. Congenital encephalocele in a mandarin duckling (*Aix galericulata*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 20, n. 2, p. 231-233, 1989.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G. W., HOGGREN, M., DOUGLAS, M. E. (Ed.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain Publishing, 2002, p.307-328.

MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Resíduos de pesticidas organoclorado em algumas espécies de peixe comercial da planície de inundação do alto Rio Paraná, região de Porto Rico (PR), Brasil. **Arquivos Biologia Tecnologia**, v. 37, n. 3, p. 637-644, 1994.

MCBRIDE, W. G. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 278, n. 7216, p. 1358, 1961.

MOORE, N. W. A synopsis of the pesticide problem. In: CRAGG, J. B. (Ed.). **Advances in ecological research**: Academic Press, 1967. v. Volume 4, p.75-129.

MORGAN, H. B.; DANFORO, G. S.; HOLLAND, F. M.; MILLER, K. C.; OWENS, E. T.; RICCI, B. E.; UPPULURI, S. Y.; WASSOM, J. S. How to obtain information about the teratogenic potential of chemicals. In: KOLB, M. (Ed.). **Studies in environmental science**: Elsevier, 1988. v. 31, p.6-41.

ORÓS, J.; RODRÍGUEZ, J. L.; MONTEROS, A. E.; RODRÍGUEZ, F.; HERRÁEZ, P.; FERNÁNDEZ, A. Tracheal malformation in a bicephalic Honduran milk snake (*Lampropeltis hondurensis*) and subsequent fatal *Salmonella arizonae* infection. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n. 3, p. 331-335, 1997.

PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental**: problemas e soluções. Rio de Janeiro: FGB, 1979. 102 p.

PASCHOAL, A. D. Biocidas: morte a curto e a longo prazo. **Revista Brasileira Tecnologia**, v. 14, n. 1, p. 24-40, 1983.

PENDLEBURY, G. B. Congenital defects in the brood of a prairie rattlesnake. **Canadian Journal of Zoology**, v. 54, n. 11, p. 2023-2025, 1976.

POWELL, J. W. B.; ARCHIBALD, R. T.; CROSS, C. A.; ROTSTEIN, D. S.; SOOP, V. M.; MCFEE, W. E. Multiple congenital cardiac abnormalities in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 3, p. 839-842, 2009.

RATCLIFFE, D. A. Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. **Nature**, v. 215, p. 208-201, 1967.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In: Korach, K. S. (Ed.). **Reproductive and developmental toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1998, p. 47-71.

ROTHSCHILD, B. M.; SCHULTZE, H.-P.; PELLEGRINI, R. **Herpetological osteopathology**: annotated bibliography of amphibians and reptiles. New York: Springer, 2012

RUEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C. M.; UNGARO, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; YOKOMIZO, Y.; ALMEIDA, W. Impacto dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. In: MARTINE, J. E GARCIA, R. C. (ED.). **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Ed. Caietés, 1987, p. 171-207.

SALOMÃO, M. D.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; PUORTO, G. Activity pattern of *Crotalus durissus* (Viperidae, Crotalinae): feeding, reproduction and snakebite. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, n. 2, p. 101-106, 1995.

SANT'ANNA, S. S.; ABE, A. S. Diet of the rattlesnake *Crotalus durissus* in southeastern Brazil (Serpentes, Viperidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 42, n. 3, p. 169-174, 2007.

SANTOS, S. **Para geneticistas e educadores**: o conhecimento cotidiano sobre herança biológica. São Paulo: Annablume, Fapesp, Sociedade Brasileira de Genética, 2005

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE, E. D. R. (Ed.). **Biology of pitvipers**. Texas: Selva, 1992, p. 199-216.

SCHMIDT, C. W. Amphibian deformities continue to puzzle researchers. **Environmental Science & Technology**, v. 31, n. 7, p. 324A-326A, 1997.

SCHUMACHER, G.-H. Teratology in cultural documents and today. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 186, n., p. 539-546, 2004.

SELBY, L. A.; NEWELL, K. W.; HAUSER, G. A.; JUNKER, G. Comparison of chlorinated hydrocarbon pesticides in maternal blood and placental tissues. **Environmental Research**, v. 2, n. 4, p. 247-255, 1969.

SMITH, D. W. Dysmorphology (teratology). **Journal Pediatrics**, v. 69, n. 6, p. 1150-1169, 1966.

SPEIRS, A. L. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 279, n. 7224, p. 303-305, 1962.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

TAYLOR, B.; SKELLY, D.; DEMARCHIS, L. K.; SLADE, M. D.; GALUSHA, D.; RABINOWITZ, P. M. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 11, p. 1497-1501, 2005.

TRUPKIEWICZ, J. G.; GULLAND, F. M. D.; LOWENSTINE, L. J. Congenital defects in northern elephant seals stranded along the central California coast. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 2, p. 220-225, 1997.

VIDAL, L. G. **O uso do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) como sentinela da poluição ambiental por compostos organoclorados (DDT, PCB, HCH, HCB e Mirex) em baías costeiras do Estado do Rio de Janeiro**. Faculdade de Oceanografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. 75 p.

WARKANY, J. Congenital malformations through the ages. In: KLINGER, M., (Ed.). **Drugs and fetal development** (Advances in experimental medicine and biology). Springer US, 1972. v. 27, p. 7-15.

WILSON, J. G. Experimental studies on congenital malformations. **Journal of Chronic Diseases**, v. 10, n. 2, p. 111-130, 1959.

APÊNDICES

Tabela A – Localidades, número de ninhadas filhotes totais e malformados de jararaca (*Bothrops jararaca*) nascidas no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan entre os anos de 2007 e 2014. Com asteriscos (*) estão os municípios com mais de sete ninhadas.

Município	UF	Nº de ninhadas	Nº total de filhotes	Filhotes com malformação	continua
					% filhotes malformados
Araçariguama*	SP	9	138	3	2,2%
Atibaia	SP	3	35	5	14,3%
Barueri	SP	2	30	0	0,0%
Bom Jesus dos Perdões	SP	1	17	0	0,0%
Caconde	SP	1	24	0	0,0%
Caieiras	SP	3	56	1	1,8%
Cajamar	SP	3	34	0	0,0%
Campo Limpo Paulista*	SP	7	88	6	6,8%
Cananéia	SP	1	17	0	0,0%
Canoinhas	SC	1	7	0	0,0%
Carapicuíba	SP	2	43	0	0,0%
Cotia*	SP	15	245	2	0,8%
Embu*	SP	10	157	11	7,0%
Embu-Guaçu	SP	4	98	3	3,1%
Extrema - MG	SP	1	10	0	0,0%
Franco da Rocha	SP	2	50	5	10,0%
Guarulhos	SP	1	15	0	0,0%
Ibiúna*	SP	18	293	13	4,4%
Itapecerica da Serra*	SP	17	364	3	0,8%
Itapevi	SP	5	99	4	4,0%
Itapira	SP	1	13	1	7,0%
Itaquaquecetuba	SP	1	20	0	0,0%
Itu	SP	3	52	1	1,9%
Itupeva	SP	1	10	0	0,0%
Jarinu	SP	2	43	1	2,3%
Jundiaí	SP	3	46	5	10,9%
Juquitiba*	SP	19	291	2	0,7%
Machado	MG	1	7	0	0,0%
Mairiporã	SP	5	112	1	0,9%
Mauá	SP	2	54	1	1,9%
Miracatu	SP	1	16	2	12,5%
Mogi das Cruzes	SP	4	50	0	0,0%

Município	UF	Nº de ninhadas	Nº total de filhotes	Filhotes com malformação	conclusão
					% filhotes malformados
Morungaba	SP	1	7	1	14,3%
Munhoz	MG	1	21	0	0,0%
Nazaré Paulista	SP	4	91	0	0,0%
Osasco	SP	2	49	1	2,0%
Papanduva	SC	1	24	0	0,0%
Parati	RJ	1	11	0	0,0%
Pariquera-Açu	SP	1	2	0	0,0%
Piedade*	SP	15	258	5	1,9%
Pilar do Sul*	SP	7	96	1	1,0%
Pindamonhangaba	SP	2	16	0	0,0%
Piquete	SP	3	28	1	3,6%
Piracaia	SP	4	72	2	2,8%
Poá	SP	1	32	0	0,0%
Potim	SP	1	15	0	0,0%
Praia Grande	SP	1	10	0	0,0%
Ribeirão Pires	SP	2	50	2	4,0%
Santa Isabel	SP	2	16	0	0,0%
Santana de Parnaíba*	SP	18	299	4	1,3%
Santo André	SP	1	19	1	5,3%
Santos	SP	2	15	2	13,3%
São Bento do Sul*	SC	24	343	9	2,6%
São Bernardo do Campo	SP	5	114	7	6,1%
São Lourenço da Serra*	SP	9	143	0	0,0%
São Luiz do Paraitinga	SP	1	12	0	0,0%
São Miguel Arcanjo	SP	1	25	0	0,0%
São Paulo*	SP	28	518	4	0,8%
São Roque*	SP	11	216	9	4,2%
Sumaré	SP	1	11	1	9,1%
Suzano	SP	1	22	1	4,5%
Taboão da Serra	SP	3	47	0	0,0%
Tapiraí	SP	3	55	3	5,5%
Ubatuba	SP	1	19	1	5,3%
Vargem Grande Paulista	SP	3	59	0	0,0%
Sem procedência		13	178	4	2,2%
Total		323	5427	129	2,4%

Tabela B - Localidades, microrregiões, número de ninhadas filhotes totais e malformados de cascavel (*Crotalus durissus*) nascidas no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan entre os anos de 2007 e 2014.

Município	Microrregião (IBGE)	UF	Nº de ninhadas	Nº total de filhotes	Filhotes com malformação	% filhotes malformados
Amparo	Amparo	SP	1	9	0	0,0%
Lindóia	Amparo	SP	1	26	3	11,5%
Socorro	Amparo	SP	2	20	2	10,0%
Bom Jesus dos Perdões	Bragança Paulista	SP	1	10	4	40,0%
Bragança Paulista	Bragança Paulista	SP	1	9	3	33,3%
Jarinu	Bragança Paulista	SP	1	3	2	66,7%
Sumaré	Campinas	SP	1	7	1	14,3%
Itumbiara	GO	SP	2	59	0	0,0%
Jataí	GO	SP	1	16	1	6,3%
Itupeva	Jundiaí	SP	1	15	0	0,0%
Louveira	Jundiaí	SP	1	7	0	0,0%
Pompéia	Marília	SP	1	17	0	0,0%
Consolação	Itajubá	MG	1	4	0	0,0%
Paraisópolis	Itajubá	MG	1	13	0	0,0%
Guararema	Mogi da Cruzes	SP	2	14	3	21,4%
Itaquaquecetuba	Mogi da Cruzes	SP	1	10	0	0,0%
Mogi das Cruzes	Mogi da Cruzes	SP	2	32	4	12,5%
Pirapora do Bom Jesus	Osasco	SP	1	15	10	66,7%
Santana de Parnaíba	Osasco	SP	1	1	0	0,0%
Pilar do Sul	Piedade	SP	2	25	2	8,0%
Jacareí	São José dos Campos	SP	1	10	1	10,0%
Caconde	São João da Boa Vista	SP	2	27	1	3,7%
Araçatiguama	Sorocaba	SP	2	9	0	0,0%
Itu	Sorocaba	SP	3	27	1	3,7%
São Roque	Sorocaba	SP	1	10	0	0,0%
Sem Procedência			10	71	13	18,3%
Total			41	391	50	12,8%