UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

RAFAEL AMORIM DE CASTRO

Efeitos do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus*

(SERPENTES:VIPERIDAE) mantidos em cativeiro

São Paulo

2018

RAFAEL AMORIM DE CASTRO

**Efeitos do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES:VIPERIDAE)
mantidos em cativeiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Clínica Veterinária

Área de concentração:

Patologia Clínica

Orientador:

Dr^a. Kathleen Fernandes Grego

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

RAFAEL AMORIM DE CASTRO

**Efeitos do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus*
(SERPENTES:VIPERIDAE) mantidos em cativeiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Clínica Veterinária

Área de concentração:

Patologia Clínica

Orientador:

Dr^a. Kathleen Fernandes Grego

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2018

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3678
FMVZ

Castro, Rafael Amorim de
Efeitos do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES:
VIPERIDAE) mantidos em cativeiro / Rafael Amorim de Castro. – 2018.
170 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Kathleen Fernandes Grego.

1. Parasitismo. 2. Cascavéis. 3. Imunossupressão. 4. Alterações anatomopatológicas. 5.
Ophidascaris sp. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus* mantidos em cativeiro", protocolada sob o CEUA nº 2474290616 (ID 002679), sob a responsabilidade de **Kathleen Fernandes Grego e equipe; Rafael Amorim de Castro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "Effects of endoparasitism in *Crotalus durissus terrificus* kept in captivity", utilizing 20 Brazilian wild species (males and females), protocol number CEUA 2474290616 (ID 002679), under the responsibility of **Kathleen Fernandes Grego and team; Rafael Amorim de Castro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 08/2016 a 08/2017

Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Origem: [Animais provenientes de outros projetos](#)

Espécie: [Espécies silvestres brasileiras](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 3 anos](#)

N: [20](#)

Linhagem: [Crotalus durissus](#)

Peso: [500 a 999 g](#)

Registro IBAMA/Sisbio/Etc:

Método de Captura: [Não se aplica.](#)

Local do experimento: Sala de experimento do Laboratório de Herpetologia.

São Paulo, 10 de julho de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 25 de outubro de 2017
CEUA N 2474290616

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Kathleen Fernandes Grego

Área: Clínica Médica Veterinária

Título da proposta: "Efeitos do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus* mantidos em cativeiro".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP (ID 002259)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 31/agosto/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: Estágio final. 2. Qual o N amostral alocado até o momento? Resp: 12. 3. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: 6 meses. 4. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: Não até o momento. 5. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: Não até o momento.".

Comentário da CEUA: "Relatório parcial aprovado.".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da endoparasitose em *Crotalus durissus terrificus* mantidos em cativeiro", protocolado sob o CEUA nº 2362041215, sob a responsabilidade de **Kathleen Fernandes Grego e equipe**; Rafael Amorim De Castro - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan da Instituto Butantan (CEUAIB) em reunião de 04/04/2016.

We certify that the proposal "Effects of endoparasitism in *Crotalus durissus terrificus* kept in captivity", protocol number CEUA 2362041215, under the responsibility of **Kathleen Fernandes Grego and team**; Rafael Amorim De Castro - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 04/04/2016.

Vigência da Proposta: de 04/2016 a 04/2019

Área: Herpetologia

Procedência: Herpetologia Herpetologia

Espécie: Espécies silvestres brasileiras

Sexo: Machos e Fêmeas

Idade: 1 a 3 anos

Nº: 20

Origem: *Crotalus durissus*

Peso: 500 a 900 g

Dados complementares para animais silvestres: Não se aplica

Resumo: As serpentes vêm conjuntamente parasitadas da natureza. O parasitismo é um agente exacerbador de estresse aos animais e esse estresse provoca uma queda na imunidade. Essa baixa na resistência pode deixar o organismo vulnerável a ação de vários agentes etiológicos, além de uma provável diminuição na produção de veneno dos animais. Para a realização deste estudo, vinte crocodídeos recém-chegados da natureza, selecionados através de exame coproparasitológico positivo serão divididos em dois grupos. Um dos grupos passará por vermifugação e o outro não. Coletas de sangue seriadas serão feitas com o objetivo de avaliar e comparar a resposta hematológica e bioquímica dos animais das diferentes grupos e ainda mensurar o grau de estresse, determinado pelo nível de corticosterona dos animais. Ao final do projeto, os animais serão submetidos a eutanásia, nos momentos e locais de tecidas serão encaminhadas para histopatologia.

São Paulo, 27 de abril de 2016

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Nome: CASTRO, Rafael Amorim de

Título: Efeitos do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus*

(SERPENTES:VIPERIDAE) mantidos em cativeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus amados pais Helena e Ecil
que nunca pouparam esforços e sempre
se sacrificaram para me dar tudo o que
um filho poderia sonhar!*

*Aqueles que me adotaram e me amam
como filho, Regina e Mário Célio (in memoriam)
não existe presente maior na minha vida,
obrigado por me aceitarem e cuidarem de mim,
obrigado por cuidarem de meus pais de sangue
e por serem companheiros maravilhosos.*

A toda a minha família, por sempre acreditarem em mim!
Sem você a vida não teria graça e nada teria sentido,
muito obrigado pelo apoio e fé sempre depositados.

*A Juliana da Silva Medeiros, pelo extremo
companheirismo, apoio e amor incondicional!!*

Amo você!

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”.*

(George Bernard Shaw)

AGRADECIMENTOS

A Dr^a. Kathleen Fernandes Grego, por ter aceitado esse grande desafio e por ter me orientado com a firmeza de todo o orientador, mas com a compreensão de uma amiga e com a carinho de uma mãe.

Aos pesquisadores Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna e Dr^a. Anita Mitico Tanaka-Azevedo por todas as orientações, por sempre serem solícitos e dispostos a ajudar. Pelos ensinamentos, dicas, broncas e por sempre crer em mim pessoal e profissionalmente. A ciência agradece e eu mais ainda!!

A Prof. Dr^a. Maria Cláudia Araripe Sucupira e aos demais professores do Departamento de Clínica Veterinária, bem como todos os colaboradores, funcionários e demais pós-graduandos por terem aceito a proposta e acreditado em nós. É assim que se faz ciência!!!

Agradeço a todos os funcionários do Laboratório de Herpetologia, Rosângela, Karen, Marisa, Eliana, Dona Cármen, Dona Lúcia, Dona Léo, Joséfa, Grazi, Toninho, Severino, Binho, Marquinhos, Claudião, Pedro, Fábio, Samira, Daniel, Ana Helena e Jarbas que direta ou indiretamente ajudaram neste projeto ou simplesmente estavam presentes nos momentos de descontração e relaxamento. Minha vida é mais divertida com vocês!

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa GM que me permitiu realizar este projeto.

Ao amigo Dr. Daniel Rodrigues Stuginski, um dos maiores herpetólogos que tive o prazer de conhecer, profissional extremamente aplicado e dedicado ao estudo das serpentes; agradeço pelas horas dedicadas à minha formação e ao meu aprendizado dentro deste laboratório.

A amiga e bióloga Samira Emanuela Maria Vieira, que entrou no mesmo dia que eu dentro do laboratório, que aprendeu a “engatinhar, andar e correr” junto comigo no laboratório meu MUITO obrigado pelo incentivo, pelas horas de conversa e por sempre acreditar em mim.

Ao amigo e biólogo tiozinho, você sempre foi muito atencioso, receptivo e carinhoso com todos os que entraram no laboratório. Talvez você seja a pessoa que primeiro dê conforto aos novos e isso é muito precioso! Obrigado por ter feito isso por mim!

Aos amigos e papistas, Samantha, Leonardo, Mariana, Lucas, Fabíola, Giovanni, Eduardo, Helena, Jéssica e Fernanda por caminharem ao meu lado, aceitarem os ensinamentos e por ensinarem muitas vezes!

A amiga Dr^a. Ana Helena Pagotto Stuginski por ser extremamente correta, acolhedora e sensível com as necessidades dos demais. Você é uma GRANDE pessoa e um GRANDE médica veterinária!

A Dr^a. Juliana Marigo que com muita paciência e bom humor me ajudou, sempre com EXTREMA competência e zelo! Se o mundo tivesse mais uma ou duas de você, com certeza ele seria bem melhor!! Estendo os agradecimentos aos técnicos e todos os que de certa forma colaboraram comigo no LAPCOM.

Ao Dr. Marcelo Pires de Nogueira Carvalho pelo auxílio no decorrer do projeto e pelas horas de descontração e jogatina, você é a prova de que ciência e bom-humor podem andar de mãos dadas!

A todos os membros da família Amorim, mesmo longe e se falando pouco eu nunca me esqueço de vocês, nossa família é linda, grande e feliz e se pudesse trocá-los, jamais o faria!

A família de Castro de quem morro de saudades todos os dias, vocês são fonte de inspiração e exemplo de união. Eu não existiria sem vocês e mesmo de longe, sei o quanto torcem por mim!

Dona Helena, minha mãe querida e amada, se tivesse que REALMENTE agradece-la utilizando essas linhas, ao final provavelmente teria mais páginas do que esta dissertação. Obrigado por ser quem você é e do jeitinho que você é! Meu amor por você é maior do que esta vida!! EU TE AMO!!

Papa, meu pai amado Ecil, acho que todo o filho vê a pai como super-herói na infância. Bom, eu vejo você como super-herói até hoje, você é um dos meus maiores exemplos e digo que se chegar a ser 10% do que você é para mim (e para um monte de gente que te ama naquela praça da árvore) eu estarei mais do que realizado! EU TE AMO!

A minha mãedrastra Regina que SEMPRE me amou e se dedicou! Meu muito obrigado por mostrar que a palavra madrastra não vale para o nosso caso. Você merece a palavra ótimadrastra!! EU TE AMO!!

Meu amado pai Mário Célio, um guerreiro que com certeza foi um dos GRANDES responsáveis por esta conquista. Espero que onde quer que você esteja, se orgulhe de mim e proteja sempre a todos nós! Brigaduoooooooo!!! EU TE AMO!

Aos meus irmãos Raphael, Vinícius e Christiane por me mostrarem como é boa essa coisa de irmão! Vocês são demais! AMO VOCÊS!!!

Léo, Rafa e Marcão, outros três irmãos que eu ganhei de presente da vida, obrigado por estarem comigo (perto ou longe)! Obrigado por fazerem parte da minha história a pelo menos 10 anos e me mostrar o que é a verdadeira amizade! AMO VOCÊS!

Por último, mas não menos importante, agradeço a você Juliana da Silva Medeiros por ser esta mulher incrível, por cuidar e se preocupar comigo de todas as formas possíveis, obrigado por me entender e por ser paciente, obrigado pela família que você me deu e que eu já amo demais. Mas, principalmente, obrigado por ter me escolhido pra trilhar essa jornada com você. Sou muito honrado por isso! EU TE AMO!!

RESUMO

Castro, R.A. **Efeito do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES:VIPERIDAE) mantidos em cativeiro.** [Effect of endoparasitism on *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES: VIPERIDAE) kept on captivity]. 2018. 170 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública nos países tropicais, sendo listada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) com uma doença negligenciada. A manutenção de serpentes em cativeiro tornou-se uma alternativa para a obtenção do veneno para pesquisas imunológicas e produção de soro antiofídico. No Brasil, o gênero *Crotalus* é responsável por 10% dos acidentes ofídicos registrados e apresenta a maior taxa de letalidade, por volta de 1,0%. O Instituto Butantan, conta com o Laboratório de Herpetologia que desde a década de 60 mantém o programa de criação de serpentes em sistema intensivo. Muitas serpentes de vida livre que morrem pouco depois da chegada ao cativeiro, ou ainda na pós-captura, sofrem da “síndrome de má adaptação”. Esta síndrome é caracterizada por anorexia, emagrecimento progressivo, fragilidade dos tecidos e maior susceptibilidade às infecções por microrganismos. Todas essas alterações ocorrem devido a imunossupressão desencadeada pelo estresse. Por esse motivo a presença de endo e ectoparasitos torna-se um problema na manutenção dos animais, pois além de provocar enfermidades, a presença dos parasitos interfere na produção de veneno, uma vez que sua quantidade e qualidade estão diretamente associadas à alimentação e saúde das serpentes. Por este motivo o objetivo da presente pesquisa foi determinar as alterações hematológicas, bioquímicas provocadas pela ação de endoparasitas em *Crotalus durissus terrificus* e correlacioná-las com as níveis plasmáticos de corticosterona para determinar se animais parasitados apresentam valores maiores de corticosterona do que animais sadios, outra intenção da pesquisa foi determinar as alterações anatomopatológicas provocadas pelos parasitos nas serpentes e ainda determinar quais os principais parasitos que acometem a espécie em questão. As alterações hematológicas observadas, estatisticamente significante ocorreram no VCM e HCM das serpentes indicando uma possível anemia regenerativa com recrutamento de

células jovens. Os parâmetros bioquímicos mantiveram-se praticamente iguais entre os Grupos do estudo. Com relação a concentração plasmática de corticosterona, os animais parasitados apresentaram maiores valores basais em todas as coletas, evidenciando que animais parasitados são mais estressados e conseqüentemente mais susceptíveis à infecções. Alterações histopatológicas foram observadas em ambos os Grupos, mas apenas os animais parasitados apresentaram inflamações granulomatosas, congestão gástrica além da presença de parasitas no sistema digestório. Com relação a determinação dos parasitos, em nossa pesquisa utilizamos técnicas moleculares (PRC) para determinar quais gêneros são mais frequentes e encontramos 80% de parasitismo por ascarídeo do gênero *Ophidascaris* sp.

Palavras-chave: Parasitismo. Cascavéis. Imunossupressão. Alterações anatomopatológicas. *Ophidascaris* sp

ABSTRACT

CASTRO, R.A. **Effect of endoparasitism on *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES: VIPERIDAE) kept on captivity.** [Efeito do endoparasitismo em *Crotalus durissus terrificus* (SERPENTES:VIPERIDAE) mantidos em cativeiro]. 2018. 170 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Snakebite accidents represent a public health problem in tropical countries, being listed by the World Health Organization (WHO) with a neglected disease. The maintenance of captive snakes has become an alternative for obtaining venom for immunological research and the production of anti-venom. In Brazil, the genus *Crotalus* is responsible for 10% of recorded ophidian accidents and has the highest lethality rate, around 1.0%. The Instituto Butantan, counts on the Laboratory of Herpetology that since the decade of 60 maintains the program of creation of snakes on captivity. Many free-living snakes that die shortly after arrival in captivity, or even post-capture, suffer from the "maladaptation syndrome." This syndrome is characterized by anorexia, progressive thinning, tissue fragility and greater susceptibility to infections by microorganisms. All of these changes occur due to stress-induced immunosuppression. For this reason, the presence of endo and ectoparasites becomes a problem in the maintenance of the animals, because in addition to causing diseases, the presence of parasites interferes in the production of venom, since their quantity and quality are directly associated with food and health of the animals. snakes Therefore, the aim of the present study was to determine the hematological, biochemical alterations caused by endoparasites in *Crotalus durissus terrificus* and to correlate them with plasma corticosterone levels to determine if parasitized animals present higher values of corticosterone than healthy animals, another The aim of the research was to determine the anatomopathological alterations caused by the parasites in the snakes and to determine the main parasites that affect the species in question. The observed hematological alterations, statistically significant, occurred in MVC and MCH of the snakes indicating a possible regenerative anemia with recruitment of young cells. The biochemical parameters remained practically equal between the study Groups. Regarding the plasma corticosterone concentration, the parasitized animals presented higher baseline values in all collections, showing that parasitized animals are

more stressed and consequently more susceptible to infections. Histopathological changes were observed in both Groups, but only the parasitized animals presented granulomatous inflammation, gastric congestion and the presence of parasites in the digestive system. With regard to the determination of the parasites, in our research we used molecular techniques (PCR) to determine which genera are most frequent and found 80% of parasitism per ascarid of the genus *Ophidascaris* sp.

Keywords: Parasitism. Rattlesnakes. Immunosuppression. Anatomopathological alterations. *Ophidascaris* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Achados necroscópicos. A: Granuloma parasitário em estômago, note local de inserção dos parasitos (pinça). B: Coração, note parasito entre pericárdio e o coração (tesoura). C: Note parasito aderido a face externa do saco aéreo (seta). D: Estômago com severa congestão e secreção catarral. E: Fígado, note cápsula e parasitos entre a cápsula e o fígado (seta). F: Note parasito aderido na cavidade celomática (tesoura). 107

Figura 2 - A: Fígado, note cápsula espessada com parasito encistado (seta); (aumento 10x). B: Estômago, edema de camada muscular e presença de parasito encistado (seta); (aumento 4x). C: Parênquima pulmonar contendo dois parasitos encistados (seta); (aumento 10x). D: Intestino, note parasito encistado na camada muscular (seta); (aumento 4x).x 116

Figura 3- A: Coração, infiltração heterofílica e espessamento de pericárdio com parasito encistado (seta); (aumento 4x). B: Fígado, parasito em cápsula e parênquima hepático; (aumento 4x). C: Estômago, inflamação granulomatosa contendo parasitos; (aumento 4x). D: Parênquima pulmonar, note edema e parasito encistado em serosa (seta); (aumento 4x). 117

Figura 4- A: Parênquima pulmonar, note vaso com endotélio espessado ao lado de dois parasitos (seta); (aumento 4x). B: Coração, note dois parasitos encistados no pericárdio. 118

Figura 5- Gel de agarose com amplificação de região espaçadora (ITS1) de nematódeos dos animais do estudo, colheita do Grupo 2. Lanes 1-15, note fragmentos 2, 4 e 10 maiores e o restante do mesmo tamanho (100bp ladder, banda mais forte equivale a 600pb). . 119

Figura 6 - Cromatograma de sequencias senso (21) e anti-senso (20) menores, note repetições de CA, GC e GC, GT e diminuição da qualidade do sequenciamento logo após. 120

Figura 7- Análise molecular filogenética com método de máxima verossimilhança. .. 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Animais do grupo tratamento - Grupo 1	66
Tabela 2. Animais do grupo controle - Grupo 2.....	67
Tabela 3. Informações sobre as espécies e hospedeiros das sequencias obtidas no Genbank.	78
Tabela 4. Valores hematológicos médios do Grupo 1 com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2018.....	84
Tabela 5. Valores hematológicos médios do Grupo 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2018.....	85
Tabela 6. Comparação entre valores médios do volume corpuscular médio (VCM) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.....	86
Tabela 7. Comparação entre valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.....	86
Tabela 8. Valores bioquímicos médios do Grupo 1 com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2018.....	88
Tabela 9. Valores bioquímicos médios do Grupo 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2018.....	89

Tabela 10. Valores plasmáticos de corticosterona dos animais do Grupo 1 ao longo das colheitas. São Paulo, 2018.....	91
Tabela 11. Valores plasmáticos de corticosterona dos animais do Grupo 2 ao longo das colheitas. São Paulo, 2018.....	92
Tabela 12. Média dos valores plasmáticos de corticosterona intergrupos, entre as diferentes colheitas. São Paulo, 2018.....	93
Tabela 13. Histórico de peso, comprimento e alimentar dos animais do Grupo 1. São Paulo, 2018.	96
Tabela 14. Histórico de peso, comprimento e alimentar dos animais do Grupo 2. São Paulo, 2018.	99
Tabela 15. Descrição dos achados de necropsia dos animais do Grupo 1. São Paulo, 2018.	104
Tabela 16. Descrição dos achados de necropsia dos animais do Grupo 2. São Paulo, 2018.	106
Tabela 17, Achados histopatológicos dos animais do Grupo 1. São Paulo, 2018.....	110
Tabela 18. Achados histopatológicos dos animais do Grupo 2. São Paulo, 2018.....	114
Tabela 19. Comparação entre os valores médios da contagem total de eritrócitos (CTE) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.	158

Tabela 20. Comparação entre valores médios da contagem total de leucócitos dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 158

Tabela 21. Comparação entre valores médios de hemoglobina (Hb) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018..... 159

Tabela 22. Comparação entre valores médios do Hematócrito (Ht) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 159

Tabela 23. Comparação entre valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018..... 160

Tabela 24. Comparação entre valores médios de linfócitos dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018..... 160

Tabela 25. Comparação entre valores médios de azurófilos dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018..... 161

Tabela 26. Comparação entre valores médios de heterófilos íntegros dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018..... 161

Tabela 27. Comparação entre valores médios de heterófilos degranulados dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.... 162

Tabela 28. Comparação entre valores médios de basófilos dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018..... 162

Tabela 29. Comparação entre valores médios da contagem total de trombócitos (CTT) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 163

Tabela 30. Comparação entre valores médios de ácido úrico (AU) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 164

Tabela 31. Comparação entre valores médios de albumina (Alb) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 164

Tabela 32. Comparação entre valores médios de ALT dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 165

Tabela 33. Comparação entre valores médios de AST dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 165

Tabela 34. Comparação entre valores médios de cálcio (Ca) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 166

Tabela 35. Comparação entre valores médios de CK-NAC dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 167

Tabela 36. Comparação entre valores médios de colesterol dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 167

Tabela 37. Comparação entre valores médios de creatinina-K dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 168

Tabela 38. Comparação entre valores médios de fosfatase alcalina dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 168

Tabela 39. Comparação entre valores médios de fósforo dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 169

Tabela 40. Comparação entre valores médios de glicose dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018. 169

Tabela 41. Comparação entre valores médios de proteínas totais (PT) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018..... 170

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação dos valores plasmáticos médios de Corticosterona do Grupo 1 e do Grupo 2. São Paulo, 2018.	94
Gráfico 2. Acompanhamento do peso (g) dos Animais do Grupo 1. São Paulo, 2018...	98
Gráfico 3. Acompanhamento do peso (g) dos Aniamis do Grupo 2. São Paulo, 2018.	101
Gráfico 4. Eliminação média de ovos por gramas de fezes entre os Grupos 1 e 2, entre 10 diferentes colheitas.....	102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	34
2.1. SERPENTES.....	34
2.2 <i>Crotalus durissus terrificus</i>	35
2.3. PARASITISM EM SERPENTES.....	36
2.3.1. Coccídeos.....	38
2.3.2. Rhabditida.....	40
2.3.3. Strongylida.....	42
2.3.4 Ascaridida.....	43
2.3.5 Spirurida.....	44
2.3.6 Acanthocephala.....	45
2.3.7 Pentastomida.....	46
2.4. PRINCIPAIS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE PARASITISMO.....	48
2.4.1. Principais métodos coproparasitológicos.....	50
2.4.1.1. Método do esfregaço direto.....	50

2.4.1.2 Técnicas de concentração de amostra.....	50
2.5. ASPECTOS HEMATOLÓGICOS DO SANGUE DOS RÉPTEIS.....	51
2.5.1. Eritrócitos.....	51
2.5.2. Leucócito.....	52
2.5.2.1. LinfócitoS.....	52
2.5.2.2. Monócitos.....	53
2.5.2.3. AzurófiloS.....	53
2.5.2.4. Heterófilos.....	54
2.5.2.5. Eosinófilos.....	54
2.5.2.6. Basófilos.....	55
2.5.3 Trombócitos.....	56
2.6 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO SANGUE DOS RÉPTEIS.....	57
2.6.1. Ácido Úrico.....	57
2.6.2. Alanina Aminotransferase (ALT).....	57
2.6.3 Aspartato Aminotransferase (AST).....	58
2.6.4. Cálcio.....	58
2.6.5. CK- Creatinoquinase.....	59
2.6.6. Creatinina.....	59
2.6.7. Colesterol.....	59

2.6.8. Fosfatase alcalina.....	59
2.6.9. Fósforo.....	60
2.6.10. Glicose.....	60
2.6.11. Proteínas Plasmáticas Totais (PPT).....	61
2.6.12. Ureia.....	61
2.7. ESTRESSE NOS RÉPTEIS.....	65
3. OBJETIVOS.....	67
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1. ANIMAIS.....	67
4.2. EXAMES LABORATORIAIS.....	68
4.2.1. Exame coproparasitológico.....	68
4.2.1.1. Método do esfregaço direto.....	68
4.2.1.2. Sacarose saturada (Técnica de Willis).....	68
4.2.1.3. Sedimentação pelo éter etílico.....	69
4.2.1.4. Método de McMaster.....	70
4.2.2. Exames hematológicos e bioquímicos.....	70
4.2.2.1. Exames hematológicos.....	73
4.2.2.2. Exames Bioquímicos.....	73
4.2.3. Dosagem de Corticosterona.....	74

4.3. EXAME ANÁTOMO-PATOLÓGICO.....	75
4.4. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	76
4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	76
4.5.1. Reações Moleculares.....	77
4.5.2. Purificação e quantificação dos produtos de PCR.....	77
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
4.6.1. IMPUTAÇÃO DE DADOS FALTANTES (<i>missing data</i>).....	78
4.6.2. ANÁLISE DOS DADOS.....	78
5. RESULTADOS.....	80
5.1. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	82
5.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	82
5.3. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA.....	86
5.4. CONDIÇÕES GERAIS DOS ANIMAIS.....	90
5.5. AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA.....	103
5.1.1. Avaliação necroscópica dos animais.....	103
5.5.1.1. Avaliação necroscópica das serpentes do Grupo 1.....	103
5.5.2. Avaliação histopatológica.....	105
5.5.2.1. Avaliação histopatológica do Grupo 1.....	108
5.5.2.2. Avaliação histopatológica do Grupo 2.....	108

5.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PARASITAS.....	119
6. DISCUSSÃO.....	122
6.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	122
6.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	123
6.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	127
6.4. CONDIÇÕES GERAIS DOS ANIMAIS.....	131
6.5 ANÁLISE DA RELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CORTICOSTERONA ENTRE OS GRUPO 1 E 2.....	132
6.6. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ANATOMO-PATOLÓGICAS.....	135
6.7 ANÁLISE DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	138
7. CONCLUSÕES.....	141
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
9. APÊNDICES	158

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a segunda posição na relação de países com maior diversidade de répteis, abrigando 721 espécies nativas em que 371 são serpentes (CAMPBELL, J., LAMAR, 2004; MELLO, 2013) e das quais, aproximadamente, 70 são peçonhentas de importâncias em saúde, inseridas em duas famílias e em quatro gêneros: *Crotalus durissus* ssp (cascavéis), *Bothrops* spp (grupo das jararacas), e *Lachesis muta* (surucucupico-de-jaca) pertencentes à subfamília Crotalinae da família Viperidae; e *Micrurus* spp (corais verdadeira) pertencentes à família Elapidae (MELGAREJO, 2003; ALBUQUERQUE, 2007). A subfamília Crotalinae é caracterizada pela presença de um órgão termorreceptor de cada lado da cabeça, entre os olhos e a narina, denominada de fosseta loreal (CAMPBELL, J., LAMAR, 2004; MARINHO, 2007).

O gênero *Crotalus* é originário da América do Norte, tendo dispersado para a América Central e do Sul (ECHEVERRIGARAY et al., 2001; HOYOS ARGÁEZ; ALMEIDA-SANTOS, 2012) há aproximadamente 1,1 milhão de anos atrás, através do istmo da América Central e do istmo do Panamá respectivamente (WÜSTER et al., 2005). Este gênero ocorre na maior parte da América do Sul (MARINHO, 2007), distribuindo-se descontinuamente (WÜSTER; BÉRNILS, 2011; HOYOS ARGÁEZ; ALMEIDA-SANTOS, 2012) da Colômbia até a Argentina (VANZOLINI; CALLEFFO, 2002). No Brasil ocorre apenas uma espécie, a *Crotalus durissus* (MELLO, 2013) com 6 subespécies: *C.d. cascavella* (regiões de caatinga do Nordeste), *C.d. collilineatus* (área secas do Centro-Oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo) , *C.d. marajoensis* (ilha do Marajó), *C.d. ruruima* (região Norte), *C.d. terrificus* (zonas altas e secas da região Sul oriental e meridional) e *C.d. trigonicus* (Roraima) (CAMPBELL; LAMAR, 1989; HOYOS ARGÁEZ; ALMEIDA-SANTOS, 2012; MELLO, 2013). Não há relatos deste gênero nos estados do Acre e Espírito Santo (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

As *Crotalus*, conhecidas popularmente como cascavel, cascavel-de-quatro-ventas, boicininga, maracá, boiquira e maracaboia (CAMPBELL, J., LAMAR, 2004; SANTOS, 2005; MELLO, 2013), são animais terrícolas, robustos, pouco ágeis e com um guizo na extremidade da cauda. De hábito alimentar especializado, predam pequenos mamíferos, como roedores e marsupiais, desde o nascimento (CAMPBELL, J., LAMAR, 2004).

O veneno da cascavel possui atividade neurotóxica, miotóxica e coagulante (MELLO, 2013). No local da picada quase não há reação, mas podem ser observados edema, eritema, pouca ou nenhuma dor e sensação de adormecimento (SANTOS, 2005; MELLO, 2013). Devido à fração neurotóxica do veneno, os acidentados podem apresentar paralisia flácida da musculatura esquelética, da musculatura intercostal e diafragma, causando insuficiência respiratória. A ação coagulante provoca sangramento e distúrbios de coagulação resultante do consumo de fibrinogênio. Frequentemente, em casos graves tratados tardiamente, a ação miotóxica sistêmica pode causar rabdomiólise que afeta os rins, levando a um quadro de insuficiência renal aguda (PINHO; PEREIRA, 2001). O tratamento é feito com a aplicação de soro anticrotálico na dose e frequência adequadas (AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, 1992).

Os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública nos países tropicais (OLIVEIRA, RC; WEN, FH; SIFUENTES, 2009), sendo consideradas doenças negligenciadas pela World Health Organization (WHO). Cerca de 20.000 acidentes ofídicos são registrados todos os anos no Brasil (TEIXEIRA, 2000; SINAN, 2018), sendo os viperídeos responsáveis por 99% de todos os acidentes envolvendo serpentes peçonhentas de interesse em saúde pública e pelos mais graves acidentes registrados (ALBUQUERQUE, 2007; SINAN, 2018). No Brasil, em 2016, o gênero *Crotalus* foi responsável por 10% dos acidentes, *Lachesis* por 2,4% e o gênero *Bothrops* por 86,5%

(SINAN, 2018) sendo que o envenenamento crotálico possui a maior taxa de letalidade, por volta 1,0% (SINAN, 2018).

Desde o final do século XIX, com a descoberta de Vital Brazil no que diz respeito à especificidade dos soros antiofídicos e à criação dos soros específicos (soro antibotrópico, soro anticrotálico, soro antilaquético e soro antielapídico; além do soro polivalente, antibotrópico-crotálico) (BRAZIL, 2001), somente a soroterapia específica é eficaz no tratamento do acidente ofídico, salvando milhares de vidas. A produção de soros no Brasil iniciou-se em 1901 com a criação do Instituto Soroterápico do Estado de São Paulo, dirigido por Vital Brazil (BRAZIL, 2001; MELLO, 2013), que logo mudou de nome para Instituto Butantan, atualmente um dos principais centros produtores de vacinas e soros no Brasil. (HIGASHI, 2001).

A produção de diferentes soros antipeçonhas em larga escala, necessita de extração regular de muitas serpentes peçonhentas de diferentes gêneros e espécies. Neste cenário, a manutenção de serpentes peçonhentas em cativeiro, tornou-se uma alternativa para a obtenção de veneno, tanto para a produção, como para pesquisas imunológicas.

O Laboratório de Herpetologia mantém desde a década de 60, o programa de criação de serpentes em cativeiro, não somente com a finalidade de obtenção de veneno, mas também para aumentar o nosso conhecimento a respeito do comportamento reprodutivo das diferentes espécies, fisiologia dos ofídios e principais enfermidades e patologias que acometem este grupo em cativeiro. Atualmente o laboratório mantém cerca de 1.000 serpentes peçonhentas em cativeiro, pertencentes a diversas espécies e originárias de várias regiões geográficas brasileiras. Em relação à espécie *Crotalus durissus*, o Laboratório possui, aproximadamente, 150 cascavéis em seu plantel.

Apesar da experiência na criação e manutenção de serpentes peçonhentas em cativeiro, ainda existem inúmeras dificuldades em relação ao diagnóstico precoce, à prevenção e ao controle de doenças infecciosas no plantel (ALBUQUERQUE, 2007). Serpentes provenientes da natureza estão amplamente sujeitas a diversos agentes estressantes relacionados ao cativeiro, que enfraquecem o seu sistema levando-as a desenvolver enfermidades (HEAT, 1983). Muitas serpentes que chegam de vida livre morrem dentro dos dois primeiros anos pós-captura, sendo a “síndrome da má adaptação ao cativeiro” a principal causa dos óbitos (HOGE, A.R.; FEDERSONI, 1981; KOLESNIKOVAS, 1997). Esta síndrome é caracterizada por anorexia, emagrecimento progressivo, fragilidade dos tecidos e maior susceptibilidade às infecções por microrganismos, até mesmo aos normalmente inócuos. Por esse motivo, a presença de endo e ectoparasitos torna-se um problema na manutenção dos animais, pois além de propiciar o aparecimento de enfermidades, a presença dos parasitos interfere na produção de veneno, uma vez que a quantidade e qualidade do mesmo estão diretamente associadas à alimentação e saúde das serpentes (MELLO, 2013).

As infecções parasitárias são mais comumente observadas em animais da natureza (MADER, 2006) ou nos de cativeiro que não passaram por nenhum tratamento profilático, embora, segundo Teixeira (2000), as serpentes mantidas por longos períodos em cativeiro também possam apresentar alguma forma de doença parasitária. As serpentes podem ser acometidas por ectoparasitos (ácaros, carrapatos e larvas de Diptera) (JACOBSON, 2007) e por endoparasitos (nematódeos, cestódeos, trematódeos, pentastomídeos, e protozoários) (TEIXEIRA, 2000). Em relação aos endoparasitos, o sistema mais comumente infestado é o digestório (WILSON; CARPENTER, 1996; BENSON, 1999), mas também são encontrados no sistema respiratório, no renal e no sanguíneo (VENTURIN, J. F.; JATOBÁ-LIMA, C.A.; COSTA, M.R.F.; ROJAS; J.M.;

VIEIRA, 2007). Os sinais clínicos mais relacionados à parasitose são anemia, anorexia, redução na sobrevivência e na competitividade; além da redução na fecundidade das fêmeas (VITT; CALDWELL, 2009).

Estão descritas 44 espécies de trematódeos, 40 espécies de nematódeos e 10 espécies de cestódeos parasitando serpentes brasileiras (ROSSELLINI, 2007). Em *C. durissus* já foram descritos os seguintes helmintos: *Ascaridia flexuosa*, *Capillaria crotali*, *Hastospiculum onchocercum*, *Hexameta boddaertii*, *Kalicephalus costatus costatus*, *K. inermis inermis*, *K. implicatus*, *Ophidascaris* spp, *O. arndti*, *O. trichuriformis*, *Polydelphis quadrangulares*, *Travassosarcaris araujo*, *Acanthorabdias acanthorabdias*, *Rhabdias* spp, *Ophiodiplostomum spectabile* e *O. durissus* (SILVA et al., 2001; DIAS et al., 2004; ROSSELLINI, 2007).

Os répteis também são hospedeiros de uma variedade de hemoparasitas incluindo os protozoários, os vírus e estruturas de classificação incerta (CAMPBELL, 1996a) que, em geral, necessitam de vetores para sua transmissão, como mosquitos, moscas, carrapatos e ácaros hematófagos (FALCE, 2009). Alguns desses parasitos são altamente patogênicos e têm o potencial de causar doenças como anemia hemolítica e inanição (CAMPBELL, 1996a). Os hemoprotozoários são de grande importância na medicina de répteis (FALCE, 2009), ocorrendo com maior frequência as hemogregarinas (*Haemogregarina*, *Hepatozoon* e *Karyolysus*), os trypanossomatídeos e *Plasmodium* spp. (CAMPBELL, 1996a; MADER, 2006; FALCE, 2009) e, menos frequentemente, são encontradas *Leishmanias*, *Saurocytozoon*, *Hemoproteus*, *Schellackia* e piroplasmídeos (HAWKEY, C.M., DENNETT, 1989; FALCE, 2009).

Devido aos efeitos deletérios que o parasitismo pode causar nas serpentes, prejudicando a manutenção, a reprodução e a obtenção de veneno em cativeiro, verificou-

se a necessidade de realizar este estudo para entender melhor como a endoparasitose afeta os animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SERPENTES

As serpentes pertencem ao reino Animal, ao Filo Chordata, ao Subfilo Vertebrata, Classe Reptilia, Ordem Squamata. A classe Reptilia contém 10.450 espécies, divididas em quatro ordens de répteis viventes: Ordem Chelonia (tartarugas), Ordem Crocodylia (crocodilos e jacarés), Ordem Rhynchocephalia (tuatara) e Ordem Squamata (anfíbios, lagartos e serpentes) (MARINHO, 2007; COSTA; BÉRNILS, 2015; UETZ, 2016). Uma das características dos répteis é a ectotermia, em que os animais obtêm o calor necessário para elevar sua temperatura corpórea a partir do meio externo (POUGH, 1999).

Os representantes da Ordem Squamata estão distribuídos, geograficamente, por quase todos os ambientes, sendo mais abundantes nos trópicos, pouco frequentes nas regiões temperadas e ausentes nas calotas polares (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2002). Numericamente constituem o segundo maior grupo de répteis atuais, com 3.619 espécies reconhecidas (UETZ, 2016). O Brasil possui a segunda colocação na relação de países com maior riqueza de espécies de répteis, com registro de 721 espécies nativas, sendo 371 espécies de serpentes (CAMPAGNER, 2011; COSTA; BÉRNILS, 2015).

As serpentes sofreram modificações anátomo-fisiológicas como redução e posterior desaparecimento dos membros, escamas córneas mais salientes adaptadas à locomoção, especialização dos ossos do crânio, do conjunto mandibular e das glândulas salivares que permitem a ingestão e digestão de presas inteiras (COBORN, 1991). Todas as serpentes são carnívoras, com hábitos alimentares e estratégias de caça inerentes à cada espécie (GREENE, 1997; MARINHO, 2007).

De modo geral, as serpentes podem apresentar atividade diurna ou noturna,

mas há espécies que são ativas nos dois períodos. Essa atividade pode estar relacionada com a termorregulação, procura de alimento e parceiro para acasalamento, sendo os machos mais ativos nesta última atividade. Existem serpentes aquáticas e terrestres, as aquáticas ocorrem tanto na água doce quanto na água salgada. As terrestres ocupam os habitats fossorial, terrestre e arborícola e ocupam todos os biomas (matas, savanas e desertos) (GREENE, 1997; ALBUQUERQUE, 2007; MARINHO, 2007).

2.2. *Crotalus durissus terrificus*

O gênero *Crotalus* encontra-se classificado na infra-ordem Alethinophidia, superfamília Colubroidea, família Viperidae, Subfamília Crotalinae e Gênero *Crotalus* (SANTOS, 2005). As cascavéis compreendem dois gêneros, *Crotalus* e *Sistrurus*, os quais abrigam 37 espécies encontradas apenas nas Américas (BARROS, B.I.; MARTINS, 2011). As serpentes do gênero *Crotalus* (Linnaeus, 1758) ocorrem do sul do Canadá até a Argentina, são terrestres, robustas, pouco ágeis e apresentam um guizo (ou chocalho) na extremidade da cauda (SANTOS, 2005).

Apenas *Crotalus durissus* ocorre na maior parte da América do Sul, as demais espécies do gênero são encontradas no extremo norte da América do Sul, América Central e do Norte (TEIXEIRA, 2000; MELLO, 2013; UETZ, 2016). Tem uma ampla distribuição geográfica no Brasil sendo encontradas em uma grande variedade de habitats, como campos abertos, áreas secas, arenosas, pedregosas e mais raramente na faixa litorânea (SANTOS, 2005). Sua distribuição geográfica está em expansão, fato que pode ser explicado devido ao alto poder de adaptação dessa espécie a ambientes modificados e antropizados (MARQUES; ETEROVICK; SAZIMA, 2001; BARROS, B.I.; MARTINS, 2011).

Das oito subespécies registradas (UETZ, 2016), cinco são encontradas em território nacional: *C. durissus collineatus*; *C. durissus cascavella*; *C. durissus ruruima*; *C. durissus marajoensis*; e *C. durissus terrificus* (PINHO; PEREIRA, 2001). Sendo *Crotalus durissus terrificus* a representante com maior distribuição geográfica, ocorrendo em áreas dos Estados do Amazonas, Rondônia, Pará, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo (SANTOS, 2005; MELLO, 2013). É uma serpente de porte relativamente grande, atingindo um metro ou mais, com alguns machos ultrapassando um metro e meio. Distingue-se das outras subespécies por apresentar a parte interna das manchas dorsais mais claras do que os bordos. Aparecem em ambientes secos e rochosos de vegetação baixa, sendo raramente encontradas em florestas, e predominando em campos e plantações (SANTOS, 2005). *Crotalus durissus* é considerada espécie de hábito alimentar especialista, sendo que pequenos mamíferos, como roedores e marsupiais, constituem a principal parte da sua dieta (SANTOS, 2005; MELLO, 2013).

2.3. PARASITISMO EM SERPENTES

O trato gastrointestinal dos répteis é o sistema mais comumente acometido pelos parasitos. Os endoparasitos mais frequentes são protozoários, nematódeos, trematódeos e cestódeos (WILSON; CARPENTER, 1996; BENSON, 1999).

Embora existam poucos estudos a respeito das doenças que acometem os répteis na natureza, inúmeros parasitas são responsáveis por causar doença e morte em répteis cativos (FOWLER, 1986). As infecções parasitárias são mais comumente vistas em animais provenientes da natureza, mas serpentes mantidas por longos períodos em cativeiro podem apresentar alguma forma de doença parasitária (TEIXEIRA, 2000; MELLO, 2013).

A patogenicidade dos parasitos geralmente é desconhecida, mas em geral, as populações de répteis apresentam algum grau de resistência ao parasitismo (VITT; CALDWELL, 2009). Os principais efeitos negativos do parasitismo incluem anemia, anorexia, redução da sobrevivência e competitividade, e para as fêmeas, redução da fecundidade (VITT; CALDWELL, 2009).

Algumas condições estressantes em cativeiro, como alta densidade populacional, temperatura e luminosidade impróprias, dieta inadequada, substrato impróprio, bem como diversas outras condições que enfraquecem o sistema imune dos animais, podem predispor os animais às doenças parasitárias e infecciosas, causando uma alta morbidade e mortalidade no plantel (HEAT, 1983; MADER, 2006; MELLO, 2013).

Dentre os parasitos, os helmintos são os principais responsáveis pelas doenças parasitárias em répteis (RUNDQUIST, 1999). As serpentes podem ser infectadas por protozoários, nematódeos, cestódeos, trematódeos, pentastomídeos e ectoparasitos (TEIXEIRA, 2000).

Os exames coproparasitológicos são a base para o diagnóstico das infecções parasitárias das serpentes (KIEL, 1975; MADER, 2006), sendo importante salientar que os exames devem ser analisados com cautela, uma vez que estas se alimentam de animais inteiros. A presença de ovos de parasitos nas fezes pode representar infecções tanto dos ofídios quanto dos animais predados (TEIXEIRA, 2000; MELLO, 2013).

Embora haja bastantes informações a respeito das parasitoses dos répteis, ainda existem poucas publicações com conteúdo suficientemente consistente sobre as condições patológicas associadas às doenças parasitárias (TEIXEIRA, 2000; MELLO, 2013).

2.3.1. Coccídeos

Todas as ordens de répteis podem ser parasitadas por protozoários do filo Apicomplexa, especialmente da subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiorida. Segundo (GREINER, 2003), 13 gêneros já foram registrados em répteis, sendo os gêneros de ocorrência em serpentes: *Caryospora* Léger, 1904, *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907, *Cyclospora* Schneider, 1881, *Eimeria* Schneider, 1875, *Isospora* Schneider, 1881, *Pythonella* Ray & Das-Gupta, 1937, *Sarcocystis* Miescher, 1843, *Tyzzeria* Allen, 1936 e *Wenyonella* Hoare, 1933. Destes, os gêneros *Eimeria*, *Caryospora* e *Sarcocystis* apresentam o maior número de espécies, com 66, 52 e 22 espécies, respectivamente (DUSZYNSKI DW, UPTON SJ, 2008).

O ciclo reprodutivo dos coccídeos é complexo, contendo várias fases assexuadas que aumenta do número da progênie e favorece a dispersão e a contaminação pelo parasito (SCULLION; SCULLION, 2009). A fase sexuada favorece a recombinação gênica e aumenta as chances do surgimento de cepas mais resistentes ou com características mais desejáveis do que as de seus progenitores. *Eimeria*, *Isospora* e *Cryptosporidium* são de ciclo monoxênico direto (JACOBSON, 2007; SCULLION; SCULLION, 2009).

Coccídeos parasitam toda a classe dos répteis e seu ciclo de vida ocorre predominantemente no interior das células do trato gastrointestinal, mas podem ser encontrados potencialmente em todas as células do organismo (CAMPBELL, 1996a; SCULLION; SCULLION, 2009). O ciclo de vida destes parasitos ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que as espécies parasitárias exibem características de especificidade. A transmissão para outros vertebrados é quase inexistente, mas podem ocorrer casos em que o organismo atue como hospedeiro intermediário (JACOBSON, 2007). Espécies de ciclo de vida indireto, ou que façam ciclo em vários hospedeiros são

menos frequente em populações de cativeiro devido a não existência do hospedeiro intermediário. Apesar do ciclo de vida do parasito envolver a destruição da célula do hospedeiro, vários coccídeos não são considerados patogênicos para a espécie a qual está adaptado. Entretanto, nos casos de infestação aguda, os danos teciduais provocados podem contribuir para o aparecimento de lesões e esta situação ocorre mais comumente em condições de cativeiro (SCULLION; SCULLION, 2009).

Cryptosporidium são protozoários pequenos (4-8µm) encontrados em répteis de vida livre e cativeiro em todo o mundo, muito menos prevalentes em populações selvagens (MADER, 2006; JACOBSON, 2007; SCULLION; SCULLION, 2009). Estes coccídeos têm um alto grau de especificidade ao hospedeiro e o primeiro caso de doença em serpentes ocorreu após a transmissão do parasito de lagartos e quelônios (MADER, 2006; JACOBSON, 2007). Em lagartos ocorre uma grande variação com relação ao tropismo tecidual, sendo os oocistos de *Cryptosporidium* associados a lesões gástricas, entéricas, renais, salivares e faríngeas (CAMPBELL, 1996a; SCULLION; SCULLION, 2009). Em serpentes, o *Cryptosporidium serpentis* afeta a mucosa gástrica, podendo causar hiperplasia das células. Estudos morfométricos apontam a existência de pelo menos 5 espécies distintas de *Cryptosporidium* parasitando répteis (SCULLION; SCULLION, 2009).

Várias espécies diferentes de *Caryospora* foram identificadas em répteis, principalmente serpentes e lagartos. Os oocistos esporulam no ambiente após serem excretados pelo hospedeiro definitivo. Os oocistos esporulados são esféricos ou ovóides e contêm um único esporocisto com 8 esporozoítos. Poucos relatos demonstram manifestações clínicas associadas ao parasitismo por *Caryospora* em serpentes, em alguns casos foi observada agitação, anorexia e perda de peso.

Mais de 120 espécies de *Eimeria* ocorrem nos répteis. O sítio de infecção nos hospedeiros geralmente é o epitélio intestinal, mas podem ser isolados na vesícula biliar, ducto biliar e rim (JACOBSON, 2007; SCULLION; SCULLION, 2009). Os oocistos esféricos ou alongados de tamanho variável contêm 4 esporocistos, cada um com 2 esporozoítos (SCULLION; SCULLION, 2009).

Infecção por *Eimeria cascabeli* em serpentes foi associada à erosão epitelial e à proliferação do tecido conjuntivo na vesícula biliar e nos ductos extra-hepáticos. Oocistos foram observados ainda em toda a lâmina própria do intestino e infiltrados na submucosa, associada a um infiltrado linfoplasmocitário difuso moderado. A reação inflamatória foi proporcional à densidade dos oocistos. Outras espécies, ainda não determinadas de *Eimeria* spp foram relatadas como causando inflamação catarral e difteria múltipla nos intestinos de serpentes.

2.3.2. Rhabditida

A família Rhabdiasidae (Rhabditida: Rhabditoidea) possui mais de 90 espécies parasitas do trato respiratório de anfíbios e répteis (TEIXEIRA, 2000; MELLO, 2013). Destas, apenas doze parasitam serpentes (PEREIRA, 1927; KUZMIN, 1999; BURSEY; GOLDBERG; TELFORD, 2003; MARTÍNEZ-SALAZAR; LEÓN-RÈGAGNON, 2006; KUZMIN; TKACH, 2008; BARRELLA; DOS SANTOS; DA SILVA, 2010; DOS SANTOS et al., 2010; GOLDBERG; BURSEY; GLAUDAS, 2013; KUZMIN; DE VASCONCELOS MELO; DOS SANTOS, 2014), sendo cinco espécies registradas nas Américas: *R. eustreptos*, *R. fuscovenosa*, *R. lamothei*, *R. vellardi* e *R. filicaudalis*. O gênero *Rhabdias* ocorre nas regiões tropicais e temperadas de todo o mundo, sendo o principal nematódeo parasito pulmonar de anfíbios e serpentes (LANGFORD, 2010).

Também já foi registrado na América *R. Labiata* (SILVA et al., 2001, 2007; DIAS

et al., 2004; LUPPI; ELVIRA; TEIXEIRA, 2007; SIQUEIRA et al., 2009), mas esta espécie foi sinonimizada com *Acanthorhabdias acanthorhabdias* por Baker (1987). O gênero *Acanthorhabdias* possui uma única espécie (PEREIRA, 1927; YAMAGUTI, 1961; FERNANDES; SOUZA, 1974; VICENTE et al., 1993).

As espécies de *Rhabdias* que parasitam serpentes não são observadas parasitando hospedeiros de outras ordens (KUZMIN; TKACH; SNYDER, 2003; MARTINEZ-SALAZAR, 2006; MARTÍNEZ-SALAZAR, 2008). A maioria das espécies de *Rhabdias* que parasitam serpentes são descritas em Colubridae, mas há registros também em Boidae e Viperidae (GOLDBERG; BURSEY, 2004; SÁNCHEZ P. et al., 2004; MARTÍNEZ-SALAZAR; LEÓN-RÈGAGNON, 2006).

O gênero *Strongyloides* é outro membro da superfamília Rhabditoidea, que parasita o trato intestinal de serpentes. Os ovos larvados de *Rhabdias* e *Strongyloides* são indistinguíveis quando presentes em exames de fezes do hospedeiro, no entanto um lavado pulmonar da serpente pode demonstrar ovos embrionados de *Rhabdias* (TAYLOR; COOP; WALL, 2007; MITCHELL, 2008; MIHALCA; MICLÛŞ; LEFKADITIS, 2010).

O ciclo do parasito é direto e altera entre as fases de vida livre no solo e parasitária com fêmeas partenogénéticas. A infecção de serpentes por *Rhabdias* ou *Strongyloides* pode ocorrer através da infecção percutânea de larvas infectantes ou através da ingestão de água e alimento contaminados (TAYLOR; COOP; WALL, 2007; MITCHELL, 2008; MIHALCA; MICLÛŞ; LEFKADITIS, 2010).

As larvas ingeridas penetram na mucosa oral migrando para o sistema circulatório até chegarem ao pulmão. Larvas de *Rhabdias* irão completar seu desenvolvimento no próprio pulmão, já as larvas de *Strongyloides* irão continuar migrando, passando pela

traquéia até atingir a cavidade oral para serem deglutidas e, apenas no intestino, se desenvolver em adultos. Assim, a passagem de larvas de *Strongyloides* pelo pulmão também está associada a quadros de pneumonia (JACOBSON, 2007) e os sinais clínicos relacionados ao trato gastrointestinal são inespecíficos e incluem anorexia, perda de peso, letargia e diarreia (JACOBSON, 2007; MITCHELL, 2008). Demais

manifestações clínicas incluem inflamação na cavidade oral, ofegação, acúmulo de exudato em volta da glote, hipóxia e pneumonia (WILSON; CARPENTER, 1996; SANTOS, 2005; JACOBSON, 2007; SANTOS et al., 2008; MIHALCA; MICL`UŞ; LEFKADITIS, 2010; SCHUMACHER, 2011). O parasitismo por *Rhabdias* pode levar a quadros de pneumonia devido a infecções bacterianas secundárias (NOGUEIRA, 2004; SANTOS, 2005).

2.3.3. Strongylida

A ordem Strongylida é constituída por 7 superfamílias: Diaphanocephaloidea, Ancylostomatoidea, Strongyloidea, Trichostrongyloidea, Metastrongyloidea, Molineoidea e Helignosomoidea (DURETTE-DESSET; BEVERIDGE; SPRATT, 1994).

A superfamília Diaphanocephaloidea (subordem Ancylostomatina) possui uma única família (Diaphanocephalidae) constituída por parasitos ancilóstomos-*like* do trato digestivo de serpentes com mais de 33 espécies descritas em dois gêneros (MELLO, 2013).

O gênero *Kalicephalus* (Diaphanocephalidae) é um frequente parasito do trato gastrointestinal de répteis, sendo encontrado principalmente em serpentes. São parasitos hematófagos, que podem ficar aderidos à mucosa do tecido ou no lúmen do órgão. Seu ciclo biológico é direto e a transmissão ocorre através da ingestão de água e alimentos contaminados com ovos ou através da rota percutânea (MELLO, 2013). A eliminação dos

ovos ocorre juntamente com as fezes do hospedeiro (MELLO, 2013) e, em alguns casos, quando os parasitos se situam na parte cranial do esôfago, podem ser expelidos pela boca (MITCHELL, 2008).

As serpentes parasitadas apresentam infecção subclínica, sendo que em casos de infecções graves, os animais podem apresentar sinais clínicos como letargia, debilidade, anorexia e diarreia sanguinolenta. As lesões incluem enterite ulcerativa e hemorragias, que podem levar a quadros de infecção bacteriana secundária e à morte (GREINER; MADER, 1996; JACOBSON, 2007; TAYLOR; COOP; WALL, 2007; MITCHELL, 2008). A passagem de *Kalicephalus* spp pelo pulmão também pode resultar na irritação do tecido e, conseqüentemente, levar a infecções bacterianas secundárias (SCHUMACHER, 2011; MELLO, 2013).

2.3.4. Ascaridida

Esses nematódeos são os parasitos mais importantes de serpentes e a infecção pode ser fatal (RATAJ et al., 2011). Os parasitos da família Ascarididae (Ordem Ascaridida) parasitam todos os répteis, especialmente serpentes (SANTOS, 2005; RATAJ et al., 2011; PEICHOTO et al., 2016). Os vermes adultos são encontrados no trato gastrointestinal e produzem ovos de casca grossa que são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro (WILSON; CARPENTER, 1996; MELLO, 2013; PEICHOTO et al., 2016). As larvas de ascarídeos provocam lesões devido à migração pelas vísceras e os adultos parasitam o trato gastrointestinal, ocasionando anorexia, regurgitação, obstrução e perfuração intestinal (WILSON; CARPENTER, 1996). No Brasil, ocorrem 5 gêneros que parasitam serpentes sendo eles *Ascaridia*, *Ophidascaris*, *Hexametra*, *Polydelphis* e *Travassosascaris* (DIAS et al., 2004).

O gênero *Ascaridia* apresenta ciclo monoxeno, enquanto os demais apresentam ciclo heteroxeno, utilizando invertebrados, anfíbios e roedores como hospedeiros intermediários e/ou paratênicos (WILSON; CARPENTER, 1996; ANDERSON, 2000). A prevalência destes nematódeos em répteis é elevada, sendo os gêneros *Ophidascaris*, *Hexametra* e *Polydelphis* os mais comuns em serpentes.

Alguns autores suspeitam que os gêneros possam ser uma antroponose, sendo um dos possíveis responsáveis pela Neurorretinite Subaguda Unilateral Difusa (DUSN) no Brasil, síndrome ocular inflamatória provocada por larvas de nematódeos. Segundo Vianna et al. (2007) o agente causador geralmente pertence ao gênero *Toxocara*, mas devido às características morfológicas das larvas Souza et al. (2005) sugerem que as larvas de ascarídeos de répteis (*Ophidascaris*, *Polydelphis*, *Travassoascaris* e *Hexametra*) devem ser consideradas como agentes etiológicos da síndrome DUSN no Brasil (TEIXEIRA, 2000; SOUZA et al., 2005; MELLO, 2013).

2.3.5. Spirurida

As duas subordens (Camallanina e Spirurina) apresentam muitas famílias que parasitam répteis. São nematódeos que podem ser encontrados na região anterior do trato gastrointestinal ou nos tecidos de peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos e apresentam ciclo heteroxeno (MELLO, 2013). As larvas infectantes para o hospedeiro definitivo podem ser encontradas totalmente desenvolvidas em um hospedeiro intermediário (CHABAUD, 2009). Com relação à subordem Camallanina, o gênero *Dracunculus* (Dracunculoidea, Dracunculidae) ocorre nos tecidos ou cavidades corpóreas de mamíferos e répteis, sendo descritas cerca de 13 espécies (MORAVEC; LITTLE, 2004). O gênero já foi registrado em répteis na América do Norte e do Sul, África, Madagascar, Vietnã, Índia, Europa e Austrália e já foi encontrado em serpentes das famílias

Colubridae, Boidae, Pythonidae e Elapidae (JONES; MULDER, 2007).

A subordem Spirurina apresenta a maioria das famílias de parasitos infectando répteis. Com relação ao parasitismo em serpentes, a família mais encontrada e de maior importância veterinária é Physalopteridae. Esta possui três subfamílias: Proleptinae, que ocorre principalmente em peixes e raramente em répteis; Physalopterinae, muito comum em répteis, aves e mamíferos, raramente em anfíbios e ausente em peixes; e Thubunaeinae, ocorrendo apenas em répteis.

2.3.6. Acanthocephala

O Filo Acanthocephala é constituído por parasitos caracterizados por apresentar uma probóscide retrátil armada de espinhos, utilizada como suporte para a sua fixação na parede intestinal do hospedeiro (MELLO, 2013). Todos os adultos vivem no intestino delgado de vertebrados, são dioicos, com fêmeas maiores que os machos e não possuem sistema digestivo. Esses parasitos têm distribuição mundial, ciclo de vida indireto e utilizam como hospedeiro intermediário artrópodes ou crustáceos. Os répteis podem servir como hospedeiros intermediários, paratênicos ou definitivos (BAKER, 1987; GREINER; MADER, 1996; NEAR; GAREY; NADLER, 1998; GOATER; GOATER, 2001). As larvas de Acanthocephala (cistacantos) geralmente são encontradas encistadas na cavidade abdominal dos hospedeiros intermediários ou paratênicos. Nos hospedeiros definitivos, os ovos são eliminados juntos com as fezes e são caracterizados por apresentar várias camadas ao redor da larva acanthor (GREINER; MADER, 1996; BAKER, 2007).

O filo apresenta 4 classes e aproximadamente 1000 espécies; Archiacanthocephala, que tem como hospedeiros definitivos principalmente aves e mamíferos predadores; Palaeacanthocephala, que tem como hospedeiro definitivo

principalmente peixes, anfíbios, aves e mamíferos; Eoacanthocephala, que tem como hospedeiro definitivo principalmente peixes, anfíbios e quelônios; e Polyacanthocephala, que tem como hospedeiro definitivo jacarés na América do Sul (BAKER, 2008; MELLO, 2013). Segundo Kennedy (2006), raras são as espécies especializadas em parasitar anfíbios e répteis, sendo completamente ausentes em determinadas regiões e, quando encontradas, frequentemente são estágios de cistacantos onde os répteis atuam como hospedeiros paratênicos.

2.3.7. Pentastomida

Atualmente o grupo Pentastomida é classificado como uma subclasse, classe Maxillopoda, subfilo Crustacea, Filo Arthropoda (BRUSCA, RC; BRUSCA, 2003; CHEN et al., 2010). Historicamente, foi considerado como um filo próprio (SELF, 1969). Apesar da aparência vermiforme, estudos filogenéticos relacionam esses parasitos com crustáceos (BRUSCA, RC; BRUSCA, 2003; MELLO, 2013).

Pentastomídeos são endoparasitos obrigatórios conhecidos como "vermes lingulados" (*Tongueworms*), apresentando características morfológicas entre anelídeos e artrópodes. São descritas mais de 130 espécies, todas atingindo maturidade sexual no trato respiratório de vertebrados, em especial nos répteis (ABELE; KIM; FELGENHAUER, 1989; O. ALMEIDA; CHRISTOFFERSEN, 1999; ANJOS et al., 2008; MAGNINO et al., 2009). A maioria das espécies apresenta ciclo heteroxeno, mas há registros de espécies com ciclo monoxeno (SELF, 1969; RILEY, 1983). Todas as espécies são dioicas, com dimorfismo sexual evidente (fêmeas maduras maiores que os machos), fecundação interna, corpo alongado e cilíndrico com cutícula delgada (RILEY, 1983; PARÉ, 2008).

Os parasitos adultos apresentam como característica dois pares de ganchos retráteis bilaterais na boca para a fixação ao tecido do hospedeiro (ABELE; KIM;

FELGENHAUER, 1989; MITCHELL, 2008; PARÉ, 2008). Ninfas com ganchos também podem ocorrer, como é o caso da espécie *Porocephalus crotali* (BROOKINS et al., 2009). Segundo Paré (2008), adultos e larvas são hematófagos.

De acordo com Riley (1986), os pentastomídeos estão incluídos em duas ordens: Cephalobaenida, que apresenta ciclo de vida direto, e Porocephalida, que possui ciclo de vida indireto. Nesta última, a família Porocephalidae inclui as espécies parasitas das vias respiratórias dos ofídios (GÁRATE et al., 2007). Cerca de 70% das espécies possuem serpentes como hospedeiro definitivo, seguido por crocodilos, lagartos, anfíbios e tartarugas (ABELE; KIM; FELGENHAUER, 1989). Os hospedeiros intermediários incluem peixes, anfíbios, lagartos, serpentes, mamíferos roedores e insetos (ABELE; KIM; FELGENHAUER, 1989; ALMEIDA et al., 2008).

Os parasitos depositam os ovos, contendo uma larva tetrápode, no pulmão do hospedeiro definitivo, que são deglutidos com as secreções brônquicas e eliminados nas fezes. O hospedeiro intermediário se infecta através da ingestão de ovos em água, solo, pelos e alimentos contaminados. As larvas sofrem sucessivas ecdises e migram pelos tecidos do hospedeiro intermediário. O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir o hospedeiro intermediário. As formas larvárias perfuram o intestino e migram pela cavidade celomática até atingir os pulmões ou sacos aéreos do hospedeiro definitivo, onde irão maturar e depositar os ovos, recomeçando o ciclo (RILEY, 1986; GREINER; MADER, 1996).

Os gêneros mais comuns em répteis são *Raillietiella*, *Porocephalus*, *Kiricephalus*, *Armillifer* e *Sebekia* (RILEY, 1986; GREINER; MADER, 1996; BROOKINS et al., 2009). Segundo Greiner & Mader (1996), a gravidade da infecção depende do sistema imune da serpente, do número e do estágio de desenvolvimento dos parasitos e pela

presença ou ausência de outras doenças. As lesões nos tecidos causadas por pentastomídeos são mais comuns nas fases de ninfa devido ao seu processo migratório pelo corpo do hospedeiro (GREINER; MADER, 1996; MITCHELL, 2008). Entre os sinais clínicos, as serpentes podem apresentar sérias lesões pulmonares, hemorragias intestinais, produção excessiva de muco, anorexia, perda de peso, dispnéia e pneumonia derivada de infecções bacterianas secundárias (RILEY, 1986; JACOBSON, 2007; MITCHELL, 2008). Apesar da maioria das infecções serem assintomáticas e apresentarem pouca resposta inflamatória, autores como Teixeira (2000) acreditam que a morte de diversas serpentes pode ser comumente atribuída à obstrução do sistema respiratório superior por pentastomídeos. O diagnóstico pode ser feito através de exames parasitológicos de fezes, lavado traqueal ou endoscopia dos pulmões (GREINER; MADER, 1996; TEIXEIRA, 2000). Já foram encontradas em serpentes no Brasil: *Cephalobaena tetrapoda*, *K. coarctatus*, *P. crotali* e *R. furcocerca* (ALMEIDA et al., 2007, 2008). Parasitando *C. durissus* já foram encontradas as espécies *C. tetrapoda* e *P. crotali* (ALMEIDA et al., 2007).

2.4. PRINCIPAIS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE PARASITISMO

Embora haja interesse no uso de sorologia e métodos moleculares como auxílio ao diagnóstico de helmintoses, particularmente com o teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), o exame parasitológico de fezes é a ferramenta mais comum empregada na rotina para o diagnóstico quantitativo e qualitativo da presença de ovos ou larvas de helmintos (URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, 1990; TAYLER; COOP; WALL, 2007).

O número de amostras a serem colhidas depende de vários fatores, incluindo a

origem e estado de saúde dos animais, os recursos financeiros disponíveis e os tipos de parasitas que podem ser encontrados (MONTEIRO, 2007; TAYLER; COOP; WALL, 2007). Para a triagem de rotina de um animal assintomático, uma única amostra é suficiente. Para animais recém-chegados com potencial risco de quebra da homeostase e perda da harmonia parasito-hospedeiro; naqueles sem histórico de saúde e/ou exposição ou para animais sintomáticos dentro dos grupos, são necessários exames sequenciais (URQUHART et al., 1990).

As amostras fecais devem ser colhidas preferencialmente do reto e examinadas a fresco. Na impossibilidade de se colher amostras retais, fezes frescas podem ser colhidas (MONTEIRO, 2007; TAYLER; COOP; WALL, 2007) por meio de coletor universal ou utilizando uma luva de latex. Para animais de pequeno porte, um termômetro, bastão de vidro ou até mesmo a ponta de uma sonda uretral podem ser utilizadas para recuperar amostras diretamente da cloaca (MONTEIRO, 2007; TAYLER, COOP & WALL, 2007; CAMPAGNER, 2011).

A maioria das infecções por nematódeos é facilmente detectada em um único exame parasitológico, pois as fêmeas eliminam milhares de ovos por dia. No entanto, baixas infecções por trematódeos, cestódeos ou protozoários podem não ser detectadas em um único exame, porque os oocistos não são eliminados continuamente, diariamente ou em grande número (MONTEIRO, 2007; TAYLER, COOP & WALL, 2007). A colheita de amostras consecutivas ou a obtenção de amostras a partir de lavados aumentará o poder de diagnóstico. Para avaliar o status do parasita em um plantel, 30 animais ou 10% do grupo, o que for maior, deve fornecer amostras para realizar uma cobertura amostral adequada (URQUHART et al., 1990)

Vários métodos estão disponíveis para preparação de amostras para o exame

microscópico. Contudo, qualquer que seja o método utilizado, as lâminas devem ser examinadas nos menores aumentos, uma vez que a maioria dos ovos pode ser detectada. Se necessário, uma ampliação maior pode então ser empregada para a medição dos ovos ou uma diferenciação morfológica mais detalhada. Um micrômetro pode ser útil para dimensionar tanto os ovos, quanto as larvas encontradas (URQUHART et al., 2007).

2.4.1. Principais métodos coproparasitológicos

2.4.1.1. Método do esfregaço direto

Algumas gotas de água são misturadas com uma quantidade equivalente de fezes em uma lâmina de microscópio. Uma lamínula é colocada sobre o material e a amostra é então examinada no microscópio. É possível detectar a maioria dos ovos ou larvas por este método, mas devido à pequena quantidade de fezes utilizadas, somente infecções relativamente maciças são detectadas (MONTEIRO, 2007; TAYLER, COOP & WALL, 2007).

2.4.1.2. Técnicas de concentração de amostra

A recuperação de parasitas em amostras fecais é otimizada quando utilizamos técnicas de concentração (URQUHART et al., 1990). Estas incluem técnicas de flutuação e sedimentação, as quais dependem de diferenças na gravidade específica entre a forma parasitária e as soluções utilizadas. Técnicas de flutuação concentram os parasitos a partir do uso de soluções hipertônicas para que os ovos e larvas subam para a superfície da solução de flutuação, enquanto a maioria dos detritos afunde (TAYLER; COOP; WALL, 2007).

As técnicas de sedimentação utilizam soluções com densidade específicas menos densas do que a dos parasitos, de modo que as formas parasitárias se concentram no fundo

do tubo de colheita. Métodos de sedimentação geralmente permitem a recuperação de mais parasitos do que os métodos de flutuação (MONTEIRO, 2007; TAYLER; COOP; WALL, 2007). Técnicas de sedimentação são mais facilmente executadas na rotina, embora deixem uma maior quantidade de detritos e sujidades na lâmina, o que pode dificultar o exame. Além disso, ao observar lâminas de sedimentação, múltiplos serão os campos focais, porque os parasitos podem se localizar em diferentes níveis dentro da coluna de solução entre a lamínula e a lâmina, o que resulta em um tempo de avaliação mais longo, se comparados aos exames de flutuação (TAYLER, COOP & WALL, 2007).

As principais técnicas utilizadas na rotina são: flutuação passiva, centrifugo-flutuação, sedimentação de Baermann, sedimentação simples e sedimentação pelo Acetato de Etil-Formalina (URQUHART et al., 1990).

2.5. ASPECTOS HEMATOLÓGICOS DO SANGUE DOS RÉPTEIS

2.5.1. Eritrócitos

Os eritrócitos são o tipo celular mais abundante em esfregaços de sangue periférico. Os eritrócitos maduros dos répteis são nucleados, elípticos e de bordas arredondadas (CAMPBELL, 2006). O núcleo tem formato irregular, mas tende a ser oval com um fino padrão de cromatina (DOTSON; RAMSAY; BOUNOUS, 1995; MOURA et al., 1999). Em condições normais, os eritrócitos respondem por aproximadamente 40% de todo o volume sanguíneo (FALCE, 2009).

A contagem de eritrócitos em répteis varia intraespecífica e interespecificamente, mostrando alteração com a idade, sexo, estado nutricional e ocorrência de doenças (JACOBSON, 1984; GARCIA-NAVARRO, 2005). Os eritrócitos imaturos são células irregulares a redondas, com núcleo grande redondo e citoplasma basofílico. São

constituintes normais do sangue dos répteis, representando 1,5 a 2,5% da população de células vermelhas (CAMPBELL, 2006).

2.5.2. Leucócitos

Leucócitos são células que desempenham suas funções nos processos inflamatórios e imunológicos, constituindo-se nos chamados elementos celulares da inflamação (CAMPBELL, 1996b). Segundo Campbell (1996b), em serpentes o número de leucócitos total varia de $6-12 \times 10^3$ cel/ μ l.

Os granulócitos dos répteis são classificados em dois grupos, acidófilos e basófilos, baseado na coloração das células. Os acidófilos são divididos em heterófilos e eosinófilos (HAWKEY; DENNETT, 1989).

O desenvolvimento dos granulócitos dos répteis é semelhante ao dos mamíferos e são associados aos espaços extra vasculares do estroma reticular da medula óssea. Granulócitos maduros migram para o endotélio celular dos sinusóides para entrar na corrente sanguínea (FALCE, 2009).

2.5.2.1. Linfócitos

São células redondas com margens irregulares. Possuem núcleo redondo, levemente indentado e centralizado. O linfócito típico possui uma alta razão Núcleo: Citoplasma. O citoplasma é homogêneo sem vacúolos ou grânulos (HAWKEY; DENNETT, 1989; STEFFENS III, 2000; CAMPBELL, 2006).

Segundo Frye (1991), o número absoluto de linfócitos varia de acordo com a espécie, idade, sexo, estação do ano, estado nutricional, presença de hemoparasitos, metazoários e na vigência de processos inflamatórios crônicos.

O aumento do número de linfócitos (linfocitose) pode ocorrer em casos de inflamação, ferida em cicatrização, doenças virais e em algumas infecções parasitárias (MADER, 2000). Os linfócitos podem representar de 15 a 89% da contagem total de leucócitos (GARCIA-NAVARRO, 2005). Embora, pesquisas mais recentes apontem que linfócitos representem 58,6 a 78,2% da contagem total de leucócitos e que estes apresentem capacidade fagocítica, auxiliando o combate a microrganismos (CARVALHO, 2016) sendo o tipo celular mais comumente encontrado dentre os leucócitos (MACMAHON; HAMER, 1975).

2.5.2.2. Monócitos

Os monócitos são células esféricas com núcleo ovalado, riniforme ou em ferradura. Os monócitos de serpentes frequentemente têm um núcleo redondo a oval e contêm grânulos azurofílicos em abundância (CAMPBELL, 2006; FALCE, 2009). Embora os monócitos que possuem uma aparência azurofílica no citoplasma sejam frequentemente chamados de azurófilos na literatura, suas características citoquímicas e ultra-estruturais são similares aos monócitos de mamíferos e têm sido reportados tanto como monócitos, quanto como um tipo celular separado (FRYE, 1991; FALCE, 2009).

De acordo com Frye (1991) estas células compõem o sistema mononuclear fagocitário, sendo frequente o achado de monócitos fagocitando bactérias, debris celulares e outros materiais particulados. A monocitose usualmente sugere um processo infeccioso crônico (CAMPBELL, 2006).

2.5.2.3. Azurófilos

Os azurófilos são encontrados apenas em répteis, ocorrendo em grandes quantidades em serpentes. Seu formato é predominantemente esférico, variando de

tamanho (de pequeno a grande). Pouco se sabe sobre a origem ou função destas células, podendo-se afirmar apenas que o aumento no número ou alteração nas características morfológicas são indicativos de processo infeccioso (MONTALI, 1988; HAWKEY; DENNETT, 1989). Eles representam de 15 a 24,8% da contagem total de leucócitos e segundo recentes pesquisas tem a capacidade de fazer fagocitose (CARVALHO, 2016). Os granulócitos azurófilos apresentam grande polimorfismo citológico, dando origem às denominações mais variadas. Monócitos e azurófilos são considerados a mesma célula por alguns autores (BOUNOUS et al., 1996; ALLEMAN; JACOBSON; RASKIN, 1999).

2.5.2.4. Heterófilos

São granulócitos com grânulos fusiformes pleomórficos, opostos aos eosinófilos, que possuem grânulos uniformemente esféricos. Os heterófilos dos répteis são geralmente arredondados com grânulos citoplasmáticos fusiformes eosinofílicos (laranja brilhante), citoplasma incolor e núcleo tipicamente redondo a oval, posicionado excentricamente na célula, com um agrupamento denso de cromatina nuclear (FRYE, 1991; CAMPBELL, 2006; FALCE, 2009). Possuem importante papel na defesa do organismo contra patógenos invasores, assumindo o papel fagocítico desempenhado pelos neutrófilos nos mamíferos, realizando processos de quimiotaxia, opsonização, ingestão e lise. Seu número pode ser maior em casos de infecções bacterianas e fúngicas, dano tecidual e estresse (HAWKEY, C.M., DENNETT, 1989; FRYE, 1991; GARCIA-NAVARRO, 2005).

2.5.2.5. Eosinófilos

Os granulócitos eosinófilos têm merecido atenção especial em hematologia comparada de répteis, sua presença no sangue periférico de serpentes é questionável (ROSSKOPF, 2000), pois este tipo celular não foi observado na maioria das espécies

sendo descrito em duas espécies de Elapideos asiáticos: *Ophiophagus hannah* e *Naja naja* (SALAKIJ et al., 2002; PARIDA; DUTTA; PAL, 2014). Os eosinófilos são observados comumente em Crocodilia e Chelonia (ALLEMAN; JACOBSON; RASKIN, 1999).

Admite-se que os eosinófilos fagocitem e destruam determinados complexos antígeno-anticorpo, limitando e circunscrevendo o processo inflamatório. Os eosinófilos são assim chamados pela presença de granulações ovóides em seu citoplasma que se coram intensamente pela eosina (granulações acidófilas). Os eosinófilos possuem núcleo excêntricos únicos ou bilobados com grânulos citoplasmáticos eosinofílicos esféricos (MONTALI, 1988; FRYE, 1991).

A eosinofilia é associada à infecções parasitárias e a processos alérgicos em mamíferos. Em répteis, geralmente o número de eosinófilos varia de 7 a 20% do total de leucócitos (FRYE, 1991).

2.5.2.6. Basófilos

Os basófilos são caracterizados pela presença de grande quantidade de grânulos basofílicos citoplasmáticos, sendo que tais grânulos podem até mesmo impedir a visualização do núcleo celular (FALCE, 2009).

Acredita-se que estas células estejam envolvidas em processos alérgicos, possuindo receptores para imunoglobulina E. Representam de 0 a 4% do total de leucócitos. O número absoluto de basófilos varia na presença de hemoparasitos (FRYE, 1991; CAMPBELL, 1996b). Os basófilos possuem uma membrana plasmática bem definida com numerosas microvilosidades. O citoplasma possui algumas áreas eletrônicas, grânulos basofílicos, numerosos ribossomos, polirribossomos e grânulos de glicogênio. Os grânulos com membranas que parecem homogêneos em menor aumento,

em maior aumento, consistem de finos grânulos, fibrilas ou lamelas (STEFFENS III, 2000).

2.5.3 Trombócitos

Os trombócitos dos répteis são células nucleadas, com formato que varia de elíptico a fusiforme. O núcleo, centralmente posicionado, possui uma cromatina nuclear densa, que se cora em roxo, enquanto que o citoplasma tipicamente é menos corado e contém poucos grânulos azurofílicos. Trombócitos ativos são comuns e aparecem como agrupamentos de células com citoplasmas irregulares e vacúolos (CAMPBELL, 1996b; FALCE, 2009).

Os trombócitos estão relacionados ao sistema hemostático, sendo análogos às plaquetas de mamíferos. As características estruturais e a origem dos trombócitos são completamente diferentes entre mamíferos e não mamíferos, embora a contribuição dos trombócitos na hemostasia seja comum a todos os vertebrados (DAIMON; GOTOH; UCHIDA, 1987).

Acreditava-se que dentre suas múltiplas funções, os trombócitos poderiam realizar fagocitose, participando ativamente na defesa do organismo mas, recentes estudos comprovaram que ele não possui esta capacidade (CARVALHO, 2016). São capazes de se diferenciar em eritrócitos (GOULART, 2006), se houver um aumento na demanda de eritrócitos (PENDL, 2006), e sua participação nos processos de hemostasia (GOULART, 2006). Acredita-se que a ocorrência de trombocitose pode ser indicativa de hemorragia ou infecção bacteriana, enquanto a presença de trombócitos ativados sugere processos de coagulação intravascular disseminada (HAWKEY; DENNETT, 1989).

2.6.ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO SANGUE DOS RÉPTEIS

2.6.1 Ácido Úrico

O ácido úrico é o produto primário final da metabolização de proteínas, nitrogênio não proteico e purinas em répteis terrestres e representa 80 a 90% do nitrogênio total excretado pelos rins (CAMPBELL, 2006). A hiperuricemia pode ser causada por desidratação, lesão renal grave, com perda de mais da metade da massa renal, dietas altamente proteicas (FRYE, 1991; MESSONNIER, 1996) entre outros fatores. Em casos de hiperuricemia pode haver deposição de micro cristais de ácido úrico no parênquima de tecidos e articulações, dando origem ao processo de gota úrica. Em répteis, a concentração sérica de ácido úrico pode variar de 0 a 10 mg/dl (MESSONNIER, 1996). Em répteis carnívoros esta concentração se eleva até 2 vezes no período pós-prandial (ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

2.6.2 Alanina Aminotransferase (ALT)

A alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico- pirúvica (TGP), tem seus níveis séricos aumentados na presença de lesões hepatocelulares causadas, por exemplo, por toxemia ou hipóxia. Portanto, quanto maior a lesão, mais elevados os níveis de ALT. Todavia, a ALT não é um indicador sensível no diagnóstico da doença hepática em répteis (ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

2.6.3 Aspartato Aminotransferase (AST)

A enzima aspartato aminotransferase, também conhecida como transaminase

glutâmico oxalacético (TGO), está presente em todos os tecidos do organismo, especialmente na musculatura esquelética e o fígado (ALBUQUERQUE, 2007). Seus níveis se elevam na presença de lesões hepáticas ou em células musculares estriadas esqueléticas e cardíacas. Doenças generalizadas como sepse ou toxemia podem lesar estes tecidos, elevando a atividade plasmática dessa transaminase devido à necrose celular generalizada (MESSONNIER, 1996; ALBUQUERQUE, 2007; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007). Processos infecciosos podem provocar um aumento dos níveis de AST no sangue (MARTÍNEZ SILVESTRE, 2003).

2.6.4 Cálcio

O metabolismo do cálcio sanguíneo e a quantidade de cálcio ionizado no plasma dos répteis é mediado pelo paratormônio (PTH), calcitonina e vitamina D₃ ativada. Outros hormônios, como o estrógeno, tiroxina e glucagon, também podem influenciar o metabolismo do cálcio em répteis (CAMPBELL, 1996b).

A hipercalcemia é referida em fêmeas em período reprodutivo, dietas ricas em cálcio e vitamina D₃, hiperparatireoidismo primário e lesões osteolíticas. Por outro lado, a hipocalcemia é observada em dietas desbalanceadas em cálcio, vitamina D₃ e fósforo, e em doenças renais (MESSONNIER, 1996; ALBUQUERQUE, 2007).

2.6.5 CK- Creatinoquinase

A enzima creatinoquinase apresenta 3 isoenzimas: CK-MM (tipo músculo), CK-MB (tipo miocárdio) e CK-BB (tipo cérebro) (ALBUQUERQUE, 2007).

Tanto CK, quanto as suas três isoenzimas são encontradas nos músculos esquelético e liso, no miocárdio e cérebro (CAMPBELL, 1996b). É uma enzima bastante específica para a avaliação de danos musculares em mamíferos, aves e répteis. Elevações

da concentração plasmática de CK reflete lesão muscular e pode ocorrer após injeções intramusculares e infecções sistêmicas que afetam os músculos esquelético ou cardíaco (ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

Elevações na atividade dessa enzima são frequentemente observadas em animais que se debatem e fazem esforço na hora da contenção e colheita de sangue (ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

2.6.6 Creatinina

Os valores normais de creatinina em répteis são, de maneira geral, bem baixos (<1mg/dL). Valores elevados podem ser observados em casos de desidratação severa e doença renal. Todavia, este parâmetro não é considerado um bom indicativo para doenças renais (CAMPBELL, 1996b; ALBUQUERQUE, 2007; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

2.6.7 Colesterol

O aumento nos níveis de colesterol tem sido associado com a vitelogênese (CALLE et al., 1994; LAMIRANDE et al., 1999; ALBUQUERQUE, 2007).

2.6.8 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina está presente em altas concentrações nos ossos (osteoblastos), mucosa intestinal, células tubulares renais, fígado e placenta. Aumento sérico desta enzima é indicativo de estase biliar e/ou lesões óssea (CAMPBELL, 1996b) e essas elevações (séricas) podem refletir atividade osteoblástica. A fosfatase alcalina não é órgão-específica e esta amplamente distribuída no corpo dos répteis (ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007). Durante um processo infeccioso, a fosfatase alcalina pode

estar aumentada (MARTÍNEZ SILVESTRE, 2003).

2.6.9 Fósforo

O fósforo está presente no sangue sob a forma de éster, no interior dos eritrócitos, e como fosfolipídio e fosfato inorgânico no plasma (ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007). A hiperfosfatemia pode estar relacionada à redução de taxa de filtração glomerular, hipervitaminose D₃, hipoparatiroidismo e dieta com excesso de fósforo. A hipofosfatemia, por sua vez, pode ser causada por hipovitaminose D₃, má absorção ou desnutrição e carência dietética (CAMPBELL, 1996b; MESSONNIER, 1996).

2.6.10 Glicose

A concentração normal de glicose no sangue de répteis varia de acordo com a espécie, estado nutricional e condições ambientais. Há uma variação sazonal normal, variando de 60 a 100mg/dl (CAMPBELL, 1996b).

Hipoglicemia pode ser observada em casos de anorexia prolongada, desnutrição, dietas excessivamente proteicas, hepatopatia severa, sepse e endocrinopatias (MESSONNIER, 1996; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007). Nos répteis, hiperglicemias são, geralmente, iatrogênicas por administração excessiva de glicose ou ainda por uso indiscriminado de glicocorticoides (CAMPBELL, 1996b; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

2.6.11 Proteínas Plasmáticas Totais (PPT)

Entende-se por dosagem de proteínas plasmáticas totais, a dosagem de albumina e das frações de globulina. Das proteínas plasmáticas totais, a albumina compreende 40 a 60% do total, sendo ela a responsável pela manutenção da pressão osmótica

(ALBUQUERQUE, 2007; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007). As globulinas são subdivididas em alfa, beta e gama globulinas (CAMPBELL, 2006).

A hipoproteinemia em répteis está frequentemente associada a desnutrição. Todavia, outras causas incluem deficiência na digestão e absorção dos nutrientes, podendo estar associada a parasitismo intestinal, anemias não regenerativas, hemorragias severas e doença crônica hepática ou renal (CAMPBELL, 2006; ALBUQUERQUE, 2007; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007). A hiperproteinemia ocorre em casos de hemoconcentração ou elevação das globulinas associadas com doença inflamatória crônica (CAMPBELL, 1996b). Em processos infecciosos se elevam os valores de proteínas totais (gamaglobulinas e alfa globulinas) (MARTÍNEZ-SILVESTRE, 2003).

2.6.12 Ureia

Os répteis são animais primariamente uricotélicos, portanto a concentração de uréia no sangue é relativamente baixa (menor de 10 mg/dl). Valores elevados podem ser observados em situações de nefropatias e azotemia pré-renal (CAMPBELL, 1996b; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

2.7 ESTRESSE NOS RÉPTEIS

Os animais mantêm uma condição fisiológica constante denominada homeostase (GUILLETTE; CREE; ROONEY, 1995). O estresse pode ser definido como uma resposta adaptativa normal de um indivíduo frente a estímulos internos ou externos que representam uma ameaça à homeostase (GUILLETTE, CREE & ROONEY, 1995; WILKINSON, 2015). Compreender os mecanismos e a biologia do estresse é essencial quando pretendemos reduzir o estresse, ou os fatores estressores que envolvem a manutenção de espécies domésticas, selvagens ou as de laboratório (XUEREB et al.,

2012; WILKINSON, 2015).

Existem quatro fatores principais que atuam como desencadeadores do mecanismo do estresse, são eles (I) mudanças comportamentais; (II) alterações do sistema nervoso simpático; (III) respostas neuroendócrinas e (IV) resposta imune (WILKINSON, 2015). Estes fatores são regulados pelo hipotálamo e pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (GUILLETTE, CREE & ROONEY, 1995). O estresse não só estimula a ativação do sistema nervoso simpático, mas também dirige uma resposta neuroendócrina, inicialmente mais lenta, mas com efeitos potencialmente mais duradouros derivados da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (GUILLETTE, CREE & ROONEY, 1995; WARWICK et al., 2013). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é essencial para a regulação de funções fisiológicas como o controle do sistema imune, comportamento, metabolismo e reprodução (WILKINSON, 2015). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é iniciada quando o CRH produzido pelo hipotálamo é liberado após uma ameaça, estimulando a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que atua no córtex da adrenal e estimula a produção de glicocorticoides (WARWICK; FRYE; MURPHY, 2013). A glândula adrenal dos répteis é composta por dois tipos de tecido, o tecido interrenal e tecido cromafim. A maior parte de glândula adrenal é composta por células de origem mesodérmica, as células interrenais esteroidogênicas, que secretam corticosteróides e são homólogas às células do córtex adrenal de mamíferos. As células cromafins, derivam da crista neural e secretam adrenalina e noradrenalina (GUILLETTE; CREE; ROONEY, 1995). Este tecido é o equivalente evolutivo da medula suprarrenal dos mamíferos. Ao contrário dos mamíferos, esses tipos celulares são misturados a uma matriz comum e não formam regiões isoladas (WILKINSON, 2015).

A glândula adrenal dos vertebrados responde a fatores estressores ambientais,

secretando duas formas distintas de corticosteróides: a corticosterona ou o cortisol. As concentrações relativas de corticosterona plasmática e cortisol diferem entre as classes de vertebrados: a corticosterona é secretada principalmente em anfíbios, répteis e pássaros, e cortisol em peixes e na maioria dos mamíferos (GREENBERG; WINGFIELD, 1987; WARWICK, FRYE & MURPHY, 2013). Vários fatores influenciam as concentrações plasmáticas de corticosteróides, incluindo variabilidade genética, idade, sexo, estado nutricional, o tipo de agente estressor e a frequência da apresentação a esse agente (SELYE, 1973).

Os efeitos do estresse sobre o sistema imune nos répteis são pouco conhecidos e vários fatores são complicadores (XUEREB et al., 2012; WILKINSON, 2015). O primeiro problema com a avaliação de efeitos provocados pelo estresse nos parâmetros fisiológicos é que as manipulações necessárias para estudar o animal podem, de fato, induzir uma resposta ao estresse (XUEREB et al., 2012; WARWICK; FRYE; MURPHY, 2013). Essa dificuldade é inerente ao estudo do estresse e não é exclusiva dos répteis. O segundo problema é que muitos aspectos básicos do sistema imunológico dos répteis não foram completamente caracterizados (COOPER, KLEMPAU & ZAPATA, 1985; GUILLETTE, CREE & ROONEY, 1995). Uma terceira dificuldade é criada pela natureza sazonal da função imunológica dos répteis. Os estudos em animais endotérmicos estão relativamente isentos das variações anuais da função imunológica, observada nos ectotérmicos. Os mecanismos que regulam o sistema imunológico dos ectotérmicos podem ajudar a esclarecer os mecanismos de supressão da resposta imune induzida por agentes estressores tanto em endotérmicos, quanto em ectotérmicos (GUILLETTE, CREE & ROONEY, 1995; XUEREB et al., 2012; WILKINSON, 2015).

O sistema imunológico dos vertebrados compartilha vários aspectos, incluindo presença de linfócitos, capacidade de sintetizar imunoglobulinas e a capacidade de mediar

as funções das células T (HAKIM, 1988). Os répteis compartilham muitas características de seu sistema imune, com a dos peixes ósseos, anuros, mamíferos e aves (ZAPATA; VARAS; TORROBA, 1992). Flutuações sazonais no sistema imunológico de répteis e anfíbios têm sido atribuídos aos parâmetros neuroendócrinos, envolvendo principalmente concentrações de esteroides. Os corticosteróides e os hormônios sexuais parecem regular o sistema imunológico dos répteis (COOPER; KLEMPAU; ZAPATA, 1985; HAKIM, 1988; ZAPATA; VARAS; TORROBA, 1992), bem como influenciar a imunidade dos mamíferos (BESEDOVSKY; SORKIN, 1977; ANSAR AHMED; PENHALE; TALAL, 1985; MASON, 1991) e aves (LE DOUARIN; MICHEL; BAULIEU, 1980). Répteis expostos a agentes estressores exibem alterações nas concentrações plasmáticas de corticosteróides e hormônios reprodutivos (GUILLETTE; CREE; ROONEY, 1995).

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- 3.1. Determinar o grau de endoparasitismo em serpentes do gênero *Crotalus durissus* recebidas pelo Instituto Butantan.
- 3.2. Estabelecer o perfil hematológico e bioquímico das serpentes parasitadas e das não parasitadas.
- 3.3. Mensurar os níveis séricos de corticosterona, através de kit ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), e determinar se os animais parasitados possuem maiores valores deste hormônio, quando comparados aos níveis dos animais não parasitados.
- 3.4. Identificar, através da morfologia dos ovos, das larvas e dos adultos ou através de técnicas moleculares, as principais espécies que parasitam estas serpentes.
- 3.5. Contribuir para o entendimento das doenças parasitárias que acometem as serpentes e suas implicações para a manutenção em cativeiro destes animais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Para a realização do experimento foram utilizadas 13 cascavéis (*Crotalus durissus terrificus* - Cdt) entregues à Recepção de Animais do Instituto Butantan e destinadas ao Laboratório de Herpetologia. Após o recebimento, os animais foram mantidos isolados até a realização dos exames coproparasitológicos e da confirmação do grau de parasitismo por protozoários e/ou helmintos. Apenas serpentes naturalmente parasitadas entraram no estudo. Após a confirmação do parasitismo e a determinação do grau da infestação, os animais foram divididos em dois Grupos, constituídos por machos e fêmeas, a saber:

Grupo 1 – Animais tratados: Composto por 6 animais adultos, 3 machos e 3 fêmeas, que foram vermifugados com ivermectina 1% diluída 1:10 em propilenoglicol (0,2mg/Kg ou 0,2mL/Kg), repetida após 15 dias. No caso de infestação por protozoários, o tratamento era realizado com Giardicid® (Metronidazol e Sulfadimetoxina), uso oral (3 mL/Kg) repetida após 5 e 10 dias, os animais do Grupo estão expostos na Tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Animais do grupo tratamento - Grupo 1

Animal	Sexo	Peso (g)	CRC – CT (cm)
Cdt 4	M	567 g	85 – 95 cm
Cdt 9	F	537 g	92 – 101 cm

Cdt 10	F	1366 g	101 – 108 cm
Cdt 11	F	629 g	80 – 86 cm
Cdt 20	M	687 g	92 – 101 cm
Cdt 29	M	572 g	85 – 95 cm

CRC (comprimento rostro-cloacal), CT (comprimento total), F (fêmea) e M (macho).

Grupo 2 – Animais não tratados: Composto por 7 animais adultos, 4 machos e 3 fêmeas, naturalmente infectados por protozoários e/ou nematódeos que não receberam tratamento antiparasitário, os animais do Grupo estão expostos na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2. Animais do grupo controle - Grupo 2

Animal	Sexo	Peso (g)	CRC – CT (cm)
Cdt 2	F	589 g	86,5 – 92 cm
Cdt 3	M	605 g	93 – 103 cm
Cdt 7	F	748 g	90 – 96 cm
Cdt 12	M	638 g	90 – 96 cm
Cdt 16	F	660 g	84 – 89 cm
Cdt 30	M	572 g	89 – 97 cm
Cdt 32	M	1370 g	117 – 128 cm

CRC (comprimento rostro-cloacal), CT (comprimento total), F (fêmea) e M (macho).

Esse projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), sob o protocolo nº 2362041215, bem como pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CEUA), sob o protocolo nº 2474290616.

4.2. EXAMES LABORATORIAIS

Exames coproparasitológicos, hematológicos e bioquímicos foram realizados para acompanhar a infestação parasitária e a higidez dos animais dos dois grupos durante o experimento.

4.2.1. Exame coproparasitológico

Foram utilizadas quatro técnicas coproparasitológicas para detectar ovos, larvas e oocistos.

4.2.1.1. Método do esfregaço direto

Sobre uma lâmina de microscópio, misturávamos algumas gotas de água destilada com uma quantidade equivalente de fezes. Em seguida colocávamos uma lamínula sobre o líquido e levávamos ao microscópio ótico para exame. A detecção da maioria dos ovos ou larvas era possível por este método.

4.2.1.2. Sacarose saturada (Técnica de Willis)

Em uma solução saturada de sal ou açúcar (densidade específica superior a 1,20) os ovos dos helmintos tendem a subir, aderindo-se a parte inferior de uma lamínula, colocada na superfície do líquido. É uma técnica qualitativa que serve para observar a presença de ovos de helmintos ou oocistos de protozoários.

Em um copo coletor, misturávamos aproximadamente 1g de fezes com a solução saturada até o volume total de 10 mL. Após homogeneizar o conteúdo, coávamos o material e enchíamos um pequeno frasco de vidro até formar um menisco. Acomodávamos uma lamínula de vidro na boca do frasco por 15 minutos e, após este período, retirávamos cuidadosamente a lamínula, púnhamos sobre uma lâmina e

observávamos ao microscópio ótico utilizando a objetiva de 10x.

4.2.1.3. Sedimentação pelo éter etílico

As fezes das serpentes são extremamente gordurosas, o que implica na dificuldade da realização do exame de sedimentação simples, pois a gordura, por vezes, se adere à membrana dos ovos ou dos oocistos, impedindo que estes precipitem quando estão em solução. O éter etílico, ao ser adicionado à solução com fezes, lisa as gotículas de gordura permitindo que os ovos precipitem.

Diluíamos um pequeno volume de fezes em quantidade proporcional de água destilada e, após a dissolução, obtínhamos a “solução mãe”. Em um tubo de centrifuga, adicionávamos 1 mL da “solução mãe” a 1 mL de éter etílico, vedávamos o tubo e homogeneizávamos a solução. A mistura era centrifugada por 10 minutos. Após o processo, a solução do tubo apresentava 3 fases: anel de gordura, solução sobrenadante e precipitado. As duas primeiras fases eram descartadas e utilizávamos o precipitado para avaliação parasitológica (MONTEIRO, 2007).

4.2.1.4. Método de McMaster

A técnica de contagem de ovos de McMaster é um método que determina o número de ovos de nematódeos por grama de fezes. Contagens de ovos superiores a 1000 em geral são consideradas indicativas de infestações maciças e aquelas superiores a 500, de infestação moderada. (CASTILHO et al., 1984; URQUHART et al., 1990; MONTEIRO, 2007).

Nesta técnica, pesávamos 2g de fezes e misturávamos com 60 mL de solução saturada de açúcar, homogeneizávamos bem e coávamos a amostra. Com uma pipeta transferíamos uma alíquota da amostra para cada uma das duas câmaras de McMaster.

Esperávamos um minuto e contávamos a quantidade de ovos presentes na lâmina. Multiplicávamos o número total de ovos nas 2 câmaras por 100, sendo este o valor de ovos por grama (OPG) de fezes.

4.2.2. Exames hematológicos e bioquímicos

Os animais de ambos os grupos passaram por colheitas periódicas de sangue a cada 45 dias, sendo que a primeira colheita ocorreu antes do início do experimento propriamente dito (tempo 0). As amostras sanguíneas foram obtidas através da punção da veia caudal com agulha 20 x 0,55mm e seringas plásticas descartáveis, sem adição de anticoagulante, com o animal contido fisicamente em laço de Lutz. A cada colheita era retirado um volume de, no máximo, 1% do peso do animal.

Uma alíquota de sangue era acondicionada em tubo plástico, sem anticoagulante, para a obtenção de soro para avaliar os parâmetros bioquímicos das serpentes. No total, 8 amostras de sangue foram retiradas de cada animal em um período de 12 meses.

A outra alíquota foi acondicionada em tubo de ensaio plástico heparinizado (heparina sódica 5000 UI/mL) para avaliação dos parâmetros hematológicos: contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, contagem diferencial dos leucócitos e determinação do hematócrito e hemoglobina. O plasma foi utilizado para a mensuração dos níveis séricos de corticosterona.

4.2.2.1. Exames hematológicos

Para acompanhar o estado geral dos animais durante o período de estudo e

verificar a sua resposta hematológica frente aos parasitos, exames hematológicos foram realizados ao longo dos 12 meses de experimento. Os exames realizados foram:

I. Volume Globular ou Hematócrito:

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

II. Contagem Total de Eritrócitos:

Para a contagem total de eritrócitos, 20µL de sangue total heparinizado foram diluídos em 4,0 mL de diluente isotônico de Natt e Herrick (1952). Após a diluição, a solução foi utilizada para o preenchimento da Câmara de Neubauer e os eritrócitos, presentes em 5/25 casetas do retículo central, foram contados com o auxílio de microscópio de luz, em aumento de 200 vezes. O número total de eritrócitos foi obtido pela fórmula: nº de eritrócitos x 10.000 (expresso em células/mm³).

III. Contagem total de leucócitos e trombócitos:

Para a contagem total de leucócitos e trombócitos, 20µL de sangue total heparinizado foram diluídos em 4,0 mL de diluente isotônico de Natt e Herrick (1952), sendo contados os dois tipos de células, separadamente, dos 16 quadrados simples localizados nos cantos da Câmara de Neubauer. Os números de leucócitos e trombócitos totais foram obtidos pela fórmula: nº de leucócitos contados x 500 e expresso em células/mm³ e nº de trombócitos contados x 500 e expresso em células/mm³.

V. Determinação da concentração de hemoglobina:

A determinação da concentração de hemoglobina foi obtida com o uso de kit para leitura de hemoglobina Labtest®, através da leitura colorimétrica da cianometahemoglobina em aparelho bioquímico semi-automático da Laborana®.

VI. Contagem diferencial de leucócitos:

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

VII. Cálculo dos Índices Hematimétricos:

Usando os valores obtidos com a hematimetria, concentração de hemoglobina e volume globular, pode-se calcular o volume de um eritrócito médio e sua concentração de hemoglobina (ALBUQUERQUE, 2007). A determinação dos índices hematimétricos é de particular importância para a determinação do tipo morfológico das anemias (CAMPBELL, 2006).

A- VCM: Volume Corpuscular Médio é a expressão do valor médio do volume de hemácias.

$$\text{VCM} = \text{ht} \times 10 / \text{he}, \text{ expresso em fl}$$

B- HCM: Hemoglobina Corpuscular Média expressa a quantidade média de hemoglobina nas hemácias.

$$\text{HCM} = \text{hb} \times 10 / \text{he}, \text{ expressa em pg}$$

C- CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, determina a proporção de hemoglobina na média de hemácias.

$$\text{CHCM} = \text{hb} \times 100 / \text{ht}, \text{ expressa em \%}$$

O VCM da maioria das células vermelhas sanguíneas de répteis varia entre 200 a 1200 fl. A média para CHCM em répteis é de 30% (22 a 41%) (CAMPBELL, 2006; ALBUQUERQUE, 2007).

4.2.2.2. Exames Bioquímicos

Para monitorar a higidez dos animais durante o experimento, realizamos os testes bioquímicos de: glicose, cálcio, fósforo, proteínas totais, albumina, ácido úrico, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), colesterol, fosfatase alcalina, creatina quinase (CK-NAC) e creatinina K. Estes parâmetros foram determinados conforme a indicação do fabricante dos kits bioquímicos Labtest® em um aparelho bioquímico semi-automático da Termolab®.

4.2.3. Dosagem de Corticosterona

A determinação das concentrações de corticosterona dos animais do projeto foi realizada utilizando o kit comercial DetectX[®] CORTICOSTERONE Enzyme Immunoassay Kit (ARBOR ASSAYS[™], Ann, MI, USA), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. A preparação das amostras e a realização da leitura da placa de ELISA foi desenvolvida nas dependências do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

4.3. EXAME ANÁTOMO-PATOLÓGICO

As serpentes que vieram a óbito no decorrer do experimento foram submetidas à necropsia para avaliação macroscópica e fragmentos teciduais foram colhidos para avaliação histopatológica. As serpentes encontradas em estado avançado de decomposição foram acondicionadas em saco branco para lixo infectante identificado e armazenado em freezer convencional para posterior descarte.

Ao final do experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia. As serpentes foram colocadas em recipientes saturados com dióxido de carbono (CO₂) até atingirem um estado de inconsciência (narcose) e óbito. Imediatamente após o óbito era realizada a necropsia do animal para avaliação macroscópica e colheita de fragmentos teciduais para avaliação histopatológica.

A técnica necroscópica utilizada compreendeu àquela adotada pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Em resumo, o procedimento consistia, primeiramente, na determinação de parâmetros biométricos (pesagem e medição – CRC e CT) e observação do estado nutricional do animal, grau de hidratação, presença de ectoparasitos, cicatrizes e feridas. As cavidades naturais eram avaliadas (boca, fossetas

loreaís, narinas e cloaca), atentando-se para a coloração das mucosas e presença de material nas cavidades. A abertura da carcaça era realizada através de um corte sagital mediano, iniciando-se na porção ventro-medial do corpo e estendendo-se, cranialmente, até a primeira escama gular e, caudalmente, até a escama cloacal. O exame dos órgãos *in situ* consistia em inspecionar a distribuição dos órgãos, a presença de líquidos cavitários e parasitos, aspectos das serosas e possíveis aderências. Os órgãos e tecidos foram retirados em conjuntos e detalhadamente analisados, quanto a sua coloração, consistência, forma, superfícies capsular e de corte, pigmentação, presença de parasitos e alterações de volume/tamanho.

Os parasitos encontrados foram colhidos e fixados em álcool glicerinado (95 mL de álcool 70% + 5 mL de glicerina) e outra parte foi congelada de imediato a -20°C para posterior identificação molecular

As carcaças dos animais submetida a necropsia, bem como as dos que estavam em autólise, foram descartadas conforme estabelecido pela Comissão de Resíduos do Instituto Butantan.

4.4. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Fragmentos dos principais órgãos de todas as serpentes submetidas à necropsia durante o período de estudo, incluindo, o intestino delgado, intestino grosso, fígado, rim, baço, estômago, esôfago, pulmão e gônadas, foram colhidos em formol a 10% e, após 24 horas, o material era transferido para álcool 70%. O material foi, então, processado de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina e corados pela técnica da hematoxilina e eosina.

O material histopatológico foi analisado e interpretado de acordo com as

informações disponíveis na literatura, relativa aos processos mórbidos e parasitários que acometem os répteis.

4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A biologia molecular é a área da ciência que envolve o estudo e a manipulação das moléculas que constituem o material genético dos indivíduos (HEPP, NONOHAY, 2016). Desde o século passado, inúmeros avanços foram obtidos, tais como a identificação da estrutura e função do DNA e o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitiram o isolamento, a manipulação, a multiplicação e o sequenciamento do DNA (WATSON et al., 2009). Este conjunto de técnicas e análises, trás novas possibilidades à pesquisa, aumentando o conhecimento sobre a organização, regulação genética dos organismos e propicia avanços tecnológicos importantes em diferentes áreas.

A identificação molecular foi realizada no LAPCOM - Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

4.5.1. Reações Moleculares

A extração de DNA foi realizada utilizando um protocolo clássico com fenol e clorofórmio (SAMBROOK, J; FRISCH, 1989), solução tampão de extração com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (2% CTAB, 1M Tris pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 5M NaCl) (DZIDO; KIJEWSKA; ROKICKI, 2012; TIMI et al., 2014) e kits comerciais (QIAamp DNA Mini Kit QIAGEN®). Pequenos pedaços dos helmintos, obtidos usando lamina de bisturi para maior fragmentação dos mesmos, foram colocados em solução de lise para a extração de DNA (DZIDO; KIJEWSKA; ROKICKI, 2012; TIMI et al., 2014).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada empregando oligonucleotídeos, previamente descritos na literatura para as regiões espaçadoras (ITS1) de nematódeos (NC5F, NC13R) (ZHU et al., 2000).

4.5.2. Purificação e quantificação dos produtos de PCR

Após a separação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1,5%, as bandas de interesse foram eluídas do gel com o auxílio de kit comercial, seguindo as instruções do fabricante (GFX Gel extraction system) ou Exosap (CHILTON et al., 1997; HALL, 1999).

4.5.3. Sequenciamento de ácidos nucleicos

Para a reação de sequenciamento automático foi utilizado o kit comercial Big DyeTM terminator – cycle sequencing ready reaction – Applied Biosystems. O DNA obtido de cada produto de PCR, após reação de purificação descrita no item anterior, foi utilizado como amostra para a reação de sequenciamento (HALL, 1999; TAMURA et al., 2013). A reação foi executada segundo recomendações do fabricante. Cada produto de PCR foi sequenciado em duplicata, com os primers senso e anti-senso para cada reação (ZHU et al., 2000).

4.5.4. Edição final das sequencias, alinhamentos e obtenção de arvores genealógicas

As sequencias de ITS1 foram analisadas quanto à qualidade do programa Phred-Phrap (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e editadas no programa Chromas Lite 2.01® para gerar sequência consenso. Determinada as sequências consenso de

nucleotídeos de cada amostra, as mesmas foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W, contido na suíte BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), tomando-se como base sequências homólogas disponíveis no GenBank (Tabela 3). Foram construídas matrizes de alinhamentos de sequências para cada um dos marcadores com o auxílio do programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) para obtenção de árvores filogenéticas.

Tabela 3. Informações sobre as espécies e hospedeiros das sequências obtidas no Genbank.

Espécie	Hospedeiro	GenBank
<i>Ophidascaris robertsi</i>	<i>Petaurus breviceps</i> (Marsupialia) ou <i>Morelia spilota variegata</i> (Pythonidae), cativeiro Australia.	AJ007457.1
<i>Raphidascaris lophii</i>	Peixes marinhos, China.	JF809816.1
<i>Raphidascaris acus</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (Anguillidae), peixe- enguia européia, Turquia.	KT633862.1
<i>Raphidascaris trichiuri</i>	Peixes marinhos, Taiwan.	FJ009682.1
<i>Rhabdias bakeri</i>	<i>Lithobates sylvaticus</i> (Ranidae), rã da floresta, Canadá.	EU360832
<i>Rhabdias ranae</i>	<i>Lithobates pipiens</i> (Ranidae), Canadá.	EU360826
<i>Rhabdias fuscovenosa</i> ou <i>Serpentirhabdias</i> <i>fuscovenosa</i>	<i>Natrix natrix</i> (Colubridae), cobra-de-água- de-colar, Itália.	JQ073814
<i>Baylisascaris devosi</i>	Mamíferos, Rússia.	KY465505
<i>Baylisascaris transfuga</i>	<i>Thalarctos maritimus</i> (Ursidae), urso polar, cativeiro Itália.	HM594951
<i>Toxascaris leonina</i>	Tailândia	KR999999
<i>Porrocaecum angusticolle</i>	Não informado.	AY603536
<i>Ascaris suum</i>	Porco, Honduras	MG819679.1
<i>Ascaris lumbricoides</i>	“isolado clínico” - humanos, Brasil.	GQ339801

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1. IMPUTAÇÃO DE DADOS FALTANTES (*missing data*)

Em vários estudos realizados nas diferentes áreas do conhecimento são planejados estatisticamente experimentos que envolvem dois fatores, cada fator pode apresentar um número diferente de níveis e geralmente o resultado é uma tabela que contém a medição da variável de interesse (ALARCÓM, 2015). Uma complicação comumente encontrada quando se trabalha com dados reais são dados discrepantes, falta de repetições e dados faltantes, por várias questões (fatores climáticos, morte de animais, aparelhos danificados, dados não mensurados) (NUNES, 2007). Em investigações científicas com a ocorrência de dados faltantes ou dados perdidos (*missing data*), determinar a abordagem analítica adequada para os dados é uma questão que pode ser bastante delicada, pois a utilização de métodos inadequados pode levar a conclusões erradas sobre o conjunto de dados (NUNES, 2007; ALARCÓM, 2015). Alarcóm (2015) sugere como possível solução ao problema, repetir o experimento sob condições similares e, dessa maneira, obter novos valores para as observações perdidas. No entanto, esta solução, embora ideal, pode não ser viável em termos de tempo e dinheiro. Outra opção bastante comum em pesquisas com dados faltantes, é restringir a análise aos indivíduos com dados completos nas variáveis envolvidas. Porém, as estimativas obtidas com tais análises podem ser viesadas se os indivíduos que são incluídos na análise são sistematicamente diferentes daqueles que foram excluídos em uma ou mais variáveis (NUNES, 2007).

Para contornar esse problema, técnicas estatísticas denominadas de imputação de dados faltantes que envolvem a substituição dos dados perdidos por estimativas de valores plausíveis, são utilizadas. Essas técnicas têm por objetivo “completar” os bancos de dados e possibilitar a análise com todos os indivíduos do estudo (ALARCÓM, 2015).

As primeiras técnicas de imputação desenvolvidas envolviam métodos relativamente simples, tais como substituição dos dados faltantes pela média ou pela mediana da variável, por interpolação ou até por regressão linear. Todas essas técnicas mencionadas permitem “preencher” os dados faltantes através do que se chama de “imputação única”, ou seja, o dado ausente é preenchido uma única vez e então se utiliza o banco de dados completo para as análises (NUNES, 2007).

O Método de imputação simples ou única é determinado pela substituição de dados faltantes por um valor de tendência central. Ocorre quando uma variável quantitativa é substituída pela média da variável (média geral ou a média de um grupo mais similar) ou se pode substituir o dado faltante pela mediana da variável ou pela mediana de um grupo de casos mais similares (NUNES, 2007). Sempre que existirem valores extremos (outliers) na amostra, é recomendado utilizar o valor da mediana ao invés do valor da média (ALARCÓM, 2015). Se a variável com dados faltantes é categórica ordinal, utiliza-se a mediana, pode-se também utilizar o valor modal para substituição do dado faltante. Se a variável é categórica não ordinal, é recomendado utilizar a moda e se não houver moda, sorteia-se uma categoria com maior frequência (NUNES, 2007; ALARCÓM, 2015).

Para o presente estudo, como as variáveis faltantes são quantitativas, utilizou-se a média dos valores da variável faltante como valor de imputação.

4.6.2. ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad InStat® versão 3.0 para Windows (GrahPad Software, San Diego Califórnia – USA).

Os dados hematológicos foram avaliados estatisticamente através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e classificados de acordo com sua aderência a uma curva de Gauss. Para analisar as diferenças dentro do mesmo Grupo, em diferentes datas, foi utilizado ANOVA com dados repetidos ou o Teste de Friedman e o método de Dunn's. Para as diferenças entre os dois Grupos foi utilizado teste t não pareado e ANOVA de Welch, quando os dados apresentaram distribuição normal. Quando os dados não apresentavam distribuição normal foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Com relação as concentrações séricas de corticosterona, para diferenças dentro do mesmo Grupo, os resultados foram submetidos a um teste ANOVA de medidas repetidas e ao teste de Bonferroni; ou teste de Friedman com pós-teste de Dunn, se a distribuição não fosse normal. Ao comparar diferenças entre os dois Grupos, foi utilizado um ANOVA (fator único) e teste de Turkey para os dados com distribuição normal e o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, caso não respeessem as premissas de normalidade.

Para a descrição dos resultados, foram utilizados as médias e o erro-padrão dos valores médios (média $\pm$ erro padrão [EPM]) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; e dos dados analisados através de análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta.

5. RESULTADOS

Durante um período de 12 meses (Jan/14 a Jan/15) os animais selecionados foram mantidos para colheitas de sangue e avaliações dos parâmetros citados anteriormente. Os dados hematológicos; bioquímicos; das concentrações de corticosterona; avaliação das condições gerais dos animais; avaliação necroscópica; análise histopatológica; e a identificação molecular dos parasitos encontrados, serão apresentados a seguir.

5.1. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Comparando as colheitas intragrupo em diferentes datas, não observamos diferenças estatísticas significantes nos valores médios das contagens totais de eritrócitos, leucócitos e trombócitos dos animais do Grupo 1 e do Grupo 2, conforme pode ser verificado nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Em relação ao Grupo 1, foram verificados valores significativamente mais altos de hemoglobina na colheita (tempo 0), quando comparados aos valores mais baixos da sexta colheita. A porcentagem de CHCM da segunda colheita apresentou diferença estatística em relação à porcentagem mais baixa da sétima colheita. No que concerne à contagem específica dos leucócitos, observou-se diferença estatística na porcentagem dos heterófilos degranulados e dos basófilos, com valores maiores no início do experimento do que no final; ao contrário dos heterófilos íntegros que apresentaram valores maiores

no final das colheitas. Os demais parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes colheitas.

Em relação ao Grupo 2, os valores de hemoglobina variaram estatisticamente em todas as colheitas, sendo maiores na primeira e na sexta. A porcentagem do hematócrito foi mais alta na primeira e oitava colheitas e mais baixo na terceira colheita, enquanto o HCM apresentou valores mais altos na primeira colheita, quando comparados à quarta colheita. No tocante à contagem específica dos leucócitos, apenas a porcentagem dos heterófilos degranulados apresentou variação significativa, sendo a primeira colheita mais alta e a quinta mais baixa.

Quando as comparações foram feitas intergrupos, entre colheitas realizadas nos mesmos momentos, observamos que os valores de VCM variaram significativamente em todas as colheitas, sendo que o Grupo 2 apresentou valores mais altos, com exceção da quarta colheita, em que o Grupo 1 apresentou o valor mais alto (Tabela 6). Em contrapartida, o HCM apresentou valores mais elevados no Grupo 1, em todas as colheitas (Tabela 7).

Os valores realçados em cinza não foram levados em consideração para os cálculos estatísticos. Nestes casos, para mais de um animal, nas referidas coletas, haviam dados faltantes e para obedecer a regra de imputação de dados previamente estabelecida optamos por retirar os dados das coletas da análise.

As comparações intergrupos estão separadas pelos diferentes parâmetros hematológicos avaliados nas diferentes colheitas e estão apresentadas nas tabelas no Apêndice A.

Tabela 4. Valores hematológicos médios do Grupo 1 com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2018.

Tabela 5.1.1. Parâmetros Hematológicos	Colheita tempo 0	1ª colheita	2ª colheita	3ª colheita	4ª colheita	5ª colheita	6ª colheita	7ª colheita
	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM
CTE (10³ cél/mm³)	606 ± 59,13	550 ± 61,59	447,5 ± 61,59	475 ± 88,74	520 ± 63,95	517,5 ± 55,98	448 ± 23,75	498 ± 24,98
CTL (10³ cél/mm³)	12,8 ± 2,41	9,25 ± 1,91	6,63 ± 1,47	7,5 ± 0,76	11,37 ± 0,99	14,88 ± 1,68	18,5 ± 4,09	14,5 ± 2,27
Hb (g/dL)	7,82 ± 0,7 ^a	6,2 ± 0,44 ^{ab}	6,78 ± 0,73 ^{ab}	5,56 ± 0,91 ^{ab}	5,07 ± 0,37 ^{ab}	4,55 ± 0,44 ^{ab}	3,84 ± 0,55 ^b	5,54 ± 0,38 ^{ab}
Ht (%)	22,8 ± 2,65	23,4 ± 4,23	20,2 ± 2,01	22 ± 4,76	16,25 ± 0,77	19,25 ± 1,07	20,4 ± 2,13	23,2 ± 0,97
VCM (fL)	223 ± 52	187 ± 54	227 ± 51	515 ± 313	104 ± 13	163 ± 51	180 ± 93	184 ± 75
HCM (pg)	316 ± 59	344 ± 74	410 ± 79	312 ± 46	348 ± 41	324 ± 69	360 ± 72	394 ± 70
CHCM (%)	37,4 ± 8,37 ^{ab}	28,4 ± 3,11 ^{ab}	33,6 ± 1,21 ^a	27,8 ± 3,99 ^{ab}	30 ± 1,22 ^{ab}	24,25 ± 3,1 ^{ab}	19,4 ± 3,64 ^{ab}	24,4 ± 2,06 ^b
Linfócitos (%)	60, 17 ± 5,49	65,33 ± 6,62	70,17 ± 5,08	74,5 ± 3,24	75,67 ± 4,44	69 ± 4,30	73,5 ± 1,84	75,4 ± 2,93
Azurófilos (%)	16,67 ± 2,06	18,5 ± 4,62	17,33 ± 2,04	16,5 ± 0,92	16,17 ± 2,2	17, 67 ± 3,17	20,17 ± 3,05	17,8 ± 2,04
Heterófilos íntegros (%)	4,17 ± 2,23	1 ± 0,36	2 ± 0,73	2 ± 0,73	2 ± 0,89	7,5 ± 1,31	5,17 ± 1,56	6,2 ± 0,98
Heretófilos degranulados (%)	16,67 ± 5,04 ^a	11,5 ± 3,02 ^{ab}	8,67 ± 3,96 ^{ab}	6,67 ± 2,01 ^{ab}	6,17 ± 4,05 ^{ab}	5,33 ± 4,54 ^{ab}	2,83 ± 2,09 ^{ab}	0,6 ± 0,33 ^b
Basófilos (%)	2,33 ± 0,76 ^{ae}	3 ± 0,82 ^a	1,83 ± 0,48 ^{abcdef}	0,33 ± 0,33 ^{ef}	0 ^{bf}	0,5 ± 0,34 ^{efg}	0 ^{cf}	0 ^{df}
CTT (10³ cél/mm³)	6,9 ± 1,78	7,12 ± 1,63	6,37 ± 1,22	4,25 ± 0,71	6,75 ± 0,12	9,5 ± 0,55	1,04 ± 0, 25	6,8 ± 0,11

CTE (contagem total de eritrócitos), CTL (contagem total de leucócitos), Hb (hemoglobina), Ht (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular media), CTT (Contagem total de trombócitos), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (p < 0,05) entre colheitas.

Tabela 5. Valores hematológicos médios do Grupo 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2018.

Parâmetros Hematológicos	Colheita tempo 0	1ª colheita	2ª colheita	3ª colheita	4ª colheita	5ª colheita	6ª colheita	7ª colheita
	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM
CTE (10 ³ cél/mm ³)	607 ± 59,73	513 ± 77,79	457 ± 53,02	542 ± 61,39	520 ± 19,32	537 ± 38,44	448 ± 32,90	437 ± 31,80
CTL (10 ³ cél/mm ³)	5,60 ± 0,68	8,80 ± 2,35	7,60 ± 1,65	11,00 ± 1,29	11,40 ± 0,83	13,83 ± 0,88	12,87 ± 1,55	8,67 ± 1,20
Hb (g/dL)	8,78 ± 1,09 ^a	7,00 ± 1,14 ^{ab}	6,45 ± 0,37 ^{ab}	5,37 ± 0,45 ^b	4,63 ± 0,40 ^b	9 ± 5,66 ^a	3,60 ± 0,35	6,05 ± 0,61 ^{ab}
Ht (%)	26,50 ± 2,14 ^a	21,17 ± 1,90 ^{ab}	19,50 ± 1,87 ^b	17,80 ± 0,94 ^{ab}	20,40 ± 2,17 ^{ab}	21,40 ± 1,76 ^{ab}	17,67 ± 1,45	25 ± 2,38 ^a
VCM (fL)	423 ± 21	395 ± 44	442 ± 63	340 ± 43	442 ± 40	377 ± 12	473 ± 30	555 ± 84
HCM (pg)	155 ± 7 ^a	117 ± 10 ^{ab}	152 ± 20 ^{ab}	83 ± 6 ^b	223 ± 103 ^{ab}	73 ± 12	103 ± 8 ^{ab}	143 ± 31
CHCM (%)	32,83 ± 2,91	32,67 ± 3,28	34 ± 1,48	30,83 ± 3,74	23,33 ± 1,58	42,17 ± 17,56	20,33 ± 0,88	24,67 ± 2,01
Linfócitos (%)	62,17 ± 2,97	67,33 ± 4,26	68,83 ± 4,77	71,50 ± 3,68	72 ± 2,10	75,33 ± 1,80	73,50 ± 2,60	68,50 ± 3,66
Azurófilos (%)	20,5 ± 3,73	15 ± 3,64	14 ± 3,28	18,17 ± 2,06	19,5 ± 1,93	18,17 ± 1,53	17,25 ± 1,80	19,50 ± 2,36
Heterófilos íntegros (%)	1,83 ± 0,60	1,50 ± 0,76	6,67 ± 2,96	5 ± 1,9	6 ± 1,98	4,83 ± 0,70	7,75 ± 1,11	6,25 ± 2,21
Heretófilos degranulados (%)	14,67 ± 3,16 ^a	15,33 ± 3,18 ^{ab}	10 ± 3,7 ^{ab}	5 ± 2,07 ^{ab}	2 ± 1,63 ^b	0,83 ± 0,65 ^{ab}	1,25 ± 0,95	3,75 ± 1,11
Basófilos (%)	1,17 ± 0,48	0,83 ± 0,48	0,50 ± 0,34	0,33 ± 0,21	0,83 ± 0,40	0,67 ± 0,33	0,25 ± 0,25	2,00 ± 0,71
CTT (10 ³ cél/mm ³)	4,50 ± 0,71	5,80 ± 0,6	4,90 ± 0,53	5,12 ± 0,68	7,50 ± 1,48	11,00 ± 9,00	6,12 ± 1,14	5,67 ± 1,67

CTE (contagem total de eritrócitos), CTL (contagem total de leucócitos), Hb (hemoglobina), Ht (hematócrito), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), CTT (Contagem total de trombócitos), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 6. Comparação entre valores médios do volume corpuscular médio (VCM) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

VCM (fL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	223 ± 52 ^a	423 ± 21 ^b
1ª colheita	187 ± 54 ^a	395 ± 44 ^b
2ª colheita	227 ± 51 ^a	442 ± 63 ^b
3ª colheita	515 ± 31 ^a	340 ± 43 ^b
4ª colheita	104 ± 13 ^a	442 ± 40 ^b
5ª colheita	163 ± 51	377 ± 12
6ª colheita	180 ± 93 ^a	473 ± 30 ^b
7ª colheita	184 ± 75	555 ± 84

VCM (volume corpuscular médio), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 7. Comparação entre valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

HCM (pg)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	316 ± 59 ^a	155 ± 7 ^b
1ª colheita	344 ± 74 ^a	117 ± 10 ^b
2ª colheita	410 ± 79 ^a	152 ± 20 ^b
3ª colheita	312 ± 46 ^a	83 ± 6 ^b
4ª colheita	348 ± 41 ^a	22 ± 10 ^b
5ª colheita	324 ± 69	73 ± 12
6ª colheita	360 ± 72 ^a	10 ± 8 ^b
7ª colheita	394 ± 70	143 ± 31

HCM (hemoglobina corpuscular média), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

5.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os resultados bioquímicos dos animais do grupo 1 e 2 estão apresentados nas tabelas 8 e 9 respectivamente. As comparações intergrupos estão separadas pelos diferentes parâmetros avaliados em todos os momentos de colheita e estão apresentadas em tabelas no Apêndice B.

No Grupo 1 verificou-se diferença significativa nos valores de ácido úrico, sendo que o valor mais alto foi mensurado na segunda colheita e o mais baixo na quarta colheita; a albumina apresentou diferença estatística na segunda e sétima colheitas, com os valores mais altos na última colheita. Os valores de creatinina-K variaram significativamente em todas as colheitas, da mesma

forma que os valores de fosfatase alcalina e proteínas totais. O valor mais baixo de glicose no Grupo 1 foi registrado na sexta colheita e a mais alta na sétima colheita.

Em relação ao Grupo 2, foram encontrados valores mais altos de ácido úrico na segunda colheita, quando comparados à sexta colheita; para valores de albumina a terceira colheita foi a mais baixa e a oitava a mais alta. A enzima AST apresentou valores mais baixos na segunda colheita, em relação à quinta colheita. A dosagem de creatinina variou durante as colheitas, sendo que o valor mais alto foi o da primeira colheita e os dois valores mais baixos foram registrados na quarta e quinta colheita; os níveis de fosfatase alcalina variaram significativamente entre todas as colheitas, da mesma forma que os valores de glicose.

Da mesma forma que ocorreu com os parâmetros hematológicos, os valores realçados em cinza não foram levados em consideração para os cálculos estatísticos. Nestes casos, para mais de um animal, nas referidas coletas, haviam dados faltantes e para obedecer a regra de imputação de dados previamente estabelecida optamos por retirar os dados das coletas da análise.

Quando os resultados dos parâmetros bioquímicos foram comparados intergrupos, entre colheitas em momentos iguais, não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

Tabela 8. Valores bioquímicos médios do Grupo 1 com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2018.

Parâmetros Bioquímicos	Colheita Tempo 0	1ª colheita	2ª colheita	3ª colheita	4ª colheita	5ª colheita	6ª colheita	7ª colheita
	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM	média ± EPM
AU(mg/dL)	2,28 ± 0,31 ^{ab}	4,56 ± 1,39 ^{ab}	5,17 ± 1,52 ^a	3,73 ± 3,05	1,56 ± 0,21 ^b	2,71 ± 0,59	2,27 ± 0,37 ^{ab}	2,64 ± 0,58 ^{ab}
Alb (g/dL)	0,93 ± 0,15 ^{ab}	0,68 ± 0,07 ^{ab}	0,57 ± 0,04 ^a	0,58 ± 0,04	0,83 ± 0,09 ^{ab}	0,70 ± 0,04	0,7 ± 0,11 ^{ab}	1,95 ± 0,10 ^b
ALT (U/L)	30,06 ± 14,32	20,02 ± 3,57	19,75 ± 2,50	22,67 ± 3,53	19,20 ± 3,38	16,25 ± 3,44	24 ± 2,95	35,8 ± 6,30
AST (U/L)	30,80 ± 4,93	30,06 ± 7,54	32,25 ± 7,09	29,33 ± 9,84	33,60 ± 10,98	35,75 ± 6,58	39,20 ± 16,27	30,40 ± 4,34
Ca (mg/dL)	15,73 ± 3,73	28,15 ± 12,38	12,39 ± 0,73	11,07 ± 2,67	9,56 ± 0,93	12,44 ± 0,87	7,99 ± 0,87	11,14 ± 2,00
CK-NAC (U/L)	87,60 ± 13,30	44,40 ± 17,45	34,33 ± 14,19	23 ± 0,00	146 ± 70,52	218,75 ± 61,22	240,60 ± 117,86	203,80 ± 95,02
Colesterol (mg/dL)	129,53 ± 15,08	120,26 ± 33,17	140,09 ± 11,58	120,90 ± 32,04	234,88 ± 29,82	194,38 ± 33,77	149,94 ± 29,97	181,50 ± 8,21
Creatinina-K (mg/dL)	8,43 ± 1,32 ^a	4,98 ± 0,99 ^{ab}	4,47 ± 0,17	3,97 ± 0,03	3,89 ± 0,09 ^b	3,79 ± 0,08 ^b	4,17 ± 0,08 ^b	4,83 ± 0,57 ^b
FA (U/L)	60 ± 12,45 ^a	86,80 ± 14,69 ^{ab}	96 ± 9,61 ^b	64 ± 8,54	77,2 ± 11,07 ^{ab}	58,25 ± 5,94 ^a	68 ± 9,57 ^{ab}	85 ± 7,96 ^{ab}
P (mg/dL)	2,28 ± 0,62	2,22 ± 0,28	1,99 ± 0,22	2,28 ± 0,32	2,38 ± 0,09	3,02 ± 0,24	2,36 ± 0,33	3,15 ± 0,71
Glicose (mg/dL)	33,71 ± 4,45 ^{ab}	36,31 ± 3,39 ^{ab}	51,40 ± 8,62 ^{ab}	27,25 ± 1,17	35,95 ± 6,65 ^{ab}	49,92 ± 4,32 ^{ab}	22,89 ± 4,43 ^a	56,72 ± 5,50 ^b
PT (mg/dL)	4,18 ± 0,65 ^{ab}	4,01 ± 0,41 ^{ab}	3,08 ± 0,56 ^a	3,09 ± 0,53	3,03 ± 0,36 ^a	3,24 ± 0,20 ^a	3,06 ± 0,32 ^a	5,02 ± 0,35 ^b

AU (ácido úrico), Alb (albumina), ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), Ca (cálcio), CK-NAC (cretina quinase), FA (fosfatase alcalina), P (fósforo), PT (proteínas totais), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 9. Valores bioquímicos médios do Grupo 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM). São Paulo, 2018.

Parâmetros Bioquímicos	1ª colheita média ± EPM	2ª colheita média ± EPM	3ª colheita média ± EPM	4ª colheita média ± EPM	5ª colheita média ± EPM	6ª colheita média ± EPM	7ª colheita média ± EPM	8ª colheita média ± EPM
AU(mg/dL)	3,46 ± 0,68 ^{ab}	4,27 ± 0,99 ^a	3,19 ± 1,48 ^{ab}	1,95 ± 0,71 ^{ab}	1,95 ± 0,38 ^{ab}	1,59 ± 0,10 ^b	1,91 ± 0,72	2,62 ± 0,36 ^{ab}
Alb (g/dL)	1,0 ± 0,18 ^{ab}	1,16 ± 0,49 ^{ab}	0,51 ± 0,07 ^a	0,91 ± 0,35 ^{ab}	0,66 ± 0,07 ^{ab}	0,8 ± 0,07 ^{ab}	0,99 ± 0,07	1,56 ± 0,17 ^b
ALT (U/L)	21,83 ± 3,26	14,8 ± 2,24	17,4 ± 2,55	17 ± 2,62	27,4 ± 4,69	24,2 ± 5,71	31,33 ± 10,48	35,2 ± 11,61
AST (U/L)	43,5 ± 12,35 ^{ab}	21,6 ± 2,98 ^a	27,6 ± 4,39 ^{ab}	32,67 ± 10,24 ^{ab}	75,2 ± 17,48 ^b	45,6 ± 17,43 ^{ab}	41,68 ± 23,25	74,2 ± 18,53 ^{ab}
Ca (mg/dL)	11,91 ± 1,40	19,47 ± 4,46	10,57 ± 1,07	11,03 ± 2,02	13,08 ± 1,52	10,58 ± 1,6	7,30 ± 1,78	10,03 ± 0,74
CK-NAC (U/L)	287,8 ± 123,56	67,2 ± 27,41	S/C	103,25 ± 29,15	596 ± 244,6	658,6 ± 272,44	388 ± 143,68	527,6 ± 191,96
Colesterol (mg/dL)	106,22 ± 15,89	113,25 ± 17,23	133,87 ± 10,87	204,62 ± 33,55	174,46 ± 48,06	125,99 ± 22,65	175,65 ± 16,74	134,14 ± 21,52
Creatinina-K (mg/dL)	8,81 ± 1,79 ^a	5,11 ± 0,98 ^{ab}	3,92 ± 0,05 ^{ab}	3,84 ± 0,17 ^b	3,84 ± 0,05 ^b	4,12 ± 0,16 ^{ab}	4,34 ± 0,18	4,77 ± 0,4 ^{ab}
FA (U/L)	54 ± 5,7 ^a	99,8 ± 35,92 ^b	89,25 ± 10,1 ^b	63,0 ± 10,28 ^a	80,2 ± 17,03 ^{ab}	56,25 ± 9,94 ^a	70,67 ± 9,40	68,6 ± 12,95 ^{ab}
P (mg/dL)	2,99 ± 0,49	2,25 ± 0,31	1,72 ± 0,36	2,15 ± 0,16	2,93 ± 0,28	2,89 ± 0,46	2,85 ± 0,71	2,75 ± 0,49
Glicose (mg/dL)	31,75 ± 4,53 ^a	38,62 ± 9,1 ^{ab}	28,53 ± 3,83 ^a	42,40 ± 13,99 ^{ab}	223,03 ± 172,52 ^b	41,4 ± 1,95 ^{ab}	18,72 ± 5,47	76,54 ± 13,72 ^{ab}
PT (mg/dL)	4,56 ± 0,34	3,87 ± 0,43	3,67 ± 0,04	3,48 ± 0,25	3,49 ± 0,17	3,13 ± 0,27	2,83 ± 0,28	4,13 ± 0,73

AU (ácido úrico), Alb (albumina), ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), Ca (cálcio), CK-NAC (cretina quinase), FA (fosfatase alcalina), P (fósforo), PT (proteínas totais), S/C (sem colheita), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes (p < 0,05) entre colheitas.

5.3. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA

Os resultados dos valores plasmáticos de corticosterona dos animais dos Grupos 1 e 2 estão apresentados nas tabelas 10 e 11. Já as comparações intergrupos estão apresentadas na tabela 12 e no gráfico 1.

Não houve diferença estatística significativa entre as colheitas do Grupo 1 e nem entre os animais, embora os animais Cdt 9, Cdt 11 e Cdt 29 tenham apresentado valores iniciais mais altos do que os demais. O animal Cdt 20 foi a óbito antes da 4ª colheita.

Em relação ao Grupo 2, não houve diferença estatística significativa entre as colheitas, e nem entre os animais, embora todos os animais do Grupo 2 tenham apresentado valores plasmáticos de corticosterona finais mais elevados que os valores plasmáticos de corticosterona iniciais. O animal Cdt 12 foi a óbito antes da 4ª colheita, ,

Comparado-se as médias do Grupo 1 com as médias do Grupo 2, entre todas as colheitas, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0092$) entre os Grupos, sendo possível observar que os animais do Grupo 2, a partir da primeira colheita, apresentaram sempre valores basais maiores do que as serpentes do Grupo 1 (Gráfico 1). Ao final do experimento, os valores de corticosterona plasmática do Grupo 2 eram, no mínimo, duas vezes maiores do que os níveis encontrados nos animais do Grupo 1.

Tabela 10. Valores plasmáticos de corticosterona dos animais do Grupo 1 ao longo das colheitas. São Paulo, 2018.

Corticosterona (ng/mL)	Cdt 4	Cdt 9	Cdt 10	Cdt 11	Cdt 20	Cdt 29
Colheita tempo 0	24,09	79,06	21,95	76,45	35,57	71,86
1ª colheita	122,98	25,35	28,86	32,61	13,51	37,13
2ª colheita	43,63	23,60	180,05	66,93	48,62	0,01
3ª colheita	22,76	41,62	66,93	258,59	†	119,23
4ª colheita	6,34	3,34	25,86	78,68	†	68,85
5ª colheita	144,88	29,29	23,84	49,57	†	11,71
6ª colheita	34,06	54,41	33,09	107,69	†	S/C
7ª colheita	46,60	20,83	25,22	38,39	†	S/C

† (óbito), S/C (sem colheita).

Tabela 11. Valores plasmáticos de corticosterona dos animais do Grupo 2 ao longo das colheitas. São Paulo, 2018.

Corticosterona (ng/mL)	Cdt 2	Cdt 7	Cdt 12	Cdt 16	Cdt 30	Cdt 32
Colheita tempo 0	31,99	99,91	30,76	96,98	20,17	38,58
1ª colheita	14,09	28,30	79,06	240,79	143,33	17,42
2ª colheita	14,51	71,52	23,97	93,24	45,09	230,34
3ª colheita	26,39	77,93	†	13,67	83,51	262,06
4ª colheita	17,81	33,74	†	25,60	S/C	270,51
5ª colheita	513,78	77,93	†	16,47	S/C	S/C
6ª colheita	85,82	128,88	†	143,02	S/C	S/C
7ª colheita	62,35	80,59	†	166,26	S/C	S/C

† (óbito), S/C (sem colheita)

Tabela 12. Média dos valores plasmáticos de corticosterona intergrupos, entre as diferentes colheitas. São Paulo, 2018.

Corticosterona (ng/mL)	Grupo 1	Grupo 2
Colheita tempo 0	51,50	53,07
1ª colheita	43,41	87,16
2ª colheita	60,47	79,78
3ª colheita	64,99	77,26
4ª colheita	46,69	69,53
5ª colheita	63,29	152,05
6ª colheita	48,19	119,24
7ª colheita	32,76	103,07

Foi aplicada na tabela o teste t não pareado com correção de Welch. O valor de $p < 0,0092$ indica que existe diferença estatística significativa entre os Grupos 1 e 2.

Gráfico 1. Representação dos valores plasmáticos médios de Corticosterona do Grupo 1 e do Grupo 2. São Paulo, 2018.

Foi aplicada na tabela o teste t não pareado com correção de Welch. O valor de $p < 0.0092$ indica que existe diferença estatística significativa entre os Grupos 1 e 2.

5.4 CONDIÇÕES GERAIS DOS ANIMAIS

Será abordado neste tópico as condições dos animais com relação ao ganho ou perda de peso, histórico alimentar e aferição de medidas. O histórico dos animais do Grupo 1 está descrito na Tabela 13 e o histórico dos animais do Grupo 2 na Tabela 14.

Os animais de ambos os Grupos foram alimentados com roedores abatidos, sendo a quantidade oferecida baseada no peso das serpentes. Por esta razão, os animais foram pesados frequentemente para a correção do protocolo alimentar utilizado no Laboratório de Herpetologia (10 a 20% do peso da serpente em alimento oferecido). A maioria dos animais do Grupo 1 ganharam peso e, ao final dos 12 meses, estavam mais pesadas do que no início do experimento, somente um animal emagreceu (Gráfico 2). Por outro lado, todas as serpentes do Grupo 2 acabaram perdendo peso ao longo do experimento (Gráfico 3).

Os animais do Grupo 1 alimentaram-se espontaneamente desde o início do experimento, não regurgitaram e não precisaram receber alimentação forçada. Os animais do Grupo 2, embora tenham sido alimentados da mesma forma, não aceitavam a alimentação tão bem. Dos sete animais do Grupo 2, seis passaram por algum evento de alimentação forçada e/ou regurgito como observado na Tabela 14.

Com relação às medidas, os animais dos dois grupos cresceram e terminaram com CRC e CT maiores do que no momento da primeira aferição de comprimento.

Tabela 13. Histórico de peso, comprimento e alimentar dos animais do Grupo 1. São Paulo, 2018.

	Cdt 4			Cdt 9			Cdt 10			Cdt 11			Cdt 20			Cdt 29		
	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A
12/11/14	567	85-95		537	92-101		1366	101-108		629	80-86		687	92-101		*	*	
16/12/14	504			591			1156			626			524			718		
22/12/14			1C			1C			2R			1C			1C			3C
03/02/15			1C			2C			3C									
13/02/15	569			582			1212			522			498			793		
17/03/15			NC			3C			2C			3C			1C			2C
07/04/15			1C			3C			2C			3C			NC			3C
23/04/15	604	86,5-97		612	94,5-100,5		998	101,5-109		501	82-90		510	94-104		765	85-95	
19/05/15			2C			2C			2C			3C			1C			2C
16/06/15			2C			1C			3C			3C			1C			2C
02/07/15	648			610			902			524			†			808		
22/07/15			NC			1C			3C			3C			†			1C
17/08/15			1C			3C			1C			3C			†			NC
26/08/15	653	87-97		699	85-102		960	103,5-110		530	85,5-92		†	†		886	87-97	
09/09/15			1C			3C			1C			2C			†			2C
19/10/15			NC			2C			2C			3C			†			2C
24/11/15	627			698			904			564			†			903		
30/11/15			NC			2C			1C			2C			†			2C
21/12/15			2C			1C			1R			2C			†			2C
13/01/16	670			676			968			614			†			999		
18/01/16			2C			1C			1R			2C			†			2C
15/02/16			1C			NC			NC			1C			†			1C
21/03/16			NC			NC			1R			NC			†			2C
18/04/16	694	89-99		738	96,5-103,5		940	105-110		625	86,5-94		†	†		1060	88,5-99	
20/04/16			1C			1C			NC			1C			†			2C

23/05/16			1C			1C			1C			2C			†			2C
20/06/16			1C			2C			1C			2C			†			2C
06/07/16	765			745			927			700			†			1125		
11/07/16			1C			1C			NC			2C			†			1C
15/08/16			NC			1C			NC			2C			†			1C
28/09/16	780	89-99		730	98-105		955	106-113		725	87,5-94			†		1150	89-99,5	

P (peso [g]), crc-ct (comprimento rostro-cloacal e comprimento total [cm]), A (alimentação), C (camundongo), R (rato), † (óbito).

Gráfico 2. Acompanhamento do peso (g) dos Animais do Grupo 1. São Paulo, 2018.

Tabela 14. Histórico de peso, comprimento e alimentar dos animais do Grupo 2. São Paulo, 2018.

	Cdt 2			Cdt 3			Cdt 7			Cdt 12			Cdt 16			Cdt 30			Cdt 32		
	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A	P	crc-ct	A
12/11/14	589	86,5-92		605	93-103		748	90-96		638	90-96		660	84-89		572	89-97		1370	90-98	
16/12/14	555			586			713			615			627			588			1149		
22/12/14			1C ^R			1C			3C			1C			2C			NC			2R
03/02/15			1C			2C			3C			3C			2C			NC			3R
13/02/15	542			600			647			606			664			556			1028		
17/03/15			1C ^R			1C			2C			3C			2C			1C			3R
07/04/15			1C			2C			3C			3C			1C			1C			2R
23/04/15	513	88-94		547	96-103,5		600	92-985		624	94-104		618	83,5-90		500	89-97		945	93-100	
19/05/15			NC			2C			2C			2C			1C			2C			2R
16/06/15			2C			NC			1C			2C			3C			3C			NC
02/07/15	498			533			559			596			584			487			803		
22/07/15			NC			NC			2C			1C ^R			NC			1C			NC
17/08/15			2C ^R			NC			2C			†			NC			2C			NC
26/08/15	466	90,5-98		514	98-105		508	95-99		†	†		550	86-92		458	89-98		800	94,5-101	
09/09/15			2C			2C ^R			1C			†			1C			1C			1R ^R
19/10/15			NC			NC			2C			†			1C			1C			2C
24/11/15	450			426			527			†			523			426			614		
30/11/15			NC			1C			1C			†			NC			NC			2C
21/12/15			1C			1C			1C			†			NC			NC			2C
13/01/16	458			407			504			†			561			409			546		
18/01/16			1C			1C			1C			†			NC			NC			2C
15/02/16			1C			1C			1C			†			2C ^F			2C ^F			1C
21/03/16			1C			1C			2C			†			NC			NC			1C
18/04/16	426	94-100		394	98,5-100		470	97-100		†	†		499	88-94,5		399	90-99		505	96-102	

20/04/16			1C			NC			1C			†			NC			NC			2C
23/05/16			1C ^R			NC			1C			†			1C			NC			1C
20/06/16			1C			NC			1C			†			1C			NC			2C
06/07/16	407			376			449			†			438			372			449		
11/07/16			NC			2C ^F			NC			†			1C			NC			2C
15/08/16			1C			1C			2C			†			NC			NC			2C
28/09/16	405	96-103		350	99-107		465	98-104		†	†		405	89-90,5		345	90-99		405	96-102,5	

P (peso [g]), crc-ct (comprimento rostro-cloacal e comprimento total [cm]), A (alimentação), C (camundongo), R (rato), † (óbito), ^F (alimentação forçada), ^R (regurgitou).

Gráfico 3. Acompanhamento do peso (g) dos Aniamis do Grupo 2. São Paulo, 2018.

Gráfico 4. Eliminação média de ovos por gramas de fezes entre os Grupos 1 e 2, entre 10 diferentes colheitas.

Com relação a eliminação de ovos de parasitos, o Gráfico 4 refe-se a quantidade de ovos por gramas de fezes (OPG's) médios eliminados pelos dois grupos em dez momentos diferentes. Podemos observar que os valores iniciais do Grupo 1 são mais baixos do que os valores do Grupo 2, ao longo das colheitas as serpentes do Grupo 1 vão apresentando cada vez menores contagens de OPG, até que na sexta amostra os valores médios são muito baixos (inferiores a 100 OPG's), enquanto que as serpentes do Grupo 2, apesar de diminuírem, sempre apresentaram contagens acima de 1000 OPG's.

5.5. AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA

5.5.1. Avaliação necroscópica dos animais

A técnica necroscópica utilizada no projeto foi aquela adotada pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, como descrito no item 4.4. A descrição dos achados de necropsia foi dividida em Avaliação Necroscópica do Grupo 1 (animais tratados) e do Grupo 2 (animais não tratados).

5.5.1.1 Avaliação necroscópica das serpentes do Grupo 1

Foram verificadas as seguintes alterações macroscópicas nos animais do Grupo 1 (Tabela 15) (% de animais afetados; nºanimais afetados/nº total de animais no grupo):

- Estado geral: caquexia (20%; 1/5);
- Cavidade oral: mucosa congesta (60%; 3/5);
- Sistema respiratório: parasito aderido a serosa do pulmão (Figura 1) (20%; 1/5);
- Sistema cardíaco: espessamento de pericárdio (100%; 5/5) e congestão/áreas de infarto focais disseminadas pelo miocárdio (100%; 5/5);
- Sistema sanguíneo e linfático: ingurgitamento dos vasos sanguíneos (60%; 3/5) e não visualização do baço (20%; 1/5);
- Sistema digestório: coloração amarronzada do fígado e espessamento de cápsula hepática (100%; 5/5); parasito aderido entre a cápsula (Figura 1) e o parênquima hepático (20%; 1/5); alças intestinais espessadas e com secreção catarral em grande quantidade na luz (20%, 1/5); pâncreas hipocorado (40%; 2/5) e pâncreas hipertrofiado (20%; 1/5);
- Sistema renal: rins hipocorados (100%; 5/5);
- Gordura celomática: cistos difusos entremeados na gordura celomática (20%; 1/5).

Tabela 15. Descrição dos achados de necropsia dos animais do Grupo 1. São Paulo, 2018.

	Cdt 4	Cdt 9	Cdt 10	Cdt 11	Cdt 29
Estado Geral	Regular	Regular	Caquético	Bom	Bom
Pele	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.
Mucosa oral	Normocorada	Normocorada	Congesta	Congesta	Congesta
Espessamento de pericárdio	P	P	P	P	P
Congestão cardíaca	P	P	P	P	P
Áreas de infarto	Coração	Coração	Coração/Baço	Coração	Coração
Vasos sanguíneos ingurgitados	A	P	A	P	P
Espessamento de cápsula hepática	P	P	A	P	P
Fígado amarronzado	P	P	P	P	P
Granuloma parasitário	A	P	A	A	A
Parasito em vísceras	A	Pulmão/Fígado*	A	A	A
Espessamento de alças intestinais	A	A	P	A	A
Presença de secreção	A	A	Catarral/Intestino	A	A
Órgão hipocorado	Baço/Rim	Rim	Baço/Rim	Rim	Rim
Hipertrofia	A	Pâncreas	A	A	A
Gordura celomática	Boa quantidade	Regular/Cistos	Escassa	Boa quantidade	Boa quantidade
Sistema musculo-esquelético	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.
Observações	A	Baço não visualizado	A	A	A

n.d.n (nada digno de nota), A (ausente), P (presente).

* encistados

5.5.1.2. Avaliação necroscópica dos animais do Grupo 2

Foram verificadas as seguintes alterações macroscópicas nos animais do Grupo 2 (Tabela 16) (% de animais afetados; nºanimais afetados/nº total de animais no grupo):

- Estado geral: caquexia (14,3%; 1/7);
- Cavidade oral: mucosa hipocorada (57,1%; 4/7);
- Sistema respiratório: discreto edema pulmonar (14,3%; 1/7); pulmão hipocorado (57,1%; 4/7); congestão pulmonar (42,9%; 3/7); sacos aéreos espessados (85,7%; 6/7); formações nodulares no parênquima do saco aéreo (14,3%; 1/7);
- Sistema cardíaco: espessamento de pericárdio (100%; 7/7), hidropericárdio (100%; 7/7) e áreas de infarto disseminadas pelo miocárdio (100%; 7/7); parasito entre o pericárdio (Figura 1) e o miocárdio (14,3%; 1/7);
- Sistema sanguíneo e linfático: não visualização do baço (14,3%; 1/7), atrofia de baço (42,9%; 3/7);
- Sistema digestório: coloração amarronzada do fígado com consistência friável e espessamento de cápsula hepática (87,7%; 6/7); parasito no parênquima hepático (14,3%; 1/7); nódulos caseosos difusos no parênquima hepático (14,3%; 1/7); espessamento de esôfago (71,4%; 5/7); espessamento de mucosa gástrica (100%; 7/7); parasitos vivos na luz gástrica (42,9%; 3/7); granuloma parasitária na mucosa gástrica (Figura 1) (87,7%; 6/7); espessamento de mucosa intestinal e presença de parasitos em porções do intestino (100%; 7/7); parte final do cólon espessada e hemorrágica (Figura 1) (14,3%; 1/7); pâncreas hipocorado (42,3%; 3/7) e hipertrofia de pâncreas;
- Sistema renal: rins hipocorados (42,9%; 3/7);
- Sistema muscular: formações nodulares no músculo (Figura 1) (28,6%; 2/7).

Tabela 16. Descrição dos achados de necropsia dos animais do Grupo 2. São Paulo, 2018.

	Cdt 2	Cdt 3	Cdt 7	Cdt 12	Cdt 16	Cdt 30	Cdt 32
Estado Geral	Bom	Bom	Bom	Regular	Regular	Caquético	Bom
Pele	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.
Mucosa oral	Normocorada	Hipocorada	Normocorada	Hipocorada	Hipocorada	Hipocorada	Normocorada
Pericárdio espessado	P	P	P	P	P	P	P
Hidro pericárdio	P	P	P	P	P	P	P
Áreas de infarto	P	P	P	P	P	P	P
Cápsula hepática	Espessada	Espessada	Espessada	Espessada	Espessada	Espessada	Espessada
Fígado amarronzado	P	P	P	P	P	P	P
Fígado friável	P	P	P	P	P	P	P
Nódulo caseoso	A	A	A	A	Fígado	A	A
Esôfago/estômago/ intestinos	Espessado	Espessado	Espessado	Espessado	Espessado	Espessado hemorrágico	Espessado
Granuloma parasitário	A	P	P	P	P	P	A
Parasito vivos	Intestino	Intestino	Intestino	Estômago/Intestino	Estômago/Intestino	Estômago/Intestino	Intestino
Parasita em vísceras	A	A	A	A	A	Coração/Fígado	A
Presença de secreção	A	A	A	A	A	Mucosa/Pulmão	A
Órgão hipocorado		Pulmão		Pulmão/Pâncreas/Rins	Pulmão/Pâncreas/Rins	Pulmão/Pâncreas/Rins	
Órgão congesto	Pulmão	A	Pulmão	A	A	A	Pulmão
Hipertrofia	Pâncreas	A	A	A	A	A	A
Atrofia				Baço	Baço	Baço	
Gordura celomática	Regular	Regular	Regular	Escassa	Escassa	A	Regular
Sistema musculo- esquelético	A	A	A	Nódulos musculares	Nódulos musculares	A	A
Observações	Saco aéreo espessado; baço não visualizado	Saco aéreo espessado	Saco aéreo espessado	Saco aéreo espessado	Saco aéreo espessado	Saco aéreo espessado	A

Figura 1- Achados necroscópicos. A: Granuloma parasitário em estômago, note local de inserção dos parasitos (pinça). B: Coração, note parasito entre pericárdio e o coração (tesoura). C: Note parasito aderido a face externa do saco aéreo (seta). D: Estômago com severa congestão e secreção catarral. E: Fígado, note cápsula e parasitos entre a cápsula e o fígado (seta). F: Note parasito aderido na cavidade celomática (tesoura).

5.5.2. Avaliação histopatológica

A descrição dos achados histopatológicos foi dividida em dois grupos, respeitando o Grupo 1 (animais tratados) e Grupo 2 (animais não tratados).

5.5.2.1. Avaliação histopatológica do Grupo 1

Foram verificadas as seguintes alterações histopatológicas nos animais do Grupo 1 (Tabela 17) (% de animais afetados; nºanimais afetados/nº total de animais no grupo):

- Coração: infiltração heterofílica, granuloma histiocitário e granuloma crônico em miocárdio (20%; 1/5);
- Pulmão: congestão intersticial (40%; 2/5); edema (40%; 2/5); espessamento de serosa, granuloma crônico e infiltração heterofílica (20%; 1/5).
- Estômago: hiperplasia e hipertrofia da camada muscular (40%; 2/5); edema de submucosa (40%; 2/5); granuloma parasitário (20%; 1/5); degeneração macro vacuolar da camada muscular (20%; 1/5).
- Fígado: degeneração macro vacuolar dos hepatócitos (80%; 4/5); congestão e hiperplasia fibroblástica do endotélio hepático (40%; 2/5); hemossiderina impregnada no parênquima (40%; 2/5); discreto infiltrado heterofílico (20%; 1/5); degeneração micro vacuolar dos hepatócitos (20%; 1/5).
- Baço: granuloma histiocitário crônico (20%; 1/5); degeneração macro vacuolar focal (20%; 1/5).
- Pâncreas: degeneração macro vacuolar (60%; 3/5), edema discreto com parasita (cestódeo) encistado (20%; 1/5); granuloma histiocitário crônico (20%; 1/5).
- Intestino: edema de submucosa intestinal (60%; 3/5); hipertrofia da camada muscular (60%; 3/5); infiltração linfocitária (20%; 1/5); degeneração macro vacuolar (20% 1/5).

- Rins: edema intersticial (60%; 3/5); degeneração macro vacuolar (20%; 1/5).
- Musculatura: cistos de parasitas na musculatura (20%; 1/5).

Tabela 17. Achados histopatológicos dos animais do Grupo 1. São Paulo, 2018.

	Cdt 4	Cdt 9	Cdt 10	Cdt 11	Cdt 29
Coração	n.d.n.	n.d.n.	Infiltração heterofílica; Granuloma histiocitário; Granuloma crônico na face externa do miocárdio.	n.d.n.	n.d.n.
Tireoide	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.
Pulmão e saco aéreo	Congestão intersticial.	Edema; Espessamento de serosa; Granuloma heterofílico crônico; Infiltração heterofílica.		Congestão intersticial.	Edema discreto;
Estômago	Hiperplasia e hipertrofia de camada muscular.	Edema de submucosa; Granuloma parasitário.		n.d.n.	Edema de submucosa; Hiperplasia e hipertrofia de camada muscular; Degeneração macro vacuolar das fibras musculares
Fígado	Degeneração macro vacuolar; Congestão; Hiperplasia fibroblástica endotelial.	Degeneração macro vacuolar; Presença de hemossiderina; Discreto infiltrado heterofílico; Hiperplasia fibroblástica endotelial.		Degeneração macro vacuolar.	Degeneração micro e macro vacuolar; Hemossiderina; Congestão.
Baço	Granuloma histiocitário crônico.	Não visualizado na necropsia.		n.d.n.	Degeneração macro vacuolar focal;
Pâncreas	Granuloma histiocitário crônico.	Degeneração macro vacuolar; Edema discreto; Cestoide encistado (?).		Degeneração macro vacuolar.	Degeneração macro vacuolar focal;

Intestinos	Edema de submucosa.	Infiltração linfocitária; Hipertrofia de camada muscular; Edema de submucosa.	Degeneração macro vacuolar; Hipertrofia de camada muscular.	Hipertrofia de camada muscular; Edema de submucosa.
Gônadas	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.
Rins	Edema intersticial; Degeneração macro vacuolar.	Edema intersticial; Edema de parênquima.	n.d.n.	n.d.n.
Musculatura	n.d.n.	n.d.n.	Parasitas encistados.	n.d.n.

n.d.n. (nada digno de nota).

5.5.2.2. Avaliação histopatológica do Grupo 2

Foram verificadas as seguintes alterações histopatológicas nos animais do Grupo 2 (Tabela 18) (% de animais afetados; nºanimais afetados/nº total de animais no grupo):

- Coração: hipertrofia do miocárdio (34%; 2/6); degeneração macro vacuolar (34%; 2/6); edema focal do miocárdio com parasita encistado (Figura 3 e 4) (17%; 1/6); dilatação dos capilares (17%; 1/6).
- Pulmão: granuloma crônico (17%; 1/6); infiltração exsudativa pulmonar (34%; 2/6); congestão pulmonar (34%; 2/6); parasitas no parênquima (Figura 2 e 3) (34%; 2/6); edema intersticial (Figura 3) (51%; 3/6); espessamento de endotélio vascular (Figura 4) (17%; 1/6); granuloma parasitário na serosa (Figura 4) (17%; 1/6); infiltração heterofílica discreta (17%; 1/5); edema de submucosa e muscular com hemorragia nos favéolos (17%; 1/5).
- Estômago: edema de submucosa (Figura 2) (85%; 5/6); granuloma parasitário (Figura 2) (17%; 1/6); edema de lâmina própria (17%; 1/6); granuloma parasitário (51%; 3/6); granuloma heterofílico em submucosa e serosa (Figura 3) (17%; 1/6); infiltração heterofílica na mucosa (34%; 2/6), hemorragia (17%; 1/6); granuloma histiocitário na mucosa (34%; 2/6), (1/6).
- Fígado: degeneração macrovacuolar (100%; 6/6), parasita encistado na cápsula (Figura 2 e 3) (51%; 3/6); infiltração heterofílica (34%; 2/6); deposição de hemossiderina no parênquima (51%; 3/6); hemorragia intersticial focal (17%; 1/6); hiperplasia fibroblástica endotelial (17%; 1/6); granuloma histiocitário (51%; 3/6); granuloma parasitário (17%; 1/6); cápsula espessada (Figura 2) (34%; 2/6); necrose focal (17%; 1/6).

- Baço: granuloma heterofílico (17%; 1/6); degeneração macrovacuolar (34%; 2/6); infiltração heterofílica e congestão esplênica (17%; 1/6).
- Pâncreas: degeneração macro vacuolar (68%; 4/6); congestão (17%; 1/6); infiltração heterofílica (34%; 2/6); infiltração de tecido adiposo (17%; 1/6); granuloma histiocitário (17%; 1/6); hemorragia intersticial focal e granuloma heterofílico (17%; 1/6).
- Intestino: edema de submucosa (68%; 4/6); infiltração linfocitária (17%; 1/6); granuloma histiocitário (17%; 1/6); congestão, hemorragia e infiltração heterofílica (17%; 1/6); mucosa com infiltração heterofílica (17%; 1/6); edema da camada muscular com parasito encistado (Figura 2) (17%; 1/6); hiperplasia focal de lâmina própria (17%; 1/6); edema discreto e focal de submucosa com infiltração heterofílica (17%; 1/6).
- Testículos: parasitos na serosa do testículo, edema de parênquima e infiltração heterofílica no ducto deferente (17%; 1/6).
- Rins: degeneração macrovacuolar (100%; 6/6); granuloma histiocitário (17%; 1/6); parasitas encistados na cápsula (17%; 1/6); granuloma histiocitário (17%; 1/6); edema de parênquima (34%; 2/6); necrose focal de parênquima renal (17%; 1/6).
- Musculatura: granuloma parasitário e parasitas encistados na musculatura (34%; 2/6).

Tabela 18. Achados histopatológicos dos animais do Grupo 2. São Paulo, 2018.

	Cdt 2	Cdt 7	Cdt 12	Cdt 16	Cdt 30	Cdt 32
Coração	n.d.n.	Hipertrofia de miocárdio.	Hipertrofia de miocárdio.	n.d.n.	Degeneração macro vacuolar; Edema focal do miocárdio.	Degeneração macro vacuolar; Dilatação dos capilares do miocárdio.
Tireoide	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.
Pulmão e saco aéreo	Granuloma crônico; Infiltração heterofílica (pneumonia exsudativa).	Congestão; Parasita encistado no parênquima; Edema intersticial; Espessamento de endotélio vascular.	Infiltração heterofílica (pneumonia exsudativa).	Granuloma parasitário na serosa; Edema pulmonar; Parasita no parênquima.	Congestão; Infiltração heterofílica discreta; Edema intersticial.	Edema intersticial; Presença de secreção hemorrágica nos favéolos; Edema de submucosa e muscular.
Estômago	Edema de submucosa; Granuloma parasitário.	Edema de submucosa e lâmina própria; Granuloma parasitário; Granuloma heterofílico em submucosa e serosa.	Edema de submucosa, infiltração heterofílica na mucosa; Hemorragia; Granuloma histiocitário.	Edema de submucosa; Granuloma histiocitário; Granuloma parasitário.	Edema de submucosa.	Granuloma parasitário; Infiltração heterofílica na mucosa.
Fígado	Degeneração macro vacuolar.	Parasita na cápsula hepática; Infiltração heterofílica; Degeneração macro vacuolar; Deposição de hemossiderina; Hemorragia intersticial focal; Hiperplasia fibroblástica endotelial.	Degeneração macro vacuolar; Granuloma histiocitário.	Granuloma parasitário; Parasita na cápsula hepática; Cápsula espessada; Hemossiderina; Degeneração macro vacuolar.	Granuloma histiocitário; Necrose; Degeneração macro vacuolar; Infiltração heterofílica; Cápsula espessada com parasitas encistados.	Granuloma histiocitário; Degeneração macro vacuolar; Deposição de hemossiderina.
Baço	Não visualizado na necropsia.	Granuloma heterofílico.	n.d.n.	Degeneração macro vacuolar.	Infiltração heterofílica; Congestão; Degeneração macro vacuolar.	Degeneração macro vacuolar.
Continuação						
Pâncreas	Degeneração macro vacuolar; Congestão.	Hemorragia intersticial focal; Granuloma heterofílico.	n.d.n.	Infiltração heterofílica; Infiltração de tecido adiposo; Degeneração macro vacuolar.	Degeneração macro vacuolar.	Degeneração macro vacuolar; Infiltração heterofílica; Granuloma histiocitário.
Intestinos	Infiltração linfocitária; Edema de submucosa.	Edema de submucosa; Granuloma histiocitário.	Edema de submucosa; Serosa congesta e hemorrágica; Infiltração heterofílica.		Mucosa com infiltração heterofílica; Edema em região muscular; Hiperplasia focal de lâmina própria;	Edema de submucosa.

					Edema discreto e focal de submucosa com infiltração heterofílica.	
Gônadas	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.		n.d.n.	Presença de parasita em serosa; Edema de parênquima; Infiltração heterofílica em ducto deferente.
Rins	Degeneração macro vacuolar.	Degeneração macro vacuolar; Granuloma histiocitário.	Degeneração macro vacuolar.	Parasita encistado na cápsula; Granuloma histiocitário; Degeneração macro vacuolar.	Edema de parênquima; Degeneração macro vacuolar.	Degeneração macro vacuolar; Necrose focal; Edema de parênquima.
Musculatura	n.d.n.	Musculatura com granuloma parasitário; Parasitas encistados.	n.d.n.	n.d.n.	n.d.n.	Musculatura com granuloma parasitário; Parasitas encistados.

n.d.n. (nada digno de nota).

Figura 3 - A: Fígado, note cápsula espessada com parasito encistado (seta); (aumento 10x). B: Estômago, edema de camada muscular e presença de parasito encistado (seta); (aumento 4x). C: Parênquima pulmonar contendo dois parasitos encistados (seta); (aumento 10x). D: Intestino, note parasito encistado na camada muscular (seta); (aumento 4x).

Figura 4- A: Coração, infiltração heterofílica e espessamento de pericárdio com parasito encistado (seta); (aumento 4x). B: Fígado, parasito em cápsula e parênquima hepático; (aumento 4x). C: Estômago, inflamação granulomatosa contendo parasitos; (aumento 4x). D: Parênquima pulmonar, note edema e parasito encistado em serosa (seta); (aumento 4x).

Figura 5- A: Parênquima pulmonar, note vaso com endotélio espessado ao lado de dois parasitos (seta); (aumento 4x). B: Coração, note dois parasitos encistados no pericárdio.

5.4. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS PARASITAS

Na visualização dos fragmentos amplificados em gel de agarose observamos dois tamanhos de fragmentos dentro do esperado e ambos foram sequenciados (Figura 5).

Figura 6- Gel de agarose com amplificação de região espaçadora (ITS1) de nematódeos dos animais do estudo, colheita do Grupo 2. Lanes 1-15, note fragmentos 2, 4 e 10 maiores e o restante do mesmo tamanho (100bp ladder, banda mais forte equivale a 600pb).

As sequencias de ITS1 obtidas tem cerca de 370-580pb, sendo que a maioria foi do que chamamos de fragmento menor.

O fragmento maior gerou apenas duas sequencias anti-senso de qualidade média e não foi possível obter uma sequência consenso (em média 80% com qualidade acima de 20 + 70% acima de 30). O fragmento menor gerou seis sequencias senso e nove anti-senso de qualidade boa (algumas com 80% e 90% acima de 20 e 30), que permitiram a obtenção de uma sequência consenso (Figura 6).

É importante mencionar que os oligonucleotídeos utilizados nas PCRs não eram específicos para este grupo de parasitos e isso pode ter causado problemas no sequenciamento e dificultou a obtenção de sequencias de melhor qualidade. Além disso,

os dois tipos de sequencias apresentam áreas de repetições de CA, CG (senso) e GC, GT (antisenso) que também dificultaram o sequenciamento.

Figura 7 - Cromatograma de sequencias senso (21) e anti-senso (20) menores, note repetições de CA, GC e GC, GT e diminuição da qualidade do sequenciamento logo após.

A sequência consenso menor, com aproximadamente 454pb, teve maior similaridade com a sequência *Ophidascaris robertsi*. É importante mencionar que são poucas as sequencias para este grupo de parasitos nesta região do DNA ou de parasitos de serpentes disponíveis no Genbank. E a sequência obtida neste estudo sempre ficou agrupada com a única sequência de *Ophidascaris* disponível e separada de outros gêneros de nematódeos representados, como, por exemplo, *Raphidascaris acus* e *Rhabdias fuscovenosa* (Figura 7 e 8). Portanto, concluímos que nossa sequência provavelmente é representante do gênero e, por falta de sequencias de mais espécies e espécimens para confirmação, usaremos a identificação *Ophidascaris* sp.

Figura 8- Análise molecular filogenética com método de máxima verossimilhança.

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model [1]. The tree with the highest log likelihood (-864.5547) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 1.2710)). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 5 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 216 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [2].

Figura 9 - Análise molecular filogenética com método de máxima verossimilhança.

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model [1]. The tree with the highest log likelihood (-1296.1947) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0.8971)). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 14 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There was a total of 202 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [2].

6. DISCUSSÃO

6.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os répteis podem ser acometidos por uma variedade de parasitos, protozoários e metazoários, sendo muitas vezes difícil determinar as alterações clínicas, laboratoriais, comportamentais bem como o prognóstico desses quadros (GREINER; MADER, 1996; ALBUQUERQUE, 2007). Em animais de vida livre, os parasitos costumam estar em harmonia com seu hospedeiro (TELFORD, 1971). Quando este equilíbrio é quebrado, surge a manifestação clínica da infecção parasitária, isto é, a parasitose. Os fatores que podem causar a quebra dessa relação harmônica são o estresse de cativeiro e erros de manejo como a superpopulação, dieta inadequada e condições ambientais inadequadas.

Em resposta aos agentes estressores, o organismo lança mão de mecanismos de compensação, numa tentativa de se adaptar fisiologicamente ao estresse. Caso estes mecanismos não sejam suficientes ou falhem, o organismo pode entrar em colapso (GUILLETTE; CREE; ROONEY, 1995). Além das respostas desencadeadas pelo estresse, o organismo promove uma resposta de caráter imune para tentar compensar as ações desencadeadas pelos parasitos. Dentre elas, podemos citar as reações mediadas por células, reações imune-inespecíficas e as imune-específicas (UJVARI; MADSEN, 2006; SYKES; KLAPHAKE, 2015).

A discussão dos nossos resultados se baseia nas alterações hematológicas, bioquímicas, hormonais (corticosterona) e nas alterações anátomo-patológicas observadas intragrupo e entre os Grupos.

6.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para a realização do trabalho, utilizamos heparina como anticoagulante de escolha, pois o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) pode causar lise das células sanguíneas de répteis (HATTINGH; SMITH, 1976; MURO et al., 1998; HERNANDEZ-DIVERS, STEPHEN J.; COOPER, JOHN E.; COOKE, 2004). Diferentemente de outros autores (MADER, 2000), não observamos agregados leucocitários, nem trombocitários que comprometessem a contagem destas células para a espécie; confirmando o proposto por Albuquerque (2007) que sugere a heparina como uma ótima opção para o processamento do sangue de serpentes do gênero *Crotalus*.

A técnica da contagem simultânea de eritrócitos, leucócitos e trombócitos diluídos em solução de Natt e Herrick (1952) e leitura em câmara de Neubauer mostrou-se eficaz corroborando as pesquisas de Grego (2006) e Albuquerque (2007).

A diferenciação entre trombócitos e leucócitos por esta técnica de contagem é dificultada pelo fato das células possuírem núcleo e terem tamanhos similares. Para maior confiabilidade na contagem faz-se necessário a contagem por pessoa experiente. A adoção da coloração de May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947), mostrou-se satisfatória para a diferenciação dos diversos tipos celulares presentes nos esfregaços sanguíneos periféricos.

Os valores de CTE dos Grupos 1 e 2 mantiveram-se próximos ao longo das oito colheitas. Mesmo havendo variação intragrupo, esta foi observada simultaneamente tanto no Grupo 1, quanto no Grupo 2, corroborando trabalhos anteriores (TROIANO et al., 1997; ALBUQUERQUE, 2007), e indicando um caráter de variação sazonal neste parâmetro.

Os animais do Grupo 1 apresentaram valores de CTL mais altos do que os

observados nos valores de referência do Laboratório de Herpetologia (ALBUQUERQUE, 2007) para cascavéis de cativeiro, embora os mesmos valores médios tenham sido observados por Troiano et al. (1997) quando estudaram 180 espécimes de *C. d. terrificus*, de sexo e idades diferentes, capturadas da natureza na Argentina e mantidas em cativeiro. O Grupo 2 apresentou valores iniciais abaixo dos valores observados em outros estudos (TROIANO et al., 1997; FREITAS et al., 2003; ALBUQUERQUE, 2007) mas, ao longo do experimento, atingiram valores próximos aos do Grupo 1 e aos observados por Troiano et al. (1997). É importante levar em consideração que agentes infecciosos e o estresse podem levar a quadros iniciais de leucopenia e, posteriormente, à leucocitose (GUILLETTE; CREE; ROONEY, 1995; CAMPBELL, 1996b).

Os valores de Hb observados no Grupo 1 e 2 mantiveram-se dentro dos valores observados por Albuquerque (2007), que mensurou os parâmetros de animais saudáveis e pertencentes ao plantel do laboratório de Herpetologia do IB. Contudo, ficaram abaixo dos valores obtidos por outros autores (Freitas et al., 2003; Troiano et al., 1997) que colheram amostras sanguíneas de *C. d. terrificus* recém-chegadas ao cativeiro. Além disto, Doenças infecciosas, hemoparasitas e/ou infecções parasitárias maciças (TELFORD, 1971, 2009; JACOBSON, 2007) podem levar a quadros de anemia, com depleção de ferro, justificando valores mais baixos, como os obtidos no nosso estudo.

Embora a porcentagem dos valores de Ht em ambos os Grupos tenha sido similar aos valores observados em outros trabalhos (Troiano et al. 1997; Freitas et al., 2003; Albuquerque, 2007), os valores de VCM dos animais do Grupo 1 foram significativamente mais baixos do que os valores dos animais do Grupo 2. Segundo Heat (1983) e Mitchell (2008), a presença de endoparasitos em estômago e/ou intestino pode

diminuir a capacidade de absorção dos nutrientes, devido à destruição do epitélio e formação de granuloma parasitário, ou mesmo pela ação de fixação dos parasitos na mucosa, obstruindo o epitélio gastro-entérico e formando uma barreira que impede a absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, causando deficiências nutricionais (KIEL, 1975; WOLF et al., 2014) e anemia. Deficiências de vitamina B12 e ácido fólico podem provocar elevações nos valores de VCM, devido ao recrutamento de eritroblastos (MONTALI, 1988; GARCIA et al., 2004; CAMPBELL, 2006) que são maiores do que os eritrócitos maduros, no caso de anemias regenerativas. Estes fatores podem explicar o VCM aumentado nos animais do Grupo 2.

Os valores de HCM mensurados no Grupo 1 foram maiores em todas as colheitas do que os valores mensurados no Grupo 2. Quando comparado aos valores de referência do Laboratório de Herpetologia (Albuquerque, 2007), o Grupo 1 apresentou valores mais altos, possivelmente pelo fato dos animais em cativeiro necessitarem de menos hemoglobina do que os de natureza. Os valores encontrados nos dois Grupos estão mais próximos aos observados por Freitas et al. (2003) que também trabalharam com cascavéis recém-chegadas da natureza, sendo que o Grupo 2 ficou abaixo dos valores observados por estes autores (FREITAS et al., 2003). Os valores de HCM mais baixos nos animais parasitados do Grupo 2, podem ser justificados por um possível aumento de células jovens circulantes (eritroblastos) na circulação periférica, pois estas células possuem menos concentração corpuscular de hemoglobina quando comparadas aos eritrócitos maduros (MADER, 2000; RASKIN, 2000; PENDL, 2006).

A contagem diferencial de linfócitos, azurófilos, heterófilos íntegros e basófilos do Grupo 1 e do Grupo 2 ficaram dentro dos valores observados por Freitas et al. (2003) e Albuquerque (2007) e acima dos valores encontrados por Troiano et al. (1997). Comparando-se Grupo 1 e Grupo 2 não houve variação que pudesse ser associada aos

efeitos do parasitismo. A variação que ocorreu nos valores durante as colheitas, entre os Grupos respeitou a variação sazonal observada dentro dos valores de referência para a espécie (TROIANO et al., 1997; FREITAS et al., 2003; ALBUQUERQUE, 2007).

Em contrapartida, a contagem diferencial de heterófilos degranulados do Grupo 1 e Grupo 2 ficou acima dos valores de referência para a espécie (TROIANO et al., 1997; FREITAS et al., 2003; ALBUQUERQUE, 2007), sendo que a primeira colheita (tempo 0) ficou acima dos valores de referência, provavelmente em decorrência do estresse provocado pela captura das serpentes (XUEREBO et al., 2012). Possivelmente, os animais imunodeprimidos sofreram uma quebra no equilíbrio parasito-hospedeiro, suficiente para iniciar uma resposta celular e consequente degranulação heterofílica (BOUNOUS et al., 1996; ALLEMAN; JACOBSON; RASKIN, 1999; UJVARI; MADSEN, 2006). A heterofilia é um achado comum na leitura de esfregaços sanguíneos de serpentes com infecções/inflamações agudas (CAMPBELL, 2006; XUEREBO et al., 2012). Na segunda colheita de sangue, os valores de heterófilos degranulados do Grupo 1 estavam mais baixos em relação à colheita no tempo 0, fato este que pode ter sido ocasionado pelo tratamento antiparasitário. Já os animais do grupo 2, mesmo tendo sido mantidos nas mesmas condições de temperatura, umidade e alimentação do Grupo 1, apresentaram um aumento no valor dos heterófilos degranulados na segunda colheita. A partir da terceira colheita de sangue os animais do Grupo 1 apresentaram valores normais de heterófilos degranulados, enquanto os animais do Grupo 2 permaneceram com os valores acima dos parâmetros normais, tanto na terceira, como na quarta colheitas. Somente a partir da quinta colheita, os valores voltaram ao normal (TROIANO et al., 1997; FREITAS et al., 2003; ALBUQUERQUE, 2007), possivelmente com a adaptação das serpentes do Grupo 2 às condições de cativeiro. Podemos sugerir que os animais parasitados demoraram mais a se adaptar às novas condições de cativeiro do que as serpentes tratadas.

6.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

No Grupo 1, os valores de AU apresentaram-se dentro dos valores de referência encontrados por Albuquerque (2007) que mensurou os parâmetros bioquímicos de cinco espécies de *Bothrops* e duas sub-espécies de *Crotalus durissus* do Laboratório de Herpetologia. Os valores encontrados também estão de acordo com os resultados obtidos por Kolesnikovas et al. (2001) que mensuraram os valores bioquímicos de *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro e por Allender et al. (2006) que mensuraram os parâmetros bioquímicos do plasma de *Sistrurus catenatus catenatus*. No entanto, quando comparamos os valores de AU com os resultados obtidos por Troiano et al. (2001) e Silva et al. (2010), os valores do Grupo 1 foram relativamente mais altos. No Grupo 2, observamos níveis séricos de AU abaixo dos observados por Kolesnikovas et al. (2001), Allender et al. (2006), Albuquerque (2007) e Silva et al. (2010) em cinco das oito colheitas (na quarta, quinta, sexta, sétima e oitava). Quadros hipouricemicos não apresentam manifestações clínicas nos répteis, mas podem estar associados a doenças hepáticas ou renais (JACOBSON, 1984; FRYE, 1991).

Os valores séricos de albumina mensurados para o Grupo 1 e Grupo 2 estavam pouco abaixo dos valores mínimos encontrados por Kolesnikovas et al. (2001), Allender et al. (2006), Albuquerque (2007) e Silva et al. (2010) e muito abaixo dos valores observados por Troiano et al. (2001). Uma possível explicação para os valores relativamente baixos (hipoalbuminemia), poderia ser a presença de endoparasitos como *Ophidascaris* sp, causando gastroenterites; espessamento da parede do estômago e intestinos; hiperemia e hemorragia de mucosa (ARAUJO et al., 1999). A hemorragia associada ao processo inflamatório pode induzir hipoalbuminemia e edema por perda da pressão oncótica (TELFORD, 1971) e ainda agravar quadros diarreicos, favorecendo infecções sistêmicas. É importante ressaltar que o valor de albumina não deve ser avaliado

isoladamente, sem fazer associação com o valor de proteínas plasmáticas totais e suas demais frações (CAMPBELL, 2006; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

De acordo com Campbell (2006), o valor de proteína plasmática total para répteis em geral é de 3 a 8 mg/dL. Os valores obtidos tanto no Grupo 1, quanto no Grupo 2, giraram em torno do limite inferior do proposto por este autor, mas corroboraram o descrito por Kolesnikovas et al. (2001), Troiano et al. (2001), Allender et al. (2006), Albuquerque (2007) e Silva et al. (2010). A hipoproteïnemia em répteis está relacionada à má nutrição, má absorção, às enteropatias e às doenças renais crônicas e hepáticas (ALMOSNY & MONTEIRO, 2007) que podem ser agravados quando há presença de parasitos.

Para os valores de ALT, ambos os Grupos tiveram valores mais altos do que os observados em outros trabalhos (KOLESNIKOVAS, C.K.M., CATÃO-DIAS, J.L., ALBUQUERQUE, L.C.R., GREGO, 2001; TROIANO et al., 2001; ALBUQUERQUE, 2007; SILVA et al., 2010). Considerando os valores elevados observados no presente estudo, sugere-se que as serpentes estivessem com algum grau de lesão hepática crônica e/ou esteatose hepática (CAMPBELL, 1996b). Essas lesões poderiam ser justificadas nas serpentes do Grupo 1 à alimentação constante, ganho de peso e aos hábitos sedentários dos animais (CAMPBELL, 1996b; ARGÁEZ; COLLI, 2006), ao passo que no Grupo 2, as lesões poderiam ser reflexo da migração de larvas de parasitas, provocando lesões e necrose nos tecidos (DIAS et al., 2004; PINTO et al., 2010), visto que no exame necroscópico destes animais foram observados cistos parasitários, larvas aderidas à cápsula renal e entremeadas ao parênquima hepático.

Da mesma forma, os valores séricos de AST observados nos Grupos 1 e 2 foram mais altos do que os valores de referência relatados por outros autores

(KOLESNIKOVAS et al., 2001; TROIANO et al., 2001; ALBUQUERQUE, 2007; SILVA et al., 2010). A enzima AST está presente nas células hepáticas e no tecido muscular (estriado cardíaco e esquelético) de modo que lesões hepáticas, como esteatose hepática e migração de parasitos, podem elevar os seus níveis, assim como as lesões cardíacas e musculares também elevam os níveis de AST. Sendo assim, é possível que as repetidas contenções físicas também tenham provocado lesões musculares, aumentando os valores séricos da AST (CAMPBELL, 1996b; DIVERS, 2000; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007). É importante salientar que lesões hepáticas crônicas, provocam elevação nos valores de AST que podem permanecer elevados por até dois meses (CAMPBELL, 1996b).

Os níveis séricos de Ca de ambos os Grupos permaneceram dentro dos valores observados por Kolesnikovas et al. (2001), Allender et al. (2006), Albuquerque (2007) e Silva et al. (2010), apenas Troiano et al. (2001) demonstraram valores de cálcio abaixo do que observamos no estudo.

As concentrações séricas de fósforo observadas em ambos os Grupos encontravam-se dentro dos valores de referência descritos por Troiano et al. (2001), Kolesnikovas et al. (2001), Allender et al. (2006), Albuquerque (2007) e Silva et al. (2010). O Cálcio e o fósforo são minerais que atuam em diversas funções fisiológicas e a determinação de sua concentração plasmática é importante no diagnóstico de várias doenças (DIVERS, 2000). Para Mitchell (2009), a função renal pode ser melhor avaliada através da relação de proporção com a dosagem de cálcio e fósforo que, nas serpentes saudáveis, é de aproximadamente 1,5:1 a 2:1, sendo que em animais com problemas renais essa relação tende a diminuir. A relação Ca:P das serpentes do nosso estudo era maior do que um, não sendo sugestivo de doença renal.

Os valores de CK-NAC dos Grupo 1 e 2 aumentaram entre as diferentes colheitas, no entanto as serpentes do Grupo 2 demonstraram valores sempre maiores desde a primeira colheita. Os valores obtidos em nossa pesquisa foram mais altos do que os valores encontrados por Allender et al. (2006) e por Albuquerque (2007), ao passo que os valores demonstrados por Kolesnikovas et al. (2001) são similares aos valores obtidos na presente pesquisa. Valores elevados podem estar associados a lesões musculares e podem ter relação com o momento da contenção física dos animais ou à ação de agentes que provoquem lesões à musculatura, como larvas de parasitos migrando pelos tecidos musculares e, eventualmente, formando cistos que podem causar lesões que justifiquem os valores elevados dessa enzima (DIAS et al., 2004; PINTO et al., 2010; MELLO, 2013).

Os valores mensurados de colesterol nos animais do Grupo 1 e no Grupo 2 mantiveram-se dentro dos valores anteriormente observados por Albuquerque (2007) e Silva et al. (2010) e, em algumas colheitas, os valores se elevaram acima dos limites máximos observados, principalmente entre os meses de junho a agosto, coincidindo com a época de vitelogênese secundária e comportamento reprodutivo desta espécie. Isso pode ser justificado pela associação dos níveis de colesterol com vitelogênese secundária (CAMPBELL, 1996b; ALBUQUERQUE, 2007).

Os valores de creatinina dos Grupos 1 e 2 foram maiores do que os valores observados por Troiano et al. (2001), Kolesnikovas et al. (2001), por Albuquerque (2007) e por Silva et al. (2010). A creatinina é um marcador de função renal que pode estar aumentado em situações de insuficiência renal, rabdomiólise e desidratação (CAMPBELL, 1996b). Seria esperado um aumento inicial da creatinina nos animais de ambos os Grupos, devido ao estresse sofrido pela captura e à falta de acesso à água até o momento da soltura no Laboratório de Herpetologia. Posteriormente, porém, deveria ser observada uma redução nos valores à medida que houvesse a adaptação dos animais ao

cativeiro, como ocorreu em ambos os Grupos. É interessante ressaltar, contudo, que o Grupo 1 adaptou-se primeiro às novas condições, apresentando valores menores desde a segunda colheita.

Os valores de fosfatase alcalina dos Grupo 1 e 2 foram similares e apresentaram valores maiores que aqueles observados por Albuquerque (2007) e por Silva et al. (2010), mas dentro dos limites observados por Kolesnikovas et al. (2001). A fosfatase alcalina é encontrada em tecidos como o fígado, ossos, rins, intestinos e gônadas (CAMPBELL, 1996b) e seus valores séricos aumentam quando há lesão hepática. Pode-se justificar a elevação dos valores em ambos os grupos devido às ações dos parasitas anteriormente ao tratamento (Grupo 1) e ao longo do experimento no Grupo 2.

Os valores de glicose dos Grupos 1 e 2 foram similares aqueles obtidos por Troiano et al. (2001), Kolesnikovas et al. (2001), Allender et al. (2006), Albuquerque (2007) e Silva et al. (2010).

6.4. CONDIÇÕES GERAIS DOS ANIMAIS

A manutenção dos animais dos dois Grupos foi realizada na mesma sala no Laboratório de Herpetologia. Todos os animais estavam sob as mesmas condições de temperatura e umidade e sob a mesma influencia de agentes estressores externos. A inspeção dos animais era realizada diariamente.

Os animais do Grupo 1 ganharam peso ao longo do período de experimento e mostraram-se estáveis. Uma serpente foi a óbito antes do final do projeto e sua carcaça foi encontrada em estado de autólise, por este motivo não foi possível determinar a sua *causa mortis*.

Os animais do Grupo 2 se comportaram inicialmente da mesma forma que os

animais do Grupo 1, mas como não tinham sido tratados com antiparasitários, apresentaram altas taxas de ovos por grama de fezes (OPG) por todo o período do experimento, permitindo-nos acreditar que se encontravam em parasitose. Estes animais começaram a perder peso, provavelmente pela ação espoliativa dos parasitos e consequente inflamação/infecção do trato gastro-intestinal (SIQUEIRA et al., 2009; RATAJ et al., 2011; DAVIS; BEANE; FLOWERS, 2016). Quatro animais deste grupo apresentavam regurgito pós-prandial em até 24 horas após a alimentação, provavelmente pela inflamação da mucosa gástrica e/ou presença de granulomas parasitários que provocavam a obstrução mecânica, bloqueando a passagem do esôfago para o estômago. Segundo Jacobson (2007) *Ophidascaris* sp é geralmente encontrado dentro do estômago, onde muitas vezes se insere profundamente na submucosa, podendo ser visto projetando-se a partir de uma única lesão ulcerativa focal (SIQUEIRA et al., 2005, 2009; PINTO et al., 2010). Três animais do Grupo 2 pararam de se alimentar por 3 meses consecutivos e tiveram que receber alimentação forçada com roedores pré-abatidos, lubrificados com polivitamínico líquido. Anorexia, regurgito pós-prandial, obstrução gástrica e desnutrição estão associados aos quadros clássicos de parasitose por ascarídeos (WILSON; CARPENTER, 1996; JACOBSON, 2007).

6.5. ANÁLISE DA RELAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CORTICOSTERONA ENTRE OS GRUPO 1 E 2

Para as avaliações das concentrações plasmáticas de corticosterona basal, as colheitas foram realizadas conforme proposto por Grego (2006). Para garantir a dosagem da corticosterona basal, o sangue precisava ser colhido em menos de 3 minutos, contando a partir do momento em que a gaiola da serpente era aberta. Esse detalhe é importante,

pois os níveis plasmáticos de corticosterona se elevam rapidamente, devido a resposta frente ao estímulo estressante que é desencadeado pela contenção física (GREGO, 2006).

O presente trabalho comparou os níveis de corticosterona plasmática basal de dois grupos de *C. d. terrificus* ao longo de 12 meses de experimento, expostos às mesmas rotinas, ao mesmo manejo e às mesmas condições de temperatura e umidade, diferenciados apenas pelo tratamento antiparasitário (Grupo 1) e ausência de tratamento antiparasitário (Grupo 2).

Foi possível observar que em ambos os Grupos os níveis basais de corticosterona de *Crotalus durissus terrificus* foram mais baixos, quando comparados aos valores séricos basais de corticosterona de *Bothrops jararaca* avaliados por Grego (2006), mas dentro da faixa encontrada por Carvalho et al. (2018) em *C. d. terrificus* recém-chegadas da natureza após 5 e 60 dias em cativeiro (113,2 ng/mL e 115 ng/mL, respectivamente), utilizando o mesmo kit comercial DetectX[®] CORTICOSTERONE Enzyme Immunoassay. Outros valores de referência apontam níveis séricos de corticosterona para *Thamnophis sirtalis parietalis* variando entre 10 a 140 ng/mL (concentração sérica basal e após contenção física, respectivamente) (MOORE et al., 2001) e para *Boiga irregularis* variando de 10 a 60 ng/mL (concentração sérica basal e após contenção física, respectivamente) (MATHIES et al., 2001). Apesar dos valores de ambas as espécies citadas nesses trabalhos se aproximarem dos valores obtidos no nosso estudo para *Crotalus d. terrificus*, em que os valores variaram de 3,34 a 513,78 ng/mL, é importante ressaltar que em nosso trabalho a corticosterona foi dosada a partir do plasma, com kits de imunoensaio, diferentemente dos autores anteriores que utilizaram a corticosterona sérica para realizar a dosagem através de radioimunoensaio (MOORE et al., 2001; MATHIES et al., 2001).

Quando os valores médios plasmáticos das concentrações basais de corticosterona entre os dois grupos do estudo foram confrontadas, ficou evidente que o Grupo 2 apresentou valores mais altos que os demonstrados no Grupo 1. Segundo Xuereb et al. (2012) a performance reprodutiva e o escore corporal de *Pantherophis gloydi* foram afetados pela condição de parasitismo e se reflete em uma relação heterófilos/linfócitos mais alta, o que, segundo a autora, é um marcador indireto de estresse. Campbell & Ellis (2007) afirmaram que os linfócitos estão envolvidos nas respostas imunes e seu número diminui em resposta ao estresse crônico e à desnutrição, corroborando a afirmação de Xuereb et al. (2012). Contudo, em nosso estudo não foi observada esta elevação na relação de heterófilos/linfócitos dos animais parasitados e com níveis mais altos de corticosterona plasmática, corroborando o trabalho de Carvalho (2018), trabalhando com espécies *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus* e *Boa constrictor*.

Animais parasitados tem desenvolvimento retardado, menor capacidade de subjugar suas presas e tornam-se parceiros desinteressantes na época de reprodução (BAKER, 2007). Ainda, segundo Mader (1996), animais em cativeiro, estressados e com alta carga parasitária, são muito mais susceptíveis a sucumbir de infecções do que um animal na natureza. Animais parasitados apresentam pequena expectativa de vida, são mais susceptíveis às enfermidades em geral e apresentam uma aparência doentia. Em cativeiro, a manutenção de animais parasitados torna-se um risco, devido à disseminação dos parasitos a outros animais do plantel, principalmente nos casos em que os parasitos possuam ciclo direto de transmissão. Além disto, a imunossupressão causada pelos parasitos, por si só pode aumentar as chances das serpentes contraírem infecções. Os efeitos do estresse, também causam prejuízo na performance dos animais no período de reprodução, Grego et al. (2006) observaram que os valores de corticosterona são inversamente proporcionais aos valores dos hormônios sexuais (testosterona e

estrogênio). A manutenção dos animais em que não são realizados os tratamentos profiláticos é mais trabalhosa e onerosa, devido às intervenções que, por ventura precisam ser feitas nestes animais (BAKER, 2007; RATAJ et al., 2011), além da morbidade e mortalidade ser maior. A proposta de um biotério de manutenção é a de manter os animais nas melhores condições possíveis, hígidos, saudáveis, com uma boa qualidade de vida e em plenas condições reprodutivas, deste modo a medicina preventiva e profilática deve ser muito bem estabelecida e empregada rotineiramente, tanto em animais recém-chegados ao plantel, como para aqueles que já estão na linha de produção.

Por estes motivos, consideramos seguro afirmar que animais parasitados são mais estressados, susceptíveis a infecções oportunistas, se alimentam precariamente, perdem peso mais facilmente e possuem níveis basais de corticosterona mais altos do que os animais não parasitados, expostos às mesmas condições ambientais.

6.6. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES ANATOMO-PATOLÓGICAS

Ambos os Grupos apresentaram alterações anatomo-patológicas pertinentes ao estudo. É importante ressaltar que isto se deve ao fato de que todos os animais eram parasitados inicialmente e as lesões poderiam pré-existir antes do início do estudo.

A técnica escolhida para a eutanásia, através de anóxia em ambiente saturado com gás dióxido de carbono (CO₂), ainda que tenha sido segura e eficiente para este propósito pode ter provocado algumas alterações observadas no momento da necropsia.

Os animais do Grupo 1 apresentaram escore corporal semelhante aos animais mantidos no cativeiro do Laboratório de Herpetologia; todos apresentaram ganho de peso quando comparados ao seu peso inicial e todos tiveram as suas medidas de CRC-CT aumentadas. Embora os animais do Grupo 2 não tivessem recebido tratamento

antiparasitário, apenas uma serpente se apresentava em estado de caquexia, enquanto as demais apresentaram escore de bom a regular, apesar de terem perdido peso em relação ao seu peso inicial.

A exposição ao dióxido de carbono provoca vasodilatação, hiperventilação, hemorragia por alteração da permeabilidade vascular e congestão (BELKIN, 1963; MOSLEY, 2006). Os achados de Belkin (1964) e Mosley (2006) podem justificar os quadros de congestão e ingurgitamento venoso observado nos animais do Grupo 1 e mucosa oral hipocorada foi observada no Grupo 2, corroborando os achados de Araújo et al. (1990) e Siqueira et al. (2009).

Os animais do Grupo 1 apresentaram congestão cardíaca, provavelmente devido ao uso do dióxido de carbono. As serpentes do Grupo 2 apresentaram hidropericárdio que pode ter sido provocado devido a falha da pressão oncótica provocada pela hipoalbuminemia apresentada pelos animais parasitados. Nos dois grupos foram observados espessamento de cápsula hepática. Siqueira et al. (2009) e Mello (2013), associaram o espessamento da cápsula hepática à migração de larvas de *Ophidascaris* sp pelo fígado (SIQUEIRA et al., 2009; MELLO, 2013). Também no Grupo 2 foi observado que a consistência do fígado era friável em todos os animais e esta observação também foi relatada por Siqueira et al. (2009). Campbell (2006) associou esta apresentação friável a uma resposta inflamatória e/ou infecciosa, mas é comumente associada à infiltração gordurosa, esteatose e lipidose hepática (CAMPBELL, 2006; ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, 2007).

Pinto et al. (2010) encontraram cerca de 80% de parasitismo por ascarídeos em *Crotalus durissus* no Brasil e as alterações patológicas associadas ao parasitismo foram inflamação granulomatosa, espessamento da parede do órgão, gastroenterite com necrose

e ulceração (WILSON; CARPENTER, 1996; KOLESNIKOVAS, 1997; ANDERSON, 2000; MELLO, 2013). Os mesmos achados de necropsia foram encontrados nas serpentes do Grupo 2, em que cinco serpentes (71,43%) apresentaram granuloma parasitário, sete serpentes (100%) apresentaram espessamento de esôfago, estômago ou intestino e parasitos adultos foram encontrados no trato digestório. No grupo 1 apenas um serpente apresentou granuloma parasitário, em nenhuma foi encontrado parasito vivo no sistema digestório e uma serpente apresentava espessamento de alças intestinais associado à secreção catarral. Um animal do Grupo 1 e um animal do grupo 2 apresentaram larvas no parênquima de outros tecidos como fígado, coração e pulmão, corroborando o observado por Benson (1999) e Mello (2013) que também observaram larvas de *Ophidascaris* sp migrando pelos tecidos das serpentes estudadas. Quando as serpentes ingerem os hospedeiros intermediários (roedores ou anfíbios) com larvas L2 encistadas na musculatura ou vísceras, no hospedeiro definitivo, estas larvas perfuram o intestino e migram para o pulmão, onde ocorrerá a muda para L3 que, juntamente com a secreção brônquica, é deglutida. No estômago ocorrerá a muda para L4 e, posteriormente, para L5 (adultos) que penetrarão na mucosa do tecido e liberarão ovos no lúmen do trato gastrointestinal do hospedeiro que serão expelidos juntos às fezes (WILSON; CARPENTER, 1996).

No Grupo 2 foram observados congestão pulmonar que pode ter ocorrido também devido à ação do dióxido de carbono, contudo a maioria das serpentes do Grupo 2 apresentaram tecidos hipocorados (pulmão, baço e pâncreas), também observados por Siqueira et al. (2009), Wilson & Carpenter (1996) e Pinto et al. (2010). Todos os autores associaram estes achados à um quadro anêmico que poderia ser justificado pelo sinais clínicos de anorexia, regurgitação, obstrução intestinal e desnutrição característicos em infecções por *Ophidascaris* sp (WILSON; CARPENTER, 1996; JACOBSON, 2007).

No Grupo 1 todos os animais apresentaram, na sua maioria, boa quantidade de gordura celomática, diferentemente do observado no Grupo 2 em que a maioria apresentou quantidade regular de gordura. Esse maior consumo das reservas de gordura podem ser um reflexo também dos achados clínicos citados no parágrafo anterior.

O Grupo 1 não apresentou nenhuma alteração importante no sistema musculoesquelético, no sistema respiratório, no sistema gênito urinário, no sistema excretor e órgãos anexos (baço e pâncreas). Em contrapartida, no Grupo 2, a maioria dos animais apresentou sacos aéreos espessados, caracterizado como uma resposta inflamatória em à penetração das larvas no pulmão (Mello, 2013). Em dois animais (28,57%) foram observados cistos na musculature esquelética que podem ocorrer devido à ingestão direta de ovos larvados (contaminação fecal-oral). Neste caso, as larvas permanecem encistadas fora do tubo digestório, como se a serpente fosse o hospedeiro intermediário (GREGO; GARDINER; CATÃO-DIAS, 2004).

6.7. ANÁLISE DA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Pinto et al. (2010) encontrou, aproximadamente, 80,0% de parasitismo por ascarídeos em *Crotalus durissus* no Brasil. Destes 80,0%, o gênero *Ophidascaris* foi o mais comum (50,0%), seguido por *Hexametra* (30,0%) e *Travassosascaris* (20,0%). Dias et al. (2004), encontraram em cascavéis uma prevalência de 25,0% de *Ophidascaris*, 16,6% de *Ascaridia*, 8,3% de *Hexametra* e 8,3% de *Travassosascaris*. Teixeira (2000) encontrou 37,3% de parasitismo em serpentes *C. durissus*, sendo que dentre as serpentes parasitadas, *O. trichuriformis* foi o nematódeo mais prevalente (47,06%). Mattos Jr. et al. (2004) encontraram 35,7% de parasitismo por *Ophidascaris travassoi* também em *Bothrops jararaca* e Siqueira et al. (2005) descreveu *Ophidascaris tuberculatum* parasitando *Bothrops jarara* com uma prevalência de 20%, ambos no estado de Rio de Janeiro. Todos

os autores anteriormente citados, encontraram valores importantes para a ocorrência do gênero *Ophidascaris* parasitando serpentes da família Viperidae no Brasil, o que corrobora os achados encontrados pela presente pesquisa, onde 80% dos parasitos encontrados nas serpentes do Grupo 2 pertenciam ao gênero *Ophidascaris*. Devido à baixa qualidade dos outros 20% das amostras, não foi possível determinar qual(ais) outra(s) espécie(s) ou gênero(s) de parasito(s) estava(m) envolvido(s) na infecção do Grupo 2. É necessário ressaltar que existe pouca literatura disponível que forneça o sequenciamento genético depositado no GenBank, das espécies de parasitas encontradas em serpentes, diminuindo as chances de identificação baseadas na comparação com materiais já existentes.

No presente trabalho fica determinado uma prevalência de 80% de parasitismo por *Ophidascaris* sp em *Crotalus durissus terrificus* recém-chegadas ao cativeiro no estado de São Paulo.

Depois do apontado fica claro que à adoção de práticas de medicina preventiva é de fundamental importância para a adequada manutenção de serpentes em cativeiro. O momento da captura é muito estressante para os animais devido as necessidades de adaptação que eles deveram sofrer com a chegada ao cativeiro e muitas das serpentes acabam não resistindo, ou se resistem e não são tratadas acabam sendo prejudicadas. Animais não vermifugados apresentam maiores problemas gastro-intestinais, são mais propensos a regurgitos ou episódios de anorexia. No presente estudo, os animais não participaram de rotinas como extração de veneno, acasalamento e atividades que demandassem maior manuseio e, mesmo assim perderam peso e demonstram sinais de má adaptação. Até mesmo os animais saudáveis, por vezes não resistem a essa rotina. Por este motivo, manter os animais nas melhores condições clínicas é importante, não apenas para garantir a sobrevivência do espécimen mas garantir que animais saudáveis estejam

disponíveis para programas de reprodução em cativeiro, extração de veneno e melhor otimização do espaço limitado que um biotério esta sujeito.

7. CONCLUSÕES

- De modo geral, a metodologia utilizada foi satisfatória para a determinação do perfil hematológico, parâmetro bioquímico e avaliação plasmática de corticosterona de serpentes *Crotalus durissus terrificus* recém-chegadas da natureza.
- Foi possível comparar todos os parâmetros obtidos na pesquisa com valores de referência previamente obtidos em estudos anteriores, com valores para animais da natureza e para animais de cativeiro. Entretanto, é importante ressaltar que mais pesquisas devem ser feitas para a melhor compreensão de temas como hematologia e bioquímica das serpentes, para otimizar o poder de confronto com os dados já existentes.
- O aparelho semi-automático da Laborana® e os kits da Labtest® mostraram ser adequados para a dosagem dos parâmetros bioquímicos e de hemoglobinas de serpentes *Crotalus durissus terrificus*.
- A CTE de *Crotalus durissus terrificus* apresenta variação sazonal, conforme o observado em pesquisas anteriores para a espécie.
- A CTL de *Crotalus durissus terrificus* de natureza são mais próximas às contagens das serpentes do experimento, do que os valores obtidos de serpentes de cativeiro.
- Os valores séricos de hemoglobina são maiores em animais da natureza.
- Animais não tratados apresentam maior valor de VCM e menor valor de HCM, se comparados a animais tratados.
- Animais tratados adaptam-se mais rápido ao cativeiro do que se comparados com animais não tratados.
- Animais não tratados são mais estressados do que animais tratados.

- Animais não tratados perdem peso com mais frequência, regurgitam mais, apresentam anorexia e por consequência têm que ser assistidos na alimentação mais frequentemente do que animais tratados.
- A técnica utilizada para a eutanásia dos animais não foi a mais adequada para o experimento, pois pode ter provocado alterações observadas no momento da necropsia, confundindo os resultados.
- Animais não tratados apresentaram hidroparicárdio, inflamação granulomatosa, espessamento das paredes esofágica, gástrica e intestinal.
- *Ophidascaris* sp é um importante parasito de *Crotalus durissus terrificus*, provocando alterações nos tecidos, manifestações clínicas e potencialmente levar às serpentes a óbito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELE, L. G.; KIM, W.; FELGENHAUER, B. E. Molecular Evidence for Inclusion of the Phylum Pentastomida in the Crustacea. **Marine Biology and Evolution**, v. 6, n. 6, p. 685–691, 1989.

ALBUQUERQUE, L. C. R. **Aspectos hematológicos, bioquímicos, morfológicos e citoquímicos de células sangüíneas em Viperídeos neotropicais dos gêneros Bothrops e Crotalus mantidos em cativeiro**. 2007. Universidade de São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-31052007-143116/>>.

ALLEMAN, A. R.; JACOBSON, E. R.; RASKIN, R. E. Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). **American journal of veterinary research**, v. 60, n. 4, p. 507–14, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10211697>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

ALMEIDA, W.; GUEDES, T.; FREIRE, E.; VASCONCELLOS, A. Pentastomid infection in *Philodryas nattereri* Steindachner, 1870 and *Oxybelis aeneus* (Wagler, 1824) (Squamata: Colubridae) in a caatinga of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 193–197, fev. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842008000100028&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 6 jun. 2018.

ALMEIDA, W.; VASCONCELLOS, A.; LOPES, S.; FREIRE, E. Prevalence and intensity of pentastomid infection in two species of snakes from northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 759–763, nov. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842007000400025&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 6 jun. 2018.

ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A. O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z. S. . S.; J.C.R.; CATÃO DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de Animais Selvagens**. 1st. ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 939–966.

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission**. 2nd. ed. Guelph: CABI Publishing, 2000.

ANJOS, L. a; ALMEIDA, W. O.; VASCONCELLOS, a; FREIRE, E. M. X.; ROCHA, C. F. D. Pentastomids infecting an invader lizard, *Hemidactylus mabouia* (Gekkonidae) in northeastern Brazil. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 68, n. 3, p. 611–5, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18833483>>.

ANSAR AHMED, S.; PENHALE, W. J.; TALAL, N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. **The American journal of pathology**, v. 121, n. 3, p. 531–51, dez. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3907369>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

ARAUJO, T.; MORO, L.; LUCIA, M.; GOLLOUBEFF, B.; VASCONCELOS, A. C.

Occurrence of some endo and ectoparasites in the serpentarium of UNIFENAS - Universidade de Alfenas - MG. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 1–3, p. 19–22, 1999.

ARGÁEZ, M. a H.; COLLI, G. R. **Ecologia da cascavel (Viperidae, Crotalus durissus) no Cerrado**. 2006. Mestrado 2006.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidente crotálico. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. 2. ed. São Paulo: Savier, 1992. p. 161–167.

BAKER, D. G. Parasites of Laboratory Animals. v. 2, p. 844, 2007.

BAKER, D. G. Biology of Nematodes and Acanthocephalans. In: **Flynn's Parasites of Laboratory Animals: Second Edition**. [s.l.] Blackwell Publishing, 2008. p. 43–49.

BAKER, M. R. Synopsis of the Nematoda Parasites in Amphibians and Reptiles. **Memorial University of Newfoundland Occasional Papers in Biology**, v. 11, n. 11, p. 1–325, 1987.

BARRELLA, T. H.; DOS SANTOS, K. R.; DA SILVA, R. J. Rhabdias filicaudalis n. sp. (Nematoda: Rhabdiasidae) from the snake Spilotes pullatus (Serpentes: Colubridae) in Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 84, n. 3, p. 292–296, 2010.

BARROS, B.I.; MARTINS, M. **Hábitos alimentares de cascavéis: aspectos ecológicos e evolutivos**,. 2011. Instituto de Biociências, Curitiba, 2011.

BELKIN, D. A. Anoxia: Tolerance in reptiles. **Science**, v. 139, n. 3554, p. 492–493, 1963.

BENSON, K. G. Reptilian gastrointestinal diseases. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 8, n. 2, p. 90–97, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055937X99800413>>.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E. Network of immune-neuroendocrine interactions. **Clinical and experimental immunology**, v. 27, n. 1, p. 1–12, jan. 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/849642>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

BOUNOUS, D. I.; DOTSON, T. K.; BROOKS, R. L.; RAMSAY, E. C. Cytochemical staining and ultrastructural characteristics of peripheral blood leucocytes from the yellow rat snake (Elaphe obsoleta quadrivittata). **Comparative Haematology International**, v. 6, n. 2, p. 86–91, 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00426047>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

BRAZIL, L. V. **Vital Brazil: vida e obra 1865 - 1950**Niterói, 2001. .

BROOKINS, M. D.; WELLEHAN, J. F. X.; ROBERTS, J. F.; ALLISON, K.; CURRAN, S. S.; CHILDRESS, A. L.; GREINER, E. C. Massive Visceral Pentastomiasis Caused by *Porocephalus crotali* in a Dog. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 3, p. 460–463, 27 maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176495>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

- BRUSCA, RC; BRUSCA, G. **Invertebrates**. Massachusetts: Sunderland, 2003.
- BURSEY, C. R.; GOLDBERG, S. R.; TELFORD, S. R. *Rhabdias anolis* n. sp. (Nematoda: Rhabdiasidae) from the lizard, *Anolis frenatus* (Sauria: Polychrotidae), from Panama. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 113–117, 2003.
- CALLE, P. P.; RIVAS, J.; MUÑOZ, M.; THORBJARNARSON, J.; DIERENFELD, E. S.; HOLMSTROM, W.; BRASELTON, W. E.; KARESH, W. B. Health assessment of free-ranging Anacondas (*Eunectes murinus*) in Venezuela. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 25, n. 1, p. 53–62, 1994. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/20095334>>. Acesso em: 7 jun. 2018.
- CAMPAGNER, M. V. **Manejo de serpentes em cativeiro : manejo clínico-sanitário e avaliação da microbiota**. 2011. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2011.
- CAMPBELL, J., LAMAR, W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. 2. ed. New York: Comstock Pub. Associates, 2004. v. 119
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **Venomous Reptiles of Latin America**. 1. ed. New York: Comstock Book, 1989. v. 1
- CAMPBELL, T. W. Hemoparasites. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 1. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996a. p. 379–381.
- CAMPBELL, T. W. Clinical pathology. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 1st. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996b. p. 248–257.
- CAMPBELL, T. W. Clinical Pathology of Reptiles. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile Medicine and Surgery**. 2nd. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 453–470.
- CARVALHO. FLOW CYTOMETRIC CHARACTERIZATION OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTE POPULATIONS OF 3 NEOTROPICAL SNAKE SPECIES: *Boa constrictor*, *Bothrops jararaca*, AND *Crotalus durissus*. **VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY**, v. 45, p. 271–280, 2016.
- CASTILHO, V. L. P.; GUIZELINI, E.; TURRI, E. S.; CAMPOS, R.; AMATO NETO, V.; MOREIRA, A. A. B.; PINTO, P. L. S. Exame parasitológico quantitativo das fezes: estudo comparativo entre os métodos de McMaster, Stoll-Hausheer e Kato-Katz. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, n. 4, p. 209–212, 1984. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821984000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.
- CHABAUD, A. G. Spirurida: Camallanoidea, Dracunculoidea, Gnathostomatoidea, Physalopteroidea, Rictularoidea e Thelazioidea. In: **Keys to the nematode parasites of vertebrates**. Wallingford (UK): CAB International, 2009. p. 334–360.
- CHEN, S. H.; LIU, Q.; ZHANG, Y. N.; CHEN, J. X.; LI, H.; CHEN, Y.; STEINMANN, P.; ZHOU, X. N. Multi-host model-based identification of *Armillifer agkistrodontis* (Pentastomida), a new zoonotic parasite from China. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. 1–9, 2010.

CHILTON, N. B.; HOSTE, H.; HUNG, G. C.; BEVERIDGE, I.; GASSER, R. B. The 5.8S rDNA sequences of 18 species of bursate nematodes (order Strongylida): Comparison with rhabditid and tylenchid nematodes. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 119–124, 1997.

COBORN, J. **The atlas of snakes of the world**. 1st. ed. Neptune City: T.F.H. Publications, 1991.

COOPER, E. L.; KLEMPAU, A. E.; ZAPATA, A. G. Reptilian Immunity. In: GANS, C. (Ed.). **Biology of the Reptilia. Development A**. New York: John Wiley and Sons, 1985. 14p. 599–678.

COSTA, H. C.; BERNILS, R. S. Répteis brasileiros: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 4, n. 3, p. 75–93, 2015.

DAIMON, T.; GOTOH, Y.; UCHIDA, K. Electron microscopic and cytochemical studies of the thrombocytes of the tortoise (*Geoclemys reevesii*). **J. Anat**, v. 153, p. 185–190, 1987. Disponível em: <https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC1261792&blobtype=pdf> >. Acesso em: 6 jun. 2018.

DAVIS, E.; BEANE, J. C.; FLOWERS, J. R. Helminth Parasites of Pit Vipers from North Carolina. **Southeastern Naturalist**, v. 15, n. 4, p. 729–741, 2016.

DIAS, R. J. P.; ALMEIDA, S. J. B.; PRIETO, D. B.; LIMA, S. de S. Aspectos ecológicos dos nematóides parasitos de *Crotalus durissus terrificus* Laurenti, 1768 (Ophidia, Viperidae), em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Rev. bras. Zoociências**, v. 6, n. 2, p. 231–235, 2004.

DIVERS, S. J. Reptilian metabolic disorders. In: FUDGE, A. M. (Ed.). **Laboratory medicine - avian and exotic pets**. 1st. ed. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 210–216.

DOS SANTOS, K. R.; CARLOS, B. C.; PADUAN, K. S.; KADRI, S. M.; BARRELLA, T. H.; AMARANTE, M. R. V.; RIBOLLA, P. E. M.; DA SILVA, R. J. Morphological and molecular characterization of *Strongyloides ophidiae* (Nematoda, Strongyloididae). **Journal of Helminthology**, v. 84, n. 2, p. 136–142, 2010.

DOTSON, T. K. (University of T. K. T. .; RAMSAY, E. C.; BOUNOUS, D. I. **The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**. [s.l.] [Veterinary Learning Systems], 1995.

DURETTE-DESSET, M. C.; BEVERIDGE, I.; SPRATT, D. M. The origins and evolutionary expansion of the Strongylida (Nematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1139–1165, 1994.

DUSZYNSKI DW, UPTON SJ, C. L. **Alphabetical list of all coccidian parasites recorded from all snake hosts that are known through.**, 2008. . Disponível em: <http://biology.unm.edu/Biology/coccidia/AlphList-SnakeCocc.doc> >.

DZIDO, J.; KIJEWSKA, A.; ROKICKI, J. Selected mitochondrial genes as species markers of the Arctic *Contracaecum osculatum* complex. **Journal of Helminthology**, v. 86, n. 2, p. 252–258, 2012.

ECHEVERRIGARAY, S.; GRAZZIOTIN, G.; GRAZZIOTIN, F.; AGOSTINI, G. Random amplified polymorphisms between two South American subspecies of rattlesnakes (*Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 313–317, 2001.

FALCE, M. C. L. B. Hematologia de répteis - Revisão. p. 53, 2009.

FERNANDES, B. M. M.; SOUZA, S. V. de. Redescricao de *Acanthorhabdias* *Acanthorhabdias* Pereira, 1927. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 72, n. 3–4, p. 291–292, 1974. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0074-02761974000200011&lng=en&nrm=iso&tlng=en%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761974000200011>.

FOWLER, M. E. Zoo and Wild Animal Medicine. **The Canadian Veterinary Journal**, 1986.

FREITAS, G.; GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. R.; ZACARIOTTI, R. L. Hematological Reference Intervals of Recently-caught Free-ranging South American Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 60, p. 138, 2003.

FRYE, F. L. **Reptile care: an atlas of diseases and treatments** T.F.H. Publications, , 1991. . Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9552745>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

GÁRATE, I.; NAUPAY, A.; SUYO, B.; COLQUICHAGUA, H.; RODRIGUES, E.; YARLEQUÉ, A. Identificación de *Porocephalus stilesi* (Pentastomida) en la serpiente peruana *Lachesis muta*. **Rev Inv Vet Perú** 2007, v. 18, n. 2, p. 89–93, 2007.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. . **Manual de Hematologia Veterinária**. 2nd. ed. São Paulo: Varela, 2005.

GOATER, T. M.; GOATER, C. P. Parasites of amphibians and reptiles. (T. M. Goater, C. P. Goater, Eds.) In: Ecological monitoring and assessment network (EMAN) protocols for measuring biodiversity, Lethbridge. **Anais...** Lethbridge: Canadian Society of Zoologists, 2001. Disponível em: <papers3://publication/uuid/3B3A2BE6-8557-46DF-91E9-0C0EB68C7645>.

GOLDBERG, S. R.; BURSEY, C. R. Coelomic metazoan endoparasites of 15 colubrid and two elapid snake species from Costa Rica. **Caribbean Journal of Science**, v. 40, n. 1, p. 62–69, 2004.

GOLDBERG, S. R.; BURSEY, C. R.; GLAUDAS, X. Helminths of the Speckled Rattlesnake, *Crotalus mitchellii* (Squamata: Viperidae). **Western North American Naturalist**, v. 73, n. 4, p. 533–535, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3398/064.073.0407>>.

GOULART, C. E. S. Ordem Squamata - Subordem Sauria (Lagarto, Teiú, Iguana). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de Animais Selvagens**. 1. ed. São Paulo: Editora Roca Ltda., 2006. p. 58–67.

GREENBERG, N.; WINGFIELD, J. C. Stress and Reproduction; Reciprocal Relationships. In: JONES, D. O. N. AND R. E. (Ed.). **Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles**. New York: Plenum Press, 1987. p. 461–503.

GREENE, H. W. **Snakes: the evolution of mystery in nature**. 1. ed. Berkeley: University of California Press, 1997.

GREGO, K. F. Determinação dos níveis séricos de corticosterona e hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e da extração de veneno, em *Bothrops jararaca* (Ophidia: Viperidae). p. 129, 2006.

GREGO, K. F.; GARDINER, C. H.; CATÃO-DIAS, J. L. Comparative pathology of parasitic infections in free-ranging and captive pit vipers (*Bothrops jararaca*). **The Veterinary record**, v. 154, n. 18, p. 559–62, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144001>>.

GREINER; MADER, D. R. Parasitology. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2nd. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. p. 343–364.

GREINER, E. C. Coccidiosis in reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 12, n. 1, p. 49–56, 2003.

GUILLETTE, L. J.; CREE, A.; ROONEY, A. A. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In: WARWICK, C.; FRYE, F. L.; MURPHY, J. B. (Ed.). **Health and Welfare of Captive Reptiles**. 1st. ed. [s.l.] Springer Science Business Media, 1995. p. 32–81.

HAKIM, A. Corticosteroids and immune systems of non-mammalian vertebrates: A review. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 12, n. 3, p. 481–494, 1 jun. 1988. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0145305X88900663>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** Nucleic Acids Symposium Series, 1999. . Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>.

HATTINGH, J.; SMITH, E. M. Anticoagulants for avian and reptilian blood: Heparin and EDTA. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 363, n. 3, p. 267–269, 1976.

HAWKEY, C.M., DENNETT, T. B. Hematology of Reptiles. In: HAWKEY, C.M., DENNETT, T. B. (Ed.). **Comparative veterinary haematology**. London: Wolfe Publishing Limited, 1989. p. 259–275.

HAWKEY, C. M.; DENNETT, T. B. Color Atlas Of Comparative Veterinary Hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, n. 4, p. 108–108, dez. 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-165X.1989.tb00532.x>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

HEAT, K. Fatal parasitic anemia in a green vine snake. **Veterinary Medicine/Small Animal Clinician**, p. 1095–1096, 1983.

HEPP, D., NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. **Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS**, v. 3, n. 2, p. 114–124, 2016.

HERNANDEZ-DIVERS, STEPHEN J.; COOPER, JOHN E.; COOKE, S. W. Diagnostic techniques and sample collection in reptiles. **COMPENDIUM ON CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTISING VETERINARIAN-NORTH AMERICAN EDITION**, v. 26, n. 6, p. 470–482, 2004.

HIGASHI, I. **100 anos de Butantan**. São Paulo: Instituto Butantan, 2001.

HOGUE, A.R.; FEDERSONI, P. A. Manutenção de Serpentes em Cativeiro. In: **Biotério**. [s.l: s.n.]p. 63–73.

HOYOS ARGÁEZ, M. A.; ALMEIDA-SANTOS, D. S. M. **A cascavel neotropical *Crotalus durissus*: uma abordagem morfológica e da historia natural em populações do Brasil**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012.

JACOBSON, E. R. **Biology and Diseases of Reptiles**. Orlando: Academic Press, 1984.

JACOBSON, E. R. Parasites and parasitic diseases of reptiles. In: JACOBSON, E. . (Ed.). **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles**. 1. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2007. p. 731.

JONES, H. I.; MULDER, E. *Dracunculus mulbus* n. sp. (Nematoda: Spirurida) from the water python *Liasis fuscus* (Serpentes: Boidae) in northern Australia. **Systematic Parasitology**, v. 66, n. 3, p. 195–205, 2007.

KIEL, J. L. A review of parasites in snakes. **The Southwestern Veterinarian**, v. 28, n. 3, p. 209–220, 1975.

KOLESNIKOVAS, C.K.M., CATÃO-DIAS, J.L., ALBUQUERQUE, L.C.R., GREGO, K. F. Biochemical blood profile of Brazilian viperidae snakes kept in captivity. In: Relatório bienal 2000/2001, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Memórias do Instituto Butantan, 2001.

KOLESNIKOVAS, C. **Patologia comparada de cascavéis (*Crotalus durissus*, Laurenti, 1768) mantidas em cativeiro**. 1997. Universidade de São Paulo, 1997.

KUZMIN, Y.; DE VASCONCELOS MELO, F. T.; DOS SANTOS, J. N. A new species of *Serpentirhabdias* Tkach, Kuzmin & Snyder, 2014 (Nematoda: Rhabdiasidae) parasitic in the brown ground snake *Atractus major* Boulenger (Reptilia: Serpentes: Dipsadidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 101–106, 2014.

KUZMIN, Y. I. *Rhabdias agkistrodonis* (Nematoda: Rhabdiasidae): Morphology, distribution and specificity. **Folia Parasitologica**, v. 46, n. 1, p. 59–66, 1999.

KUZMIN, Y.; TKACH, V. *Rhabdias Pearsoni* SP. N. (Nematoda, Rhabdiasidae) From Keelback, *Tropidonophis Mairii* (Reptilia, Colubridae) In Australia. **Vestnik Zoologii**, v. 42, n. 6, 2008. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/vzoo.2008.42.issue-6/v10058-008-0015-1/v10058-008-0015-1.xml>>.

- KUZMIN, Y.; TKACH, V. V.; SNYDER, S. D. The Nematode Genus *Rhabdias* (Nematoda: Rhabdiasidae) from Amphibians and Reptiles of the Nearctic. **Comparative Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 101–114, 2003. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1654/4075>>.
- LAMIRANDE, E. W.; BRATTHAUER, A. D.; FISCHER, D. C.; NICHOLS, D. K. Reference hematologic and plasma chemistry values of brown tree snakes (*Boiga irregularis*). **Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v. 30, n. 4, p. 516–20, dez. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749437>>. Acesso em: 7 jun. 2018.
- LANGFORD, G. J. Ecology and Relationships of *Rhabdias* Spp . (Nematoda : Rhabdiasidae) From North American Amphibians and Reptiles. **North**, p. 140, 2010.
- LE DOUARIN, N. M.; MICHEL, G.; BAULIEU, E.-E. Studies of testosterone-induced involution of the bursa of Fabricius. **Developmental Biology**, v. 75, n. 2, p. 288–302, 15 mar. 1980. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160680901645?via%3Dihub>>. Acesso em: 6 jun. 2018.
- LUPPI, M. M.; ELVIRA, M.; TEIXEIRA, L. Tratamento de *Rhabdias labiata* com levamisol e ivermectina em jibóias (*Boa constrictor amarali*). **Veterinária Notícias**, v. 13, p. 61–65, 2007.
- MACMAHON, J. A.; HAMER, A. H. Hematology of the sidewinder (*Crotalus cerastes*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 51, n. 1, p. 53–58, 1 maio 1975. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300962975904120>>. Acesso em: 6 jun. 2018.
- MADER, D. R. Normal Hematology of Reptiles. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. p. 1126–1132.
- MADER, D. R. **Reptile Medicine and Surgery**. Second edi ed. [s.l.] Elsevier Saunders, 2006.
- MAGNINO, S.; COLIN, P.; DEI-CAS, E.; MADSEN, M.; MCLAUCHLIN, J.; NÖCKLER, K.; PRIETO MARADONA, M.; TSIGARIDA, E.; VANOPDENBOSCH, E.; VAN PETEGHEM, C. Biological risks associated with consumption of reptile products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 163–175, 15 set. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509003341?via%3Dihub>>. Acesso em: 6 jun. 2018.
- MARINHO, C. E. **A cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae : Crotalinae) como modelo experimental para o estudo do envolvimento de peptidases na sobrevida de espermatozoides**. 2007. Universidade de São Paulo, 2007.
- MARQUES, O. A. V.; ETEROVICK, A.; SAZIMA, I. Serpentes da Mata Atlântica - Guia Ilustrado Para a Serra do Mar. **Phyllomedusa**, v. 1, n. 2, p. 113–114, 2001.

MARTINEZ-SALAZAR, E. A. A new rhabdiasid species from *Norops megapholidotus* (Sauria : Polychrotidae) from Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 6, p. 1325–1329, 2006.

MARTÍNEZ-SALAZAR, E. a. A new rhabdiasid species from *Craugastor occidentalis* (Anura: Brachycephalidae) from Sierra de Manantlán, Jalisco, Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 79, n. 2007, p. 81–89, 2008.

MARTÍNEZ-SALAZAR, E. A.; LEÓN-RÈGAGNON, V. *Rhabdias lamothei* n. sp. (Nematoda: Rhabdiasidae) from *Leptodeira maculata* (Colubridae) in Mexico, including new records of *R. fuscovenosa* (Railliet, 1899) Goodey, 1924. **Zootaxa**, n. 1257, p. 27–47, 2006.

MARTÍNEZ SILVESTRE, A. **Enfermedades de los reptiles**. [s.l.] Reptilia Ediciones, 2003.

MASON, D. Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease. **Immunology Today**, v. 12, n. 2, p. 57–60, fev. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2059305>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Criação e Manejo de Serpentes. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**, p. 388, 2002.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, JLC; FRANÇA, FOS; WEN, FH; MALAQUE, CMS; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1. ed. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33–61.

MELLO, E. M. de. **Endo e ectoparasitos de serpentes *Crotalus durissus* Linnaeus , 1758 (Viperidae) de algumas localidades de Minas Gerais**. 2013. Universidade Federal de Minas Gerais., 2013.

MESSONNIER, S. P. **Common Reptile Diseases and Treatment**. [s.l.] Blackwell Science, 1996.

MIHALCA, A. D.; MİCLİUŞ, V.; LEFKADITIS, M. Pulmonary Lesions caused by the Nematode *Rhabdias fuscovenosa* in a Grass Snake, *Natrix natrix*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 2, p. 678–681, 2010. Disponível em: <<http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-46.2.678>>.

MITCHELL, M. A. Parasites of Reptiles. In: BAKER, D. G. (Ed.). **Flynn's Parasites of Laboratory Animals: Second Edition**. 2. ed. Baton Rouge: Blackwell, 2008. p. 177–216.

MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of comparative pathology**, v. 99, n. 1, p. 1–26, jul. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3062051>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia Veterinária UFMS**. 2007. Universidade Federal de Santa Maria-RS, 2007.

MORAVEC, F.; LITTLE, M. D. Redescription of *Dracunculus globocephalus* Mackin, 1927 (Nematoda: Dracunculidae), a parasite of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. **Folia Parasitologica**, v. 51, n. 4, p. 339–345, 2004.

MOSLEY, C. A. E. ANATOMIC AND PHYSIOLOGIC CONSIDERATIONS FOR REPTILE ANESTHESIA. In: Proceedings of The North American Veterinary Conference, **Anais...**2006.

MOURA, W. L. de; MATUSHIMA, E. R.; OLIVEIRA, L. W.; EGAMI, M. I.; EGAMI, M. I. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sangüíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 1, p. 45–50, 1 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/issue/view/5780>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

MURO, J.; CUENCA, R.; PASTOR, J.; VINAS, L.; LAVIN, S.; MURO, J.; CUENCA, R.; PH, D.; PASTOR, J.; PH, D. Effects of Lithium Heparin and Tripotassium EDTA on Hematologic Values of Hermann ' s Tortoises (*Testudo hermanni*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 29, n. 1, p. 40–44, 1998.

NEAR, T. J.; GAREY, J. R.; NADLER, S. a. Phylogenetic relationships of the Acanthocephala inferred from 18S ribosomal DNA sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 10, n. 3, p. 287–298, 1998.

NOGUEIRA, M. F. **Estudo de Paramyxovirus, Mycoplasma e de Bacilos Gram-Negativos no trato respiratório de serpentes *Crotalus durissus terrificus***. 2004. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2004.

O. ALMEIDA, W.; CHRISTOFFERSEN, M. L. A cladistic approach to relationships in pentastomida. **The Journal of parasitology**, v. 85, n. 4, p. 695–704, 1999.

OLIVEIRA, RC; WEN, FH; SIFUENTES, D. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, JL; HADDAD JR, JV; FRANÇA, FOS; WEN, FH; MALAQUE, C. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 6–21.

PARÉ, J. A. An Overview of Pentastomiasis in Reptiles and Other Vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 17, n. 4, p. 285–294, 1 out. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506308001249>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

PARIDA, S. P.; DUTTA, S. K.; PAL, A. Hematology and plasma biochemistry of wild-caught Indian cobra *Naja naja* (Linnaeus, 1758). **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2014.

PEICHOTO, M. E.; SÁNCHEZ, M. N.; LÓPEZ, A.; SALAS, M.; RIVERO, M. R.; TEIBLER, P.; TOLEDO, G. de M.; TAVARES, F. L. First report of parasitism by *Hexameta boddaertii* (Nematoda: Ascaridae) in *Oxyrhopus guibei* (Serpentes: Colubridae). **Veterinary Parasitology**, v. 224, p. 60–64, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.017>>.

PENDL, H. Morphological changes in red blood cells of birds and reptiles and their

interpretation. **Israel Journal of VETERINARY MEDICINE**, v. 61, n. 1, 2006.

PEREIRA, C. Fauna helminthologica de ophidios brasileiros. **Bol. Biol. São Paulo**, v. 35, n. 10, p. 179–185, 1927.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001.

PINTO, R. M.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; HELENA, M. P. M.; NORONHA, D. Nematode Parasites of the Neotropical Rattlesnake, *Crotalus Durissus* Linnaeus, 1758 (Ophidia, Viperidae) From Brazil: New Records and General Aspects. **Neotropical Helminthology**, v. 4, n. 2, p. 137–147, 2010.

POUGH, F. H. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora, 1999.

RATAJ, A. V.; LINDTNER-KNIFIC, R.; VLAHOVIĆ, K.; MAVRI, U.; DOVČ, A. Parasites in pet reptiles. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. May, p. 33, 2011.

RILEY, J. Recent advances in our understanding of pentastomid reproductive biology. **Parasitology**, v. 86 (Pt 4), p. 59–83, abr. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6346234>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

RILEY, J. The Biology of Pentastomids. **Advances in Parasitology**, v. 25, p. 45–128, 1 jan. 1986. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X08603425>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

ROSSELLINI, M. **Helicops leopardinus (SERPENTES , COLUBRIDAE) do Pantanal Sul , Mato Grosso do Sul**. 2007. UNESP Câmpus Botucatu, 2007.

ROSSKOPF, W. Disorders of reptilian leukocytes and erithrocytes. In: FUDGE, A. M. (Ed.). **Laboratory medicine. Avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p. 198–204.

RUNDQUIST, E. M. **Reptile and amphibian parasites**. [s.l.] Chelsea House Publishers, 1999.

SALAKIJ, C.; SALAKIJ, J.; APIBAL, S.; NARKKONG, N. A.; CHANHOM, L.; ROCHANAPAT, N. Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 3, p. 116–126, 2002.

SAMBROOK, J; FRISCH, E. F. M. T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2. ed. New York: Soft Cover, 1989.

SÁNCHEZ P., N.; TANTALEÁN V., M.; RICHARDS G., R.; GÁLVEZ C., H. Parasitos helmintos en *Boa constrictor*, *Epicrates cenchria* y *Corallus caninus* (Ophidia: Boidae) criadas en cautiverio. **Rev Inv Vet Perú**, v. 15, n. 2, p. 166–169, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v15n2/a13v15n2.pdf>>.

SANTOS, karina R. dos. **IMPLICAÇÕES DO PARASITISMO POR NEMATÓDEOS DO Gênero Rhabdias (NEMATODA, RHABDIASIDAE) EM**

Crotalus durissus terrificus (SERPENTES, VIPERIDAE): ALTERAÇÕES PULMONARES, MICROBIOLÓGICAS E HEMATOLÓGICAS. 2005. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, 2005.

SANTOS, K. R.; TAKAHIRA, R. K.; RALL, V. L. M.; CALDERÓN, C.; SEQUEIRA, J. L.; SILVA, R. J. Pulmonary, microbiological and hematological changes in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) parasitized by nematodes of the genus *Rhabdias* (Nematoda, Rhabdiasidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 667–674, 2008.

SCHUMACHER, J. Respiratory Medicine of Reptiles. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 14, n. 2, p. 207–224, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2011.03.010>>.

SCULLION, F. T.; SCULLION, M. G. Gastrointestinal Protozoal Diseases in Reptiles. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 18, n. 4, p. 266–278, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.jepm.2009.09.004>>.

SELF, J. T. Biological relationships of the pentastomida; a bibliography on the pentastomida. **Experimental Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 63–119, 1969.

SELYE, H. The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatonic hormones. **American Scientist**, v. 61, p. 692–699, 1973. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/pdf/27844072.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

SILVA, R. J. da; BARRELLA, T. H.; NOGUEIRA, M. F.; O DWYER, L. H. Frequência de helmintos em *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) em cativeiro. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 7, n. Table 1, p. 91–93, 2001.

SILVA, W. B. da; SOARES, R. M.; MACHADO, C.; FREIRE, I. M. A.; SILVA, L. C. C. P. da; MOREIRA, S. B.; GOLDBERG, D. W.; ALMOSNY, N. R. P. Bioquímica plasmática de cascavéis (*Crotalus durissus* LINNAEUS, 1758) em cativeiro. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2510–2514, 2010.

SILVA, R. J.; NOGUEIRA, M. F.; BARRELLA, T. H.; TAKAHIRA, R. K. Frequency of rhabdiasid nematodes in wild *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) from Botucatu region, Sao Paulo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 122–129, 2007.

SINAN. Acidentes por animais peçonhentos. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**, 2018. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

SIQUEIRA, L. R.; PANIZZUTTI, M. H. M.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M. Description of a new ascaridoid parasite *Bothrops jararaca* Wied (Reptilia, Ophidia) in Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 587–590, 2005.

SIQUEIRA, L. R.; PANIZZUTTI, M. H. M.; PEREIRA, L. C. M.; PINTO, R. M. Gross Lesions Induced By Nematodes of *Bothrops jararaca* and *Bothrops alternatus* in Brazil With Two New Records. **Neotropical Helminthology**, v. 3, n. 1, p. 29–34, 2009.

SOUZA, E. C.; CASELLA, A. M. B.; NAKASHIMA, Y.; MONTEIRO, M. L. R. Clinical features and outcomes of patients with diffuse unilateral subacute neuroretinitis treated with oral albendazole. **American Journal of Ophthalmology**, v. 140, n. 3, 2005.

STEFFENS III, W. L. Ultrastructural Features of Leukocytes. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 326–336.

SYKES, J. M.; KLAPHAKE, E. Reptile Hematology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 3, p. 661–680, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.014>>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TAYLER, M.; COOP, R.; WALL, R. **Veterinary Parasitology**. 3th. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2007.

TEIXEIRA, V. Levantamento da helmintofauna de serpentes peçonhentas no estado do paran. v. 1, n. 1, p. 98, 2000.

TELFORD, S. R. Parasitic diseases of reptiles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 159, n. 11, p. 1644–52, 1 dez. 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5005187>>. Acesso em: 1 jul. 2018.

TIMI, J. T.; PAOLETTI, M.; CIMMARUTA, R.; LANFRANCHI, A. L.; ALARCOS, A. J.; GARBIN, L.; GEORGE-NASCIMENTO, M.; RODRGUEZ, D. H.; GIARDINO, G. V.; MATTIUCCI, S. Molecular identification, morphological characterization and new insights into the ecology of larval *Pseudoterranova cattani* in fishes from the Argentine coast with its differentiation from the Antarctic species, *P. decipiens* sp. E (Nematoda: Anisakidae). **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 1–2, p. 59–72, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.033>>.

TROIANO, J. C.; GOULD, E. G.; ALTHAUS, R.; MALINSKAS, G.; GOULD, J. A.; HEKER, J.; VIDAL, J. C.; AMANTINI, E.; SIMONCINI, C. Blood biochemical profile of the south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in captivity. **J Venom Anim Toxins**, v. 7, n. 2, p. 183–189, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-79302001000200004>>.

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

- UETZ, P. **The reptile database turns 20**. [s.l: s.n.]v. 47
- UJVARI, B.; MADSEN, T. Age, parasites, and condition affect humoral immune response in tropical pythons. **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 1, p. 20–24, 2006.
- URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 1st. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1990.
- VANZOLINI, P. E.; CALLEFFO, M. E. V. A taxonomic bibliography of the South American snakes of the *Crotalus durissus* complex (Serpentes, Viperidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 74, n. 1, p. 37–83, 2002.
- VENTURIN, J. F.; JATOBÁ-LIMA, C.A.; COSTA, M.R.F.; ROJAS, L. C. . F. J.; J.M.; VIEIRA, P. R. Identificação de Hemoparasitas em répteis mantidos no zoológico do centro de instrução de guerra na selva em Manaus-AM. (R. G. D. C. Vilani, Ed.) In: III JORNADA GRUPO FOWLER – ENCONTRO NACIONAL DE MEDICINA DE RÉPTEIS, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2007.
- VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. D. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R. M. NEMATOIDES DO BRASIL. PARTE III: NEMATOIDES DE RÉPTEIS. **Revista Brasileira de Zoologia** bras. **Zool.**, v. 10, n. 1, p. 19–168, 1993.
- VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles (Third Ed)**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2009. v. XXXIII
- WARWICK, C.; ARENA, P.; LINDLEY, S.; JESSOP, M.; STEEDMAN, C. Assessing reptile welfare using behavioural criteria. **In Practice**, v. 35, n. 3, p. 123–131, 2013.
- WARWICK, C.; FRYE, F.; MURPHY, J. **Health and Welfare of Captive Reptiles**. [s.l: s.n.]v. 53
- WATSON, J. D.; MYERS, R. M.; CAUDY, A. A.; WITKOWSKI, J. A. **DNA Recombinante: Genes e Genomas**. 3 ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- WILKINSON, S. L. Reptile wellness management. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 281–304, 2015.
- WILSON, S. C.; CARPENTER, J. W. Endoparasitic diseases of reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 5, n. 2, p. 64–74, 1996.
- WÜSTER, W.; BÉRNILS, R. S. On the generic classification of the rattlesnakes, with special reference to the Neotropical *Crotalus durissus* complex (Squamata: Viperidae). **Zoologia (Curitiba)**, v. 28, n. 4, p. 417–419, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-46702011000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- WÜSTER, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. D. G.; THORPE, R. S. Tracing an invasion: Landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, v. 14, n. 4, p. 1095–1108, 2005.
- XUEREB, A.; ROW, J. R.; BROOKS, R. J.; MACKINNON, C.; LOUGHEED, S. C.

Relation between Parasitism, Stress, and Fitness Correlates of the Eastern Foxsnake (*Pantherophis gloydi*) in Ontario. **Journal of Herpetology**, v. 46, n. 4, p. 555–561, 2012. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1670/10-259>>.

YAMAGUTI, S. Systema Helminthum. vol. III, The Nematodes of Vertebrates. **New York: Interscience**, v. 141, p. 897, 1961. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/141/3584/897.abstract>>.

ZAPATA, A. .; VARAS, A.; TORROBA, M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. **Immunology Today**, v. 13, n. 4, p. 142–147, jan. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1580995>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

ZHU, X.; D'AMELIO, S.; PAGGI, L.; GASSER, R. B. Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). **Parasitology research**, v. 86, n. 8, p. 677–83, ago. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10952269>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

9. APÊNDICES

9.1. APÊNDICE A – TABELAS COM AS COMPARAÇÕES INTERGRUPOS DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS AVALIADOS NAS DIFERENTES COLHEITAS.

Tabela 19. Comparação entre os valores médios da contagem total de eritrócitos (CTE) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

CTE (10^3 cél/mm ³)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	606 ± 59,13	607 ± 59,73
1ª colheita	550 ± 61,59	513 ± 77,79
2ª colheita	447,5 ± 61,59	457 ± 53,02
3ª colheita	447 ± 88,74	542 ± 61,39
4ª colheita	520 ± 63,95	520 ± 19,32
5ª colheita	517,5 ± 55,98	537 ± 38,44
6ª colheita	448 ± 23,75	448 ± 32,9
7ª colheita	498 ± 24,98	437 ± 31,80

CTE (contagem total de eritrócitos), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 20. Comparação entre valores médios da contagem total de leucócitos dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

CTL (10^3 cél/mm ³)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	12,8 ± 2,41	5,6 ± 0,68
1ª colheita	9,25 ± 1,91	8,8 ± 2,35
2ª colheita	6,63 ± 1,47	7,6 ± 1,65
3ª colheita	7,5 ± 0,76	11,0 ± 1,29
4ª colheita	11,37 ± 0,99	11,4 ± 0,83
5ª colheita	14,88 ± 1,68	13,83 ± 0,88
6ª colheita	18,5 ± 4,09	12,87 ± 1,55
7ª colheita	14,5 ± 2,27	8,67 ± 1,20

CTL (contagem total de leucócitos), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 21. Comparação entre valores médios de hemoglobina (Hb) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Hb (g/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	7,82	8,87
1ª colheita	6,2	7,0
2ª colheita	6,78	6,45
3ª colheita	5,56	5,37
4ª colheita	5,07	4,63
5ª colheita	4,55	9,0
6ª colheita	3,84	3,60 ± 0,35
7ª colheita	5,54	6,05

Hb (hemoglobina), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 22. Comparação entre valores médios do Hematócrito (Ht) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Ht (%)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	22,8 ± 2,65	26,5 ± 2,14
1ª colheita	23,4 ± 4,23	21,17 ± 1,9
2ª colheita	20,2 ± 2,01	19,5 ± 1,87
3ª colheita	22 ± 4,76	17,8 ± 0,94
4ª colheita	16,25 ± 0,77	20,4 ± 2,17
5ª colheita	19,25 ± 1,07	21,4 ± 1,76
6ª colheita	20,4 ± 2,13	17,67 ± 1,45
7ª colheita	23,2 ± 0,97	25 ± 2,38

Ht (hematócrito), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 23. Comparação entre valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

CHCM (%)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	37,4 ± 8,37	32,83 ± 2,91
1ª colheita	28,4 ± 3,11	32,67 ± 3,28
2ª colheita	33,6 ± 1,21	34 ± 1,48
3ª colheita	27,8 ± 3,99	30,83 ± 3,74
4ª colheita	30 ± 1,22	23,33 ± 1,58
5ª colheita	24,25 ± 3,1	42,17 ± 17,56
6ª colheita	19,4 ± 3,64	20,33 ± 0,88
7ª colheita	24,4 ± 2,06	24,67 ± 2,01

CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 24. Comparação entre valores médios de linfócitos dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Linfócitos (%)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	60.17 ± 5,49	62,17 ± 2,97
1ª colheita	65.33 ± 6,62	67,33 ± 4,26
2ª colheita	70.17 ± 5,08	68,83 ± 4,77
3ª colheita	74.5 ± 3,24	71,5 ± 3,68
4ª colheita	75.67 ± 4,44	72 ± 2,1
5ª colheita	69 ± 4,30	75,33 ± 1,8
6ª colheita	73.5 ± 1,84	73,50 ± 2,60
7ª colheita	75.4 ± 2,93	68,50 ± 3,66

realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 25. Comparação entre valores médios de azurófilos dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entra as colheitas. São Paulo, 2018.

Azurófilos (%)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	16,67 ± 2,06	20,5 ± 3,73
1ª colheita	18,5 ± 4,62	15 ± 3,64
2ª colheita	17,33 ± 2,04	14 ± 3,28
3ª colheita	16,5 ± 0,92	18,17 ± 2,06
4ª colheita	16,17 ± 2,2	19,5 ± 1,93
5ª colheita	17,67 ± 3,17	18,17 ± 1,53
6ª colheita	20,17 ± 3,05	17,25 ± 1,80
7ª colheita	17,8 ± 2,04	19,50 ± 2,36

realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 26. Comparação entre valores médios de heterófilos íntegros dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entra as colheitas. São Paulo, 2018.

Heterófilos íntegros (%)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	4,17 ± 2,23	1,83 ± 0,6
1ª colheita	1 ± 0,36	1,5 ± 0,76
2ª colheita	2 ± 0,73	6,67 ± 2,96
3ª colheita	2 ± 0,73	5 ± 1,9
4ª colheita	2 ± 0,89	6 ± 1,98
5ª colheita	7,5 ± 1,31	4,83 ± 0,7
6ª colheita	5,17 ± 1,56	7,75 ± 1,11
7ª colheita	6,2 ± 0,9	6,25 ± 2,21

realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 27. Comparação entre valores médios de heterófilos degranulados dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Heterófilos degranulados (%)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	16,67 ± 5,04	14,67 ± 3,16
1ª colheita	11,5 ± 3,02	15,33 ± 3,18
2ª colheita	8,67 ± 3,96	10 ± 3,7
3ª colheita	6,67 ± 2,01	5 ± 2,07
4ª colheita	6,17 ± 4,05	2 ± 1,63
5ª colheita	5,33 ± 4,54	0,83 ± 0,65
6ª colheita	2,83 ± 2,09	1,25 ± 0,95
7ª colheita	0,6 ± 0,33	3,75 ± 1,11

realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 28. Comparação entre valores médios de basófilos dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Basófilos (%)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	2,33 ± 0,76	1,17 ± 0,48
1ª colheita	3 ± 0,82	0,83 ± 0,48
2ª colheita	1,83 ± 0,48	0,5 ± 0,34
3ª colheita	0,33 ± 0,33	0,33 ± 0,21
4ª colheita	0	0,83 ± 0,4
5ª colheita	0,5 ± 0,34	0,67 ± 0,33
6ª colheita	0	0,25 ± 0,25
7ª colheita	0	2,00 ± 0,71

realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 29. Comparação entre valores médios da contagem total de trombócitos (CTT) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

CTT (10^3 cél/mm³)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	6,9 ± 1,78	4,5 ± 0,71
1ª colheita	7,12 ± 1,63	5,8 ± 0,6
2ª colheita	6,37 ± 1,22	4,9 ± 0,53
3ª colheita	4,25 ± 0,71	5,12 ± 0,68
4ª colheita	6,75 ± 0,12	7,5 ± 1,48
5ª colheita	9,5 ± 0,55	11,00 ± 9,00
6ª colheita	1,04 ± 0,25	6,12 ± 1,14
7ª colheita	6,8 ± 0,11	5,67 ± 1,67

CTT (contagem total de trombócitos), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos).

Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

9.2. APÊNDICE B – TABELAS COM AS COMPARAÇÕES INTERGRUPOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS NAS DIFERENTES COLHEITAS.

Tabela 30. Comparação entre valores médios de ácido úrico (AU) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

AU(mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	2,28 ± 0,31	3,46 ± 0,68
1ª colheita	4,56 ± 1,39	4,27 ± 0,99
2ª colheita	5,17 ± 1,52	3,19 ± 1,48
3ª colheita	3,73 ± 3,05	1,95 ± 0,71
4ª colheita	1,56 ± 0,21	1,95 ± 0,38
5ª colheita	2,71 ± 0,59	1,59 ± 0,10
6ª colheita	2,27 ± 0,37	1,91 ± 0,72
7ª colheita	2,64 ± 0,58	2,62 ± 0,36

AU (ácido úrico), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 31. Comparação entre valores médios de albumina (Alb) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Alb (g/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	0,93 ± 0,15	1,0 ± 0,18
1ª colheita	0,68 ± 0,07	1,16 ± 0,49
2ª colheita	0,57 ± 0,04	0,51 ± 0,07
3ª colheita	0,58 ± 0,04	0,91 ± 0,35
4ª colheita	0,83 ± 0,09	0,66 ± 0,07
5ª colheita	0,70 ± 0,04	0,8 ± 0,07
6ª colheita	0,7 ± 0,11	0,99 ± 0,07
7ª colheita	1,95 ± 0,1	1,56 ± 0,17

Alb (albumina), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 32. Comparação entre valores médios de ALT dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

ALT (U/L)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	30,06 ± 14,32	21,83 ± 3,26
1ª colheita	20,02 ± 3,57	14,8 ± 2,24
2ª colheita	19,75 ± 2,5	17,4 ± 2,55
3ª colheita	22,67 ± 3,53	17 ± 2,62
4ª colheita	19,2 ± 3,38	27,4 ± 4,69
5ª colheita	16,25 ± 3,44	24,2 ± 5,71
6ª colheita	24 ± 2,95	31,33 ± 10,48
7ª colheita	35,8 ± 6,30	35,2 ± 11,61

ALT (alanina aminotransferase), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 33. Comparação entre valores médios de AST dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

AST (U/L)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	30,8 ± 4,93	43,5 ± 12,35
1ª colheita	30,06 ± 7,54	21,6 ± 2,98
2ª colheita	32,25 ± 7,09	27,6 ± 4,39
3ª colheita	29,33 ± 9,84	32,67 ± 10,24

4ª colheita	33,6 ± 10,98	75,2 ± 17,48
5ª colheita	35,75 ± 6,58	45,6 ± 17,43
6ª colheita	39,2 ± 16,27	41,68 ± 23,25
7ª colheita	30,4 ± 4,34	74,2 ± 18,53

AST (aspartato aminotransferase), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 34. Comparação entre valores médios de cálcio (Ca) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Ca (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	15,73 ± 3,73	11,91 ± 1,40
1ª colheita	28,15 ± 12,38	19,47 ± 4,46
2ª colheita	12,39 ± 0,73	10,57 ± 1,07
3ª colheita	11,07 ± 2,67	11,03 ± 2,02
4ª colheita	9,56 ± 0,93	13,08 ± 1,52
5ª colheita	12,44 ± 0,87	10,58 ± 1,6
6ª colheita	7,99 ± 0,87	7,30 ± 1,78

7ª colheita	11,14 ± 2,0	10,03 ± 0,74
--------------------	-------------	--------------

Ca (cálcio), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 35. Comparação entre valores médios de CK-NAC dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

CK-NAC (U/L)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	87,6 ± 13,3	287,8 ± 123,56
1ª colheita	44,4 ± 17,45	67,2 ± 27,41
2ª colheita	34,33 ± 14,19	S/C
3ª colheita	23 ± 0,00	103,25 ± 29,15
4ª colheita	146 ± 70,52	596 ± 244,6
5ª colheita	218,75 ± 61,22	658,6 ± 272,44
6ª colheita	240,6 ± 117,86	388 ± 143,68
7ª colheita	203,8 ± 95,02	527,6 ± 191,96

CK-NAC (creatina quinase), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos), S/C (sem colheita). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 36. Comparação entre valores médios de colesterol dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Colesterol (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	129,53 ± 15,08	106,22 ± 15,89
1ª colheita	120,26 ± 33,17	113,25 ± 17,23
2ª colheita	140,09 ± 11,58	133,87 ± 10,87
3ª colheita	120,90 ± 32,04	204,62 ± 33,55
4ª colheita	234,88 ± 29,82	174,46 ± 48,06
5ª colheita	194,38 ± 33,77	125,99 ± 22,65
6ª colheita	149,94 ± 29,97	175,65 ± 16,74
7ª colheita	181,50 ± 8,21	134,14 ± 21,52

realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 37. Comparação entre valores médios de creatinina-K dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Creatinina-K (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	8,43 ± 1,32	8,81 ± 1,79
1ª colheita	4,98 ± 0,99	5,11 ± 0,98
2ª colheita	4,47 ± 0,17	3,92 ± 0,05
3ª colheita	3,97 ± 0,03	3,84 ± 0,17
4ª colheita	3,89 ± 0,09	3,84 ± 0,05
5ª colheita	3,79 ± 0,08	4,12 ± 0,16
6ª colheita	4,17 ± 0,08	4,34 ± 0,18
7ª colheita	4,83 ± 0,57	4,77 ± 0,4

realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 38. Comparação entre valores médios de fosfatase alcalina dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

FA (U/L)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	60 ± 12,45	54 ± 5,7
1ª colheita	86,8 ± 14,69	99,8 ± 35,92
2ª colheita	96 ± 9,61	89,25 ± 10,1
3ª colheita	64 ± 8,54	63,0 ± 10,28
4ª colheita	77,2 ± 11,07	80,2 ± 17,03
5ª colheita	58,25 ± 5,94	56,25 ± 9,94
6ª colheita	68 ± 9,57	70,67 ± 9,40
7ª colheita	85 ± 7,96	68,6 ± 12,95

FA (fosfatase alcalina), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 39. Comparação entre valores médios de fósforo dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

P (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	2,28 ± 0,62	2,99 ± 0,49
1ª colheita	2,22 ± 0,28	2,25 ± 0,31
2ª colheita	1,99 ± 0,22	1,72 ± 0,36
3ª colheita	2,28 ± 0,32	2,15 ± 0,16
4ª colheita	2,38 ± 0,09	2,93 ± 0,28
5ª colheita	3,02 ± 0,24	2,89 ± 0,46
6ª colheita	2,36 ± 0,33	2,85 ± 0,71
7ª colheita	3,15 ± 0,71	2,75 ± 0,49

P (fósforo), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos)). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 40. Comparação entre valores médios de glicose dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

Glicose (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	33,71 ± 4,45	31,75 ± 4,53
1ª colheita	36,31 ± 3,39	38,62 ± 9,1
2ª colheita	51,40 ± 8,62	28,53 ± 3,83
3ª colheita	27,25 ± 1,17	42,40 ± 13,99
4ª colheita	35,95 ± 6,65	223,03 ± 172,52
5ª colheita	49,92 ± 4,32	41,4 ± 1,95
6ª colheita	22,89 ± 4,43	18,72 ± 5,47
7ª colheita	56,72 ± 5,5	76,54 ± 13,72

realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.

Tabela 41. Comparação entre valores médios de proteínas totais (PT) dos Grupos 1 e 2 com erro-padrão dos valores médios (EPM), entre as colheitas. São Paulo, 2018.

PT (mg/dL)	Grupo 1	Grupo 2
	média ± EPM	média ± EPM
Colheita tempo 0	4,18 ± 0,65	4,56 ± 0,34
1ª colheita	4,01 ± 0,41	3,87 ± 0,43
2ª colheita	3,08 ± 0,56	3,67 ± 0,04
3ª colheita	3,09 ± 0,53	3,48 ± 0,25
4ª colheita	3,03 ± 0,36	3,49 ± 0,17
5ª colheita	3,24 ± 0,2	3,13 ± 0,27
6ª colheita	3,06 ± 0,32	2,83 ± 0,28
7ª colheita	5,02 ± 0,35	4,13 ± 0,73

PT (proteínas totais), realce cinza (variável não utilizada nos cálculos estatísticos). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre colheitas.