Daniel Rodrigues Stuginski

“Taxas metabólicas de repouso e pós-prandiais em
serpentes do gênero *Bothrops*, com ênfase nos
aspectos ontogenéticos e filogenéticos
(Crotalinae)”.

“Standard metabolic rates and specific dynamic
action in *Bothrops*, with emphasis on ontogenetic
and phylogenetic features (Crotalinae)”.

São Paulo, 13 de março

2014

Daniel Rodrigues Stuginski

“Taxas metabólicas de repouso e pós-prandiais em
serpentes do gênero *Bothrops*, com ênfase nos
aspectos ontogenéticos e filogenéticos
(Crotalinae)”.

“Standard metabolic rates and specific dynamic
action in *Bothrops*, with emphasis on ontogenetic
and phylogenetic features (Crotalinae)”.

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Pereira Wilken Bicudo
Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo
de Carvalho

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Stuginski, Daniel Rodrigues
Taxas metabólicas de repouso e pós-prandiais em serpentes do
gênero *Bothrops*, com ênfase nos aspectos ontogenéticos e
filogenéticos
(Crotalinae) / Daniel Rodrigues Stuginski ; orientador José
Eduardo
Pereira Wilken Bicudo. -- São Paulo, 2014.
153 f.
Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Serpentes. 2. Metabolismo. 3. Digestão. I. Universidade de
São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.
II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Orientador

Dedicatória

Em memória da minha amada irmã caçula Tatiana Rodrigues Stuginski, que esteve comigo no início desta jornada, mas que infelizmente não pôde acompanhar seu desfecho.

. –Tati, você foi o maior exemplo de força, perseverança e fé na vida que eu poderia ter tido. Obrigado por cada momento que compartilhamos e por iluminar a minha vida. Gostaria de poder te dedicar uma bela canção ou um poema digno, mas infelizmente não sou bom em nada disso. Assim sendo, te dedico este humilde manuscrito, que é simples demais para lhe fazer jus, mas que foi confeccionado com muito carinho. Sinto sua falta todos os dias da minha vida.

Do seu irmão que sempre te amará.

D.

*“Take a sad song and make it better.
Remember to let her into your heart
Then you can start to make it better”.*

Hey Jude (The Beatles)

Agradecimentos

Agradeço imensamente:

À Fapesp pela concessão da bolsa e custeio de parte deste projeto.

Ao meu Orientador Prof. Dr. José Eduardo Pereira Wilken Bicudo, por toda confiança, paciência, suporte e ajuda oferecida ao longo destes anos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. José Eduardo de Carvalho, sem o qual este trabalho não teria sequer começado. Obrigado por me orientar, apoiar, acreditar em mim, me cobrar e me ajudar em absolutamente todos os aspectos necessários para a conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. Carlos Arturo Navas Iannini sem o qual esta tese não poderia ser realizada; por permitir que eu utilizasse todos os equipamentos, recursos disponíveis e realizasse os experimentos em suas dependências.

Agradeço principalmente, por tratar-me como parte de sua equipe, fazer com que eu me sentisse tão bem em seu laboratório e por toda a gentileza que teve comigo diante de todos os percalços deste doutorado.

Ao Wilson Fernandes, meu ex-chefe e amigo, que permitiu e estimulou-me a realizar mais este sonho, cedendo-me gentilmente não só os animais

necessários como também o tempo que necessitei, sem nunca me negar nada.

À Dra. Kathleen Fernandes Grego, minha chefe, colaboradora e amiga que permitiu que eu dedicasse o tempo necessário para a realização deste trabalho, que gentilmente me cedeu os animais, que me ajudou em inumeráveis aspectos e sempre me estimulou a trilhar o caminho da ciência.

Ao Pesquisador científico Sávio Stefanini Sant’Anna por todo o auxílio e amizade ao longo de todos estes anos de convivência; por todas as discussões importantes a respeito do trabalho, pela ajuda na edição das imagens, nos pacotes estatísticos e nas minhas responsabilidades profissionais. Por acreditar em mim e me estimular a seguir em frente.

Ao Dr. Agustín Camacho Guerrero, meu amigo e colaborador sem o qual boa parte deste trabalho não poderia ter sido realizada. Por toda a ajuda nas análises filogenéticas e paciência que teve comigo nestes últimos meses.

Aos Professores Dr. Fernando Ribeiro Gomes e Márcio Reis Custódio pelas dicas dadas durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Chauí-Berlinck pelas conversas, aulas e ajuda na interpretação dos resultados estatísticos.

À Roseli Silva Santos por toda ajuda e por sempre salvar a minha pele.

À toda equipe da secretaria da pós-graduação do IB (Elder, Érica, Lilian...) por também salvarem a minha pele com bastante frequência.

À todos os professores da pós-graduação do IB por terem propiciado excelentes aulas e contribuído substancialmente para minha formação.

À Dra Tatiana Kawamoto por me ensinar a “respirometrar”, por sua paciência e dedicação.

À Dra Karen de Moraes Zani por ter tão prontamente me ajudado na confecção de minhas referências.

Ao Jarbas Videiros, por toda a ajuda com as fotografias.

Ao Dr. Richard Shine, por enviar-me tão prontamente alguns dos artigos que necessitei.

À todos os meus amigos e colegas do laboratório de ecofisiologia por me ajudarem e me deixarem fazer parte desta equipe tão especial (em especial

agradeço a Lye, Bel, Inés e Toninho, que me ajudaram com sugestões e conversas).

À todos os meus amigos e colegas do laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, com os quais convivo a muitos anos e sem os quais este trabalho não poderia ser realizado. Em especial agradeço ao Diego Rugno por toda a ajuda, Cinthia, Renato e Bruno por gentilmente me cederem os animais de suas salas, Diego Rubio, Guilherme e Gustavo por assumirem o trabalho do serpentário.

Aos meus amigos de maneira geral, por fazerem parte da minha vida.

Ao meu pai Luis Antônio Stuginski e sua esposa Ruth por todo suporte, incentivo e disposição para me ajudarem.

Ao Jaber Amad, por toda a ajuda que dedicou a minha mãe e irmã nestes anos tão conturbados.

Ao meu irmão Cristiano Rodrigues Stuginski, por ser um ótimo irmão e sempre me divertir.

À minha irmã Tatiana Stuginski, meu anjo, por tudo o que fez por mim em sua vida.

À minha mãe Maria Izabel Rodrigues, por ter me criado com tanto amor, ter me dado educação e sempre ter acreditado em meus sonhos. Além de ser a melhor mãe do mundo.

Às minhas cachorras Bisteka e Paçoca, por tornarem minha vida tão mais feliz e divertida.

À minha esposa, amiga, parceira e colaboradora Ana Helena Pagotto Stuginski, por toda dedicação, amor e paciência que teve comigo ao longo destes anos. Por me tornar uma pessoa melhor e permitir que eu compartilhe de seu amor, de sua vida e de seus sonhos.

A Deus, por ter colocado tantas pessoas especiais na minha vida.

Índice

Abreviaturas.....	13
Resumo Geral.....	14
Abstract.....	15
Capítulo 1: Introdução Geral.....	16
Aspectos Gerais do Estudo do Metabolismo Energético.....	16
Emprego da ponderação filogenética nos estudos de fisiologia comparativa.....	19
Metabolismo Energético em Serpentes.....	21
As serpentes do gênero <i>Bothrops</i> como sistemas-modelo para o estudo dos padrões evolutivos das taxas metabólicas.....	28
Respirometria.....	34
Referências Bibliográficas.....	41
Capítulo 2: Efeitos da Ocupação de Diferentes Ambientes, da Ontogenia e do Hábito Alimentar Sobre as Taxas Metabólicas de Serpentes do Gênero <i>Bothrops</i> (Crotalinae), com Especial Ênfase Sobre as Relações Filogenéticas.....	48
Resumo.....	48
<i>Abstract</i>	49
Introdução.....	50
Materiais e Métodos.....	55
Resultados.....	65

Discussão.....	67
Referências Bibliográficas.....	84
Capítulo 3: Aumento da taxa metabólica durante o período pós-prandial em 5	
espécies de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> (Crotalinae: Viperidae).....	89
Resumo.....	89
<i>Abstract</i>	90
Introdução.....	91
Materiais e Métodos.....	95
Resultados.....	99
Discussão.....	104
Referências Bibliográficas.....	115
Capítulo 4: Discussão Geral e Considerações finais.....	119
Referências Bibliográficas.....	130

Abreviações

- AMPP:** Aumento metabólico pós-prandial, referente ao aumento da taxa metabólica acima dos valores da taxa metabólica de repouso durante o processo digestório.
- ATP:** Adenosina trifosfato.
- E_{AMPP}%:** porcentagem do conteúdo energético da ingesta que é dispendida durante a AMPP.
- EM:** Escopo metabólico, calculado dividindo-se o valor máximo do **AMPP** (pico) pelo valor da taxa metabólica de repouso padrão (**TMRP**).
- F_eO₂:** fração de oxigênio na entrada do sistema.
- F_sO₂:** a fração de oxigênio na saída do sistema.
- Kcal:** quilocaloria.
- Kj:** quilojoule.
- M:** massa corpórea.
- Q₁₀:** Coeficiente de temperatura. $Q_{10} = (R_2/R_1)^{(10/T_2-T_1)}$, aonde R2 é a medida realizada na temperatura T2 e R1 é a medida realizada na temperatura T1.
- TMR:** taxa metabólica de repouso, medida realizada durante o repouso no período normal de atividade dos animais (p. ex. medida feita durante o repouso no período de fotofase de um animal diurno).
- TMRP: taxa metabólica de repouso padrão,** medida realizada durante o repouso no período normal de atividade dos animais (p. ex. medida feita durante o repouso no período de scotofase de um animal diurno).
- VCO₂:** Volume de gás carbônico produzido.
- VO₂:** Volume de oxigênio consumido.

Resumo geral:

Os viperídeos estão entre as serpentes de menor custo energético de manutenção, o que é, geralmente, relacionado a seus baixos níveis de deslocamento e a tática de forrageio por emboscada. Dois importantes componentes do alocamento energético destes animais são: 1) o metabolismo de repouso padrão, que está relacionado ao custo de manutenção visceral durante o repouso e 2) o aumento metabólico pós-prandial (AMPP), que está relacionado ao custo do processo digestório.

O presente trabalho teve como objetivos estudar as variações da TMRP (taxa metabólica de repouso padrão) e do AMPP em 5 espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* levando em conta aspectos filogenéticos, ontogenéticos e testando hipóteses acerca de possíveis variações destes componentes em função de características ecológicas. Além disso, o presente trabalho testou, através de ferramentas de ponderação filogenética, a hipótese atualmente aceita que prediz que as TMRPs em serpentes estão essencialmente ligadas a estratégia alimentar e não a filogenia.

O trabalho está dividido em quatro capítulos, sendo o primeiro devotado a uma introdução geral acerca dos assuntos que serão abordados nos demais. Os resultados e discussões específicas estão divididos em dois capítulos redigidos em forma de artigo, primeiro referente aos estudos das taxas metabólicas de repouso (capítulo 2) e o segundo sobre o AMPP (capítulo 3). Por fim, a conclusão final acerca dos achados e as perspectivas para pesquisas futuras estão presente no capítulo 4.

Abstract:

The viperids are among the snakes with the lowest energetic maintenance costs which are generally related to the low mobility and ambush foraging mode. Two important components of energy allocation in these animals are 1) standard metabolic rates (SMR), related to the cost of keeping visceral components during resting and 2) specific dynamic action (SDA) , which is related to the cost of digestion.

The present work aimed to study the variations of SMR and SDA in 5 species of the genus *Bothrops* taking into account aspects of phylogeny and ontogeny plus testing hypotheses about possible variations in these metabolic rates related to ecological characteristics. Furthermore, the present study used phylogenetic weighting tools to test the currently accepted hypothesis that predicts that SMR in snakes is related to the feeding strategy and not to phylogeny.

The work is divided into four different chapters. Chapter 1 is devoted to a general introduction about the issues that will be addressed in the others chapters. The results and discussions are divided into two chapters presented as articles, the first referring to studies of SMR (chapter 2) and the second to the SDA (chapter 3). Finally, in chapter 4 we include the final conclusion and prospects for future research

1.0 Introdução Geral:

a) Aspectos Gerais do Estudo do Metabolismo Energético

Em termos gerais, a vida é pautada pelo equilíbrio entre a assimilação e o gasto de energia durante as atividades rotineiras. Denominamos de metabolismo energético o conjunto de processos envolvidos na assimilação de compostos energéticos e a transferência dessa energia química para moléculas intermediárias (ATP, GTP) que, posteriormente, darão suporte a todas as outras atividades que ocorrem ininterruptamente ao longo da vida do organismo (Guyton & Hall, 2006). O metabolismo energético é classicamente dividido em: (1) metabolismo anaeróbico e (2) aeróbico. O metabolismo anaeróbico pode ser subdividido em três vias distintas: (a) via da utilização de glicose como substrato energético até a formação de lactato para a produção de ATP sob condições de hipóxia ou anóxia tecidual, (b) uso de estoques intracelulares de ATP e (c) via de uso de estoques de fosfocreatina, especialmente depositados nos tecidos musculares (Gladden, 1996). O metabolismo aeróbico é a via na qual o ATP é obtido através da oxidação da glicose e outros compostos, como lipídeos e proteínas, até gás carbônico e água (Hochachka & Somero, 2002). Ambas as vias metabólicas têm sido estudadas em diversos grupos animais ao longo dos anos, o que acabou por gerar uma considerável quantidade de informação a respeito das relações entre o balanço energético dos organismos e as demandas necessárias para o

desempenho de diferentes tipos de atividade (Hochachka & Somero, 2002; McCue, 2006a; Secor, 2009; Dlugosz *et al.*, 2013).

Muitos vertebrados apresentam diferenças ecológicas e funcionais marcantes quanto ao tipo de alimentação, desenho corporal, ocupação de habitat, entre outras ao longo de sua ontogenia. Estas características estão intimamente ligadas a diferentes desafios metabólicos, que são refletidos em variadas taxas de produção de ATP. Podemos assumir, por exemplo, que uma espécie que apresente mudança em sua dieta ou no tipo de forrageamento ao longo da ontogenia apresentará diferenças também no balanço energético durante o seu desenvolvimento (Secor & Diamond, 2000; McCue, 2006b; Secor & Boehm, 2006; Bessler *et al.*, 2010). Existem ainda características metabólicas que estão ligadas a ontogênese independentemente de padrões ecológicos como, por exemplo, o investimento energético para crescimento e reprodução. Vertebrados adultos, geralmente, apresentam uma porção significativa do alocamento energético anual destinado à reprodução e um menor investimento energético ligado ao crescimento; ao passo que indivíduos filhotes apresentam um alocamento de energia primordialmente voltado para o crescimento (Nagy, 2000). Além desses fatores, cabe salientar que a massa corpórea também exerce grande influência na quantidade de energia empregada para certos tipos de atividade. Sabemos que, de forma geral, indivíduos maiores costumam apresentar uma taxa metabólica aeróbia absoluta (usualmente mensurada com a taxa de consumo de oxigênio, ou VO_2) mais elevada do

que indivíduos menores. Todavia, a taxa metabólica específica (expressa por unidade de massa corpórea) é geralmente maior nos indivíduos menores (Schmidt-Nielsen, 1997). Esta relação entre a massa corpórea (M) e a taxa metabólica pode ser representada através da equação de potência: $VO_2 = aM^b$, onde a quantidade de oxigênio consumido é igual a massa (M) elevada ao expoente de massa (b) e multiplicada pelo coeficiente de massa (a). Esta mesma equação pode ser linearizada através de manobra logarítmica, onde temos que:

$$\text{Log}_{10}(VO_2) = \alpha + b * (\text{Log}_{10}M),$$

onde “ α ” é o intercepto e o expoente de massa “ b ” é a inclinação da reta gerada (Glazier, 2008).

Os estudos das relações de escala metabólica vêm sendo explorados em diferentes hierarquias filogenéticas (gêneros, famílias, classes, filo), sendo que alguns trabalhos realizados com diversas espécies de vertebrados determinaram expoentes de massa (inclinações) gerais para estes grupos (Andrews & Pough, 1985; Schmidt-Nielsen, 1997; Dlugosz *et al.*, 2013). Todavia, estudos intraespecíficos ou em grupos filogeneticamente mais restritos (especialmente nos ectotérmicos) têm mostrado certa discrepância destes valores (Chappell & Ellis, 1987; Cruzneto & Abe, 1994; Bedford & Christian, 1998; Dorcas *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2007). As comparações entre taxas metabólicas de diferentes espécies ou diferentes grupos animais, ainda que forneçam uma ideia geral do perfil metabólico de determinada linhagem, muitas vezes podem

incorrer em erros devido a não ponderação filogenética, assumindo como independentes características fisiológicas que possuem atrás de si um histórico evolutivo (ver o item: *Emprego da ponderação filogenética nos estudos de fisiologia comparativa* mais a frente). Assim sendo, o uso de ferramentas analíticas que ponderem a história evolutiva compartilhada entre os grupos é essencial para aumentar o poder da análise comparativa.

As medidas metabólicas usualmente empregadas na área de fisiologia comparativa são extremamente diversas e podem envolver diferentes *status fisiológicos* dependendo da pergunta que se queira responder e da espécie em questão. Medidas da máxima capacidade aeróbia (do inglês, *maximum metabolic rate* – MMR) e do custo de manutenção durante o repouso são bastante comuns e representativas de estados fisiológicos relativamente bem definidos. Todavia, medidas metabólicas de outras atividades dentro do contexto ecológico do animal podem ser igualmente importantes para responder questões pertinentes a ecofisiologia destes, por exemplo, medidas metabólicas durante a estivação, hibernação, digestão, forrageamento, voo, acasalamento, prenhez entre outras.

b) *Emprego da ponderação filogenética nos estudos de fisiologia comparativa:*

Estudos que comparam características entre diferentes espécies são relativamente comuns em fisiologia, assim como em outras áreas do conhecimento

(p.ex.: ecologia, zoologia e genética) (Blomberg *et al.*, 2003). Muitos destes estudos fazem uso de ferramentas estatísticas tradicionais para comparar características de diferentes espécies entre si, todavia, tais metodologias assumem que as características aferidas nas diferentes espécies são independentes umas das outras. Em seu trabalho seminal em 1985, Felsenstein detectou tal problema, já que, desde que foi concebida a ideia de que os animais estão relacionados entre si dentro de uma hierarquia filogenéticas, não se poderia assumir que as características das espécies variassem de forma independente. Segundo o autor, assumir tais características como independentes seria igual a assumir uma filogenia em forma de estrela, ou seja, uma politomia de ramos de tamanhos iguais para as espécies em questão. Devido a este problema, a abordagem mais correta seria através do uso de ferramentas que façam o controle das variáveis filogenéticas na análise estatística.

Desde Felsenstein em 1985 surgiram alguns métodos para o controle da influência da filogenia nas análises bem como métodos para quantificar o sinal filogenético, ou seja, o quanto as taxas de variação de determinada característica são próximas àquelas esperadas por um modelo evolutivo (Felsenstein, 1985; Grafen, 1989; Martins & Garland, 1991; Garland *et al.*, 1992; Reynolds & Lee, 1996; Martins & Hansen, 1997; Pagel, 1999; Garland & Ives, 2000; Rohlf, 2001; Blomberg *et al.*, 2003; Revell *et al.*, 2008).

O conhecimento de uma filogenia robusta bem como o número de espécies em que a característica é aferida são dois fatores importantes para que tal análise seja conduzida de forma correta. Uma filogenia incorreta, por si só, pode levar a uma interpretação errônea dos resultados já que as técnicas empregadas utilizam os nós da árvore bem como o tamanho dos ramos (para mais sobre correções de tamanho de ramos ver Blomberg *et al.*, 2003), além disso, um tamanho amostral reduzido pode mascarar o sinal filogenético de um conjunto de dados (Blomberg *et al.*, 2003).

O conhecimento do sinal filogenético de determinada característica fisiológica dentro de um conjunto de espécies e testes que incluam outras variáveis explicativas para o padrão de variação do fenômeno (p. ex. características ecológicas) podem ser de grande importância na compreensão de quais são os fatores que regem a evolução de esta característica (Dlugosz *et al.*, 2013), todavia, até o presente momento poucos estudos envolvendo respostas fisiológicas e características ecológicas ponderadas pela filogenia foram realizados em ectotermos (Secor & Diamond, 2000).

c) *Metabolismo Energético em Serpentes:*

As serpentes são animais ectotérmicos e, assim sendo, não geram quantidades significativas de energia térmica através de seu próprio metabolismo a ponto de manterem constantes suas temperaturas corpóreas (Huey, 1982; Lillywhite, 1987). A ectotermia nestes animais está relacionada a uma constantemente necessidade de

adequação de suas temperaturas corporais através da termorregulação comportamental ou, em outros casos, uma vida termoconformadora, muitas vezes fora de seu intervalo térmico ótimo (Cowles & Bogert, 1944; Hertz *et al.*, 1993). Entretanto, a condição ectotérmica também permite que as serpentes sejam relativamente mais econômicas com relação ao consumo de seus substratos energéticos (Pough, 1980; 1983; Andrews & Pough, 1985). Diferentemente dos vertebrados endotérmicos, cujo gasto energético para a manutenção da temperatura corporal representa grande parte do orçamento diário, o baixo custo de manutenção das serpentes possibilita que muitas espécies possam viver com uma quantidade de alimento relativamente pequena quando comparadas a endotérmicos de mesma massa corpórea (Andrews & Pough, 1985; Chappell & Ellis, 1987).

A taxa metabólica aeróbia das serpentes pode ser estimada em laboratório ou em campo através de diferentes técnicas, sendo que a viabilidade e a precisão do procedimento utilizado podem variar bastante (Butler *et al.*, 2004). O uso de isótopos de hidrogênio e oxigênio na estimativa da produção de gás carbônico é especialmente útil em trabalhos de campo interessados em medir custos metabólicos gerais em um período relativamente longo (Speakman & Racey, 1988a; b; Nagy, 1989; Nagy *et al.*, 1999; Butler *et al.*, 2004; Bronikowski & Vleck, 2010). Mensurações do consumo de oxigênio e da produção de gás carbônico por respirometria, são os meios mais utilizados nos estudos de taxas metabólicas de repouso e durante o aumento metabólico digestório em

serpentes, permitindo o acompanhamento da taxa metabólica por longos períodos, sob regimes controlados de temperatura e fotoperíodo. (Andrade *et al.*, 1997; Sievert & Andreadis, 1999; McCue, 2006b; Secor, 2009; Gavira & Andrade, 2013b; a).

Dentre as serpentes, os viperídeos (juntamente com boídeos e pythonídeos) figuram entre aquelas de menor custo de manutenção, geralmente, apresentando baixos padrões de atividade e uma frequência alimentar especialmente baixa (Secor & Diamond, 2000; Beaupre & Zaidan, 2001; Mori *et al.*, 2002; Dorcas *et al.*, 2004). Mensurações das taxas metabólicas de repouso em períodos de atividade (TMR, taxa metabólica de repouso), bem como as taxas de repouso padrão (TMRP, taxa metabólica de repouso padrão) obtidas durante o repouso no período de inatividade dos animais mostraram-se especialmente menores do que as taxas metabólicas de outras serpentes colubróideas (principalmente Colubridae). Estas diferenças são geralmente relacionadas a duas características destes animais: (1) a tática de forrageio e (2) a frequência alimentar (Secor & Diamond, 2000).

Os viperídeos, bem como a maioria dos boídeos e pythonídeos, são considerados, preponderantemente, caçadores de emboscada, estratégia associada a um baixo dispêndio energético durante o forrageamento (Secor & Diamond, 1997; Secor & Diamond, 2000; Beaupre & Zaidan, 2001; Campbell & Lamar, 2004; Ott & Secor, 2007), assim como animais que se alimentam infrequentemente e de presas proporcionalmente grandes (Cundall & Greene, 1982; Secor & Nagy, 1994; Andrade *et*

al., 1997; Greene, 1997; Zaidan & Beaupre, 2003; Beaupre, 2005; Secor, 2009)

Diferentemente dos viperídeos, outras serpentes, dentre elas, boa parte da família Colubridae são consideradas animais de forrageamento preponderantemente ativo, alimentando-se de forma mais frequente e de presas proporcionalmente menores (Secor & Diamond, 2000; Hopkins *et al.*, 2004; Roe *et al.*, 2004; Bessler *et al.*, 2010; Greene *et al.*, 2013).

Segundo Secor e Diamond (2000) as serpentes de alimentação infrequente apresentam taxas metabólicas de repouso especialmente baixas quando comparadas as taxas de espécies que se alimentam de modo mais frequente, fato este que parece estar fortemente relacionado à drástica diminuição da massa metabolicamente ativa de órgãos como o fígado, o estômago e o intestino durante os períodos de jejum.

Para exemplificar tal fato, Secor (comunicação pessoal) muniu-se do seguinte exemplo: *“Imaginemos que estamos parados com nosso carro em frente a uma linha férrea aguardando que um trem passe para que possamos seguir caminho. Caso o trem possua poucos vagões é conveniente mantermos o carro ligado para que não gastemos combustível durante uma nova ignição, todavia, caso o trem seja muito longo e com muitos vagões, desligar o carro e religá-lo após a passagem do último vagão pode ser mais vantajoso em termos de gasto de combustível. Se imaginarmos o trem como o intervalo entre as alimentações das serpentes, podemos então compreender as diferentes estratégias fisiológicas dos animais de alimentação frequente que mantêm*

seus órgãos metabolicamente ativos (motor ligado) e dos animais de alimentação infrequente que mantêm vários de seus órgãos em estado senescente (desligam o motor) até que tenham uma nova oportunidade de alimentar-se, quando elevam rapidamente as taxas metabólicas a altos níveis para torná-los aptos a digestão (nova ignição)”.

O fato é que, para as serpentes que se alimentam de modo infrequente, a digestão de presas de grandes proporções gera um grande aumento metabólico no período pós-prandial, o qual pode durar vários dias (Andrade *et al.*, 1997; Secor, 2009; Gavira & Andrade, 2013). Este aumento metabólico pós-prandial (AMPP) está presente em todos os vertebrados estudados até hoje, porém é a sua enorme magnitude nas serpentes de alimentação infrequente que chama a atenção (Secor & Diamond, 1998; Ott & Secor, 2008). O AMPP é caracterizado pelo aumento da taxa metabólica acima dos valores de repouso (TMRP ou TMR) e, geralmente, é estudado com relação a sua duração, pico metabólico atingido e magnitude ao longo do processo (Fig. 1.1). A gênese do aumento metabólico pós-prandial nas serpentes ainda é bastante discutida (Secor, 2003; McCue, 2006b; Enok *et al.*, 2013); todavia, parece estar ligada ao aumento abrupto da secreção ácida pelo estômago, produção aumentada de enzimas proteolíticas, aumento da atividade de transportadores no epitélio intestinal, hipertrofia das vilosidades intestinais, hipertrofia hepática entre outros processos particularmente superdimensionados nos animais caracterizados por um baixo custo de manutenção durante a fase de jejum (Toledo *et al.*, 2003; Lignot *et al.*, 2005). Secor (2003) propôs

que a maior parte deste aumento metabólico deve-se a atividade da bomba de prótons que leva a acidificação estomacal. Entretanto, Enok e colaboradores (2013), num estudo bastante elegante propuseram que a maior parte desta resposta deve-se na verdade ao grande aumento na síntese proteica.

Fatores relacionados ao tipo e a quantidade de alimento ingerido, assim como a temperatura em que a digestão está sendo processada, influenciam a amplitude e o tempo de duração do aumento metabólico pós-prandial (Andrade *et al.*, 1997; Secor, 2003; McCue *et al.*, 2005; McCue, 2006b; Secor, 2007). A proporção de alimento parece afetar de maneira positiva o AMPP, sendo este maior quanto maior a proporção de alimento ingerida (Secor, 2009) (Fig. 1.2). Já a temperatura parece afetar muito mais a forma com que este aumento metabólico se apresenta do que a quantidade de energia dispendida. Temperaturas mais elevadas geralmente levam a eventos com duração mais curta e com maiores picos metabólicos, ao passo que temperaturas mais baixas levam a eventos de maior duração e com picos metabólicos menores (McCue, 2006b) (Fig. 1.2). O tipo de alimento também causa diferenças no AMPP, já que o valor energético da presa e o custo de processamento digestório não estão linearmente relacionados (Secor & Boehm, 2006; Bessler *et al.*, 2010).

Figura 1.1: Representação gráfica dos componentes do aumento metabólico pós-prandial (AMPP). Estão representados: a taxa metabólica de repouso padrão (TMRP), o tempo até o pico metabólico (Tpeak), a duração do AMPP e o escopo metabólico (EM) que é calculado dividindo-se o valor da taxa metabólica do pico pelo valor do TMRP. O valor total do AMPP é calculado através da determinação da área sobre a curva diminuída do valor do TMRP. (Figura baseada em McCue, 2006)

Figura 1.2: A) Variação do AMPP mediante a ingestas de diferentes massas (40% e 20% do peso corporal da serpente), note o aumento nos parâmetros do AMPP conforme o aumento na proporção de massa ingerida. B) Variação do AMPP em função da temperatura, note que apesar do AMPP mudar a forma (pico e duração) a área sobre a curva (valor total do AMPP) não mudou para ambos os regimes térmicos.

d) As serpentes do gênero Bothrops como sistemas-modelo para o estudo dos padrões evolutivos das taxas metabólicas.

O gênero *Bothrops* pertence à família Viperidae e representa a maior irradiação da subfamília Crotalinae na América do Sul, contando com 43 espécies neste continente, três espécies na América Central e uma única espécie na América do Norte, sendo presentes tanto nas áreas continentais como em porções insulares (Campbell & Lamar, 2004). As serpentes do gênero *Bothrops* estão dispersas pelos mais diversos habitats, ocupando desde áreas xéricas até florestas densas (Oliveira & Martins, 2001; Marques *et al.*, 2002; Valdujo *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2003; Campbell & Lamar, 2004; Hartmann *et al.*, 2005; Barbo *et al.*, 2012) (Fig. 1.3 e 1.4). Sua distribuição latitudinal vai desde as florestas subtropicais do México até a Patagônia Argentina. A diversidade do gênero também é refletida na grande variação morfológica do grupo, que contém desde animais bastante alongados, como *Bothrops taeniata*, até animais extremamente robustos como no caso de *Bothrops alternatus*. Com relação ao tamanho total, as serpentes *Bothrops* variam desde animais com menos de 70 cm, como *Bothrops itapetiningae*, até animais de porte avantajado com mais de 200 cm de comprimento, como *Bothrops asper* (Martins *et al.*, 2002; Campbell & Lamar, 2004). O substrato ocupado por estes animais na natureza também é variável, sendo que o gênero possui desde espécies absolutamente terrícolas (*Bothrops alternatus*) até animais essencialmente arborícolas (*Bothrops bilineata*), com uma considerável gradação do

nível de arboreabilidade entre ambos os extremos e que também varia em função da ontogenia (Martins *et al.*, 2001; Oliveira & Martins, 2001; Martins *et al.*, 2002).

As serpentes do gênero *Bothrops* predam uma enorme gama de animais na natureza e, embora a grande maioria das espécies seja tida como predadores generalistas, dietas bastante específicas também são verificadas em algumas espécies (Martins & Gordo, 1993; Egler *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 2002; Valdujo *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006; Marques & Sazima, 2009). Este é o caso, por exemplo, de *Bothrops alternatus* e *Bothrops insularis* (Martins *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2012), sendo a primeira especialista em mamíferos, sem aparente mudança ontogenética na dieta, enquanto a segunda é especialista em aves migratórias durante sua fase adulta. A maior parte das espécies generalistas apresenta certa variação ontogenética em relação à dieta, passando do consumo de pequenos animais ectotérmicos durante a fase juvenil para pequenos endotérmicos durante a fase adulta (Sazima, 1991; Martins *et al.*, 2002), com a captura, até mesmo, de invertebrados por algumas espécies do gênero (p.ex. *B. alcatrazes*). O engodo caudal está presente na maioria das serpentes do gênero e tende a desaparecer conforme o desenvolvimento, permanecendo presente apenas nas espécies que mantêm uma grande proporção de animais ectotérmicos na dieta mesmo quando adultos (Sazima, 1991; Martins *et al.*, 2002) e sendo ausente em *B. alternatus*.

A maioria das serpentes do gênero *Bothrops* possui hábitos noturno-crepusculares e caçam preponderantemente por espreita, ainda que variações nestes padrões possam ocorrer (Sazima, 1992; Egler *et al.*, 1996; Oliveira & Martins, 2001), alimentam-se, aparentemente, infrequentemente e são capazes de ingerir presas de grandes proporções, o que dita, em grande parte, os ritmos metabólicos destes animais durante a vida. (Stuginski *et al.*, 2011).

A monofilia de *Bothrops sensu lato* é pouco refutada; ainda que algumas hipóteses filogenéticas considerem o grupo como parafilético com relação à *Bothriopsis* (Parkinson, 1999; Wuster *et al.*, 2005; Castoe & Parkinson, 2006; Fenwick *et al.*, 2009; Carrasco *et al.*, 2012). A inclusão de *Bothriopsis* no gênero *Bothrops*, ou a fragmentação do gênero em outros gêneros distintos vem sendo discutida no intuito de resolver esta questão (Wüster *et al.*, 2002; Campbell & Lamar, 2004; Fenwick *et al.*, 2009, Carrasco *et al.*, 2012). No presente trabalho optamos por seguir a proposta de Carrasco e colaboradores (2012).

As características ecológicas e fisiológicas do gênero *Bothrops*, unidas a sua diversidade de espécies, credenciam o gênero a constituir um interessante sistema-modelo para estudos fisiológicos que avaliem a interação dos fatores ontogenéticos e filogenéticos nos padrões evolutivos das taxas metabólicas de repouso e pós-prandiais.

Os trabalhos realizados até o momento avaliaram respostas fisiológicas de algumas espécies do gênero. Cruz-Neto e Abe (1994) avaliaram a relação alométrica

das taxas metabólicas de repouso de *Bothrops moojeni*, demonstrando que as inclinações das retas alométricas da espécie eram condizentes com as inclinações previamente determinadas para outras espécies de serpentes. Em 2011, Stuginski e colaboradores avaliaram, pela primeira vez, os efeitos termogênicos decorrentes do aumento metabólico pós-prandial para a mesma espécie (*B. moojeni*) (Stuginski *et al.*, 2011) e recentemente Gavira e Andrade (2013a e 2013b) avaliaram o efeito da temperatura e da proporção alimentar, no AMPP de *Bothrops alternatus*. Todavia, até o presente momento, nenhum trabalho avaliou comparativamente as respostas metabólicas das diferentes espécies do gênero.

As diferentes características ecológicas do grupo levantam intrigantes questões acerca de suas taxas metabólicas, dentre elas: (1) As serpentes do gênero variam suas taxas metabólicas de acordo com a filogenia? (2) Espécies de ambientes com menos recursos alimentares apresentam taxas metabólicas mais baixas do que espécies de ambientes com recursos abundantes? (3) A diversidade com relação à dieta pode influenciar o AMPP? (4) As curvas metabólicas para o gênero *Bothrops* são próximas àquelas calculadas para outros viperídeos?

Estas e muitas outras questões acerca das taxas metabólicas do gênero estão ainda por serem elucidadas e tais respostas poderão ajudar na compreensão da ecofisiologia de *Bothrops*, bem como contribuir para a melhor compreensão de como o metabolismo energético influencia a história evolutiva dos viperídeos.

Figura 1.3: Indivíduos adultos e a distribuição das espécies. a) *Bothrops atrox* (São Bento-MA); b) *Bothrops alternatus* (Araraquara-SP); c) *Bothrops erythromelas* (Natal-RN).

Figura 1.4: Indivíduos adultos e a distribuição das espécies. a) *Bothrops jararacussu* (Jquitiba-SP); b) *Bothrops jararaca* (Jquitiba-SP).

e) *Respirometria:*

Em termos práticos a respirometria é o conjunto de técnicas que nos permite a quantificação indireta do metabolismo aeróbio de um organismo através do consumo de oxigênio e/ou produção de gás carbônico (Chauí-Berlinck & Bicudo, 2006).

O metabolismo aeróbio utiliza o oxigênio comoceptor final de elétrons da cadeia respiratória, assim sendo, a quantidade de oxigênio consumida está associada à energia utilizada durante a atividade aeróbia celular. A respiração em si é, tecnicamente, um processo de combustão lenta de substratos energéticos (alimentos) e por sua vez, o consumo de um litro de oxigênio para esta combustão em condições padrões de temperatura e pressão é equivalente a cerca 4,8Kcal (20,1KJ).

A origem da respirometria remonta ao final do século XVIII quando Lavoisier, trabalhando juntamente com Laplace, determinou o consumo de oxigênio e a produção de gás carbônico na cobaia. Nove anos mais tarde ele estabeleceu o consumo de oxigênio no homem durante o repouso, digestão e resfriamento do corpo (Chauí-Berlinck & Bicudo, 2006). Cem anos mais tarde Max Rubner consolidou a técnica através de provas experimentais conclusivas de que o princípio de conservação de energia era válido para os seres vivos. Desde então a respirometria foi tornando-se cada vez mais utilizada nos estudos metabólicos e novas ferramentas mais precisas de medida foram sendo introduzidas. O avanço constante no desenvolvimento das probes de

detecção de sinais, dos computadores e de outros aparelhos utilizados na respirometria nos últimos 50 anos levou as medidas metabólicas a um novo patamar, permitindo detecção de sinais extremamente pequenos em tempo real e com bastante precisão.

As técnicas respirométricas podem ser divididas em três categorias: respirometria fechada, respirometria aberta e a respirometria intermitente que une elementos de ambas as anteriores. Basicamente o que difere as técnicas é a condição em que o sinal é gerado e o modo de seu cálculo. Sucintamente, na técnica fechada o animal gerador de sinal fica confinado em um sistema (câmara metabólica) cuja concentração fracionária de gases é conhecida em tempo t_0 e após um intervalo de tempo uma amostra da concentração fracionária dos gases é retirada desta câmara e analisada (determinada a concentração de O_2 e/ou CO_2 em um analisador de gases após a secagem do ar). As outras duas técnicas (aberta e intermitente) foram utilizadas nos experimentos do presente trabalho e serão descritas a seguir mais detalhadamente.

1) Respirometria Aberta:

A respirometria aberta é a técnica que permite a mensuração do consumo de oxigênio de um gerador de sinal (p.ex., uma serpente) através da medida da diferença da concentração fracionária de oxigênio entre a entrada (entrada de ar da câmara metabólica) e a saída (saída de ar da câmara metabólica) do sistema submetido a um fluxo de ar e levando-se em conta a dinâmica do sistema. Nela existe um fluxo de ar

considerado constante cuja concentração fracionária de gases da entrada é previamente conhecida (geralmente ar atmosférico) e a concentração fracionária de gases da saída (O_2 e/ou CO_2) é determinada através de um analisador de gases após a retirada do vapor de água. No caso de uma leitura de O_2 independente do CO_2 (como foi realizado no presente trabalho) o gás carbônico é também previamente absorvido antes que o ar procedente da saída da câmara seja analisado (Fig. 1.5 e 1.6).

Quando o registro da porção dinâmica do registro é importante para o estudo (porção anterior ao regime permanente) são necessárias algumas transformações do sinal obtido para que a dinâmica do sistema seja compensada. Todavia, em situações aonde a medida é feita após o estabelecimento de um regime permanente (o consumo não varia ao longo do tempo da medida), como no caso das medidas realizadas no presente trabalho, a seguinte equação define o sistema:

$$VO_2 = \Phi \cdot (F_e O_2 - F_s O_2 / 1 - F_s O_2)$$

aonde:

VO_2 é o volume de oxigênio consumido

$F_e O_2$ é a fração de oxigênio na entrada do sistema

$F_s O_2$ é a fração de oxigênio na saída do sistema

Φ é o fluxo do sistema

A respirometria aberta é a técnica de eleição para medições em tempo real e é especialmente interessante nos casos aonde o gerador de sinal em questão (animal)

apresenta uma taxa metabólica alta. A respirometria aberta pode ainda ser a única alternativa tecnicamente viável quando o gerador de sinal trata-se de um endotermo de grande porte e neste caso o uso de máscaras ao invés de câmaras são geralmente necessários. O “calcanhar de Aquiles” da respirometria aberta é a medida de animais muito pequenos e/ou com taxas metabólicas muito baixas. Nestes casos é necessário que o gerador de sinal (p.ex. um filhote de serpente) fique algum tempo confinado na câmara fechada para que o seu consumo possa ser detectado como sinal (diferença entre a porcentagem de O₂ da entrada e da saída do sistema) e neste caso optamos pela respirometria fechada ou, como no presente trabalho, pela respirometria intermitente.

II) *Respirometria Intermitente*

A respirometria intermitente também é uma técnica que permite a mensuração do consumo de oxigênio de um gerador de sinal (p.ex. uma serpente) através da medida da diferença da concentração fracionária de oxigênio entre a entrada (entrada de ar da câmara metabólica) e a saída (saída de ar da câmara metabólica) do sistema, todavia, diferentemente da respirometria aberta que mantém o sistema “aberto para a atmosfera” durante todo o processo (fluxo constante de ar), na respirometria intermitente o contato com o ar atmosférico é interrompido num tempo T_0 com isso o gerador de sinal (p.ex. uma serpente) vai consumindo o O_2 e produzindo CO_2 dentro da câmara metabólica isolada (sem troca de ar com a atmosfera). Decorrido o intervalo de tempo de “fechamento” desejado num tempo T_f a câmara é “lavada” com ar atmosférico, por um fluxo de ar conhecido. Durante a lavagem o ar da saída da câmara é seco, tem seu conteúdo de CO_2 removido (no caso de uma leitura independente de O_2) e o conteúdo de oxigênio é analisado em função do tempo de lavagem até que a concentração de O_2 do ar da saída da câmara seja igual à concentração do ar atmosférico (tempo T_{f2}). A representação gráfica deste processo é a de uma curva de concentração de O_2 na qual a partir do tempo T_f de lavagem a concentração de O_2 vai caindo (já que o ar de dentro da câmara possui uma concentração fracionária de O_2 menor) até atingir um mínimo (Nadir) e a partir daí vai aumentando até que no tempo T_{f2} da lavagem a concentração de oxigênio igualou-se a concentração fracionária de O_2 atmosférico (Figura 1.5).

O consumo de oxigênio pode então ser obtido através do cálculo da integral da curva multiplicada pelo fluxo de lavagem (Fig. 1.7).

A respirometria intermitente tem como grande vantagem a possibilidade de se fazer a mensuração de taxas metabólicas de geradores de sinal pequenos (animais de pequeno porte ou com taxas metabólicas muito baixas) já que devido ao seu “fechamento” este sinal é amplificado ao longo do tempo, ou seja, a concentração fracionária de oxigênio é diminuída ao longo do tempo até que o sinal seja grande o suficiente para que possa ser detectado pela probe. A maior desvantagem da técnica esta relacionada a impossibilidade de se ter uma medida precisa em tempo real já que não é possível distinguir dentro do consumo total computado no intervalo de fechamento se houve diferenças de consumo em diferentes momentos dentro deste intervalo (momentos entre T_f e T_{f2}).

Figura 1.7: Registro de respirometria intermitente (*B. alternatus* filhote). O animal é mantido sob a mesma concentração fracionária de O_2 atmosférico através de uma bomba auxiliar com um fluxo até o tempo T_0 em que o fluxo de ar é interrompido. Transcorrido o intervalo de tempo desejado a câmara é conectada ao circuito de medida no momento T_f representado na figura pela letra (A). A partir do qual o ar da câmara passa a ser “lavada”. O primeiro momento da lavagem é representado por uma forte queda na concentração fracionária de O_2 até um valor mínimo (nadir) representado graficamente pela letra (B). A partir deste ponto a concentração fracionária de oxigênio volta a subir até que atinja novamente os valores atmosféricos T_{f2} (D). A letra (C) representa o tempo total de lavagem da câmara. Nota-se que previamente os valores atmosféricos anteriores a (A) estão sendo obtidos através da leitura de uma câmara branca (câmara sem nenhum animal para gerar o sinal) para servirem como linha de base para a medida. Os valores de O_2 são obtidos pelo cálculo da integral da curva multiplicada pelo fluxo de lavagem.

1.1 Referências Bibliográficas:

- Andrade, D. V.; Cruz-Neto, A. P. & Abe, A. S. (1997). "Meal Size and Specific Dynamic Action in the Rattlesnake *Crotalus Durissus* (Serpentes : Viperidae)." Herpetologica **53**(4): 485-493.
- Andrews, R. M. & Pough, F. H. (1985). "Metabolism of Squamate Reptiles - Allometric and Ecological Relationships." Physiological Zoology **58**(2): 214-231.
- Barbo, F. E.; Grazziotin, F. G.; Sazima, I.; Martins, M. & Sawaya, R. J. (2012). "A New and Threatened Insular Species of Lancehead from Southeastern Brazil." Herpetologica **68**(3): 418-429.
- Beaupre, S. J. (2005). "Ratio Representations of Specific Dynamic Action (Mass-Specific Sda and Sda Coefficient) Do Not Standardize for Body Mass and Meal Size." Physiological and Biochemical Zoology **78**(1): 126-131.
- Beaupre, S. J. & Zaidan, F. (2001). "Scaling of Co₂ Production in the Timber Rattlesnake (*Crotalus Horridus*), with Comments on Cost of Growth in Neonates and Comparative Patterns." Physiological and Biochemical Zoology **74**(5): 757-768.
- Bedford, G. S. & Christian, K. A. (1998). "Standard Metabolic Rate and Preferred Body Temperatures in Some Australian Pythons." Australian Journal of Zoology **46**(4): 317-328.
- Bessler, S. M.; Stubblefield, M. C.; Ultsch, G. R. & Secor, S. M. (2010). "Determinants and Modeling of Specific Dynamic Action for the Common Garter Snake (*Thamnophis Sirtalis*)." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **88**(8): 808-820.
- Blomberg, S. P.; Garland, T. & Ives, A. R. (2003). "Testing for Phylogenetic Signal in Comparative Data: Behavioral Traits Are More Labile." Evolution **57**(4): 717-745.
- Bronikowski, A. & Vleck, D. (2010). "Metabolism, Body Size and Life Span: A Case Study in Evolutionarily Divergent Populations of the Garter Snake (*Thamnophis Elegans*)." Integrative and Comparative Biology **50**(5): 880-887.
- Butler, P. J.; Green, J. A.; Boyd, I. L. & Speakman, J. R. (2004). "Measuring Metabolic Rate in the Field: The Pros and Cons of the Doubly Labelled Water and Heart Rate Methods." Functional Ecology **18**(2): 168-183.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (2004). *Venomous of the Western Hemisphere*, Cornell University, Press, Ithaca, New York. v.1.
- Carrasco, P. A.; Mattoni, C. I.; Leynaud, G. C. & Scrocchi, G. J. (2012). "Morphology, Phylogeny and Taxonomy of South American Bothropoid Pitvipers (Serpentes, Viperidae)." Zoologica Scripta **41**(2): 109-124.

- Castoe, T. A. & Parkinson, C. L. (2006). "Bayesian Mixed Models and the Phylogeny of Pitvipers (Viperidae : Serpentes)." Molecular Phylogenetics and Evolution **39**(1): 91-110.
- Chappell, M. A. & Ellis, T. M. (1987). "Resting Metabolic Rates in Boid Snakes - Allometric Relationships and Temperature Effects." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **157**(2): 227-235.
- Chauí-Berlinck, J. G. & Bicudo, J. E. P. W. (2006). *Respirometria, a Técnica* 1ed, Editora Santos: São Paulo.
- Christian, K.; Webb, J. K.; Schultz, T. & Green, B. (2007). "Effects of Seasonal Variation in Prey Abundance on Field Metabolism, Water Flux, and Activity of a Tropical Ambush Foraging Snake." Physiological and Biochemical Zoology **80**(5): 522-533.
- Cowles, R. B. & Bogert, C. M. (1944). "A Preliminary Study of the Thermal Requirements of Desert Reptiles." Bulletin of the American Museum of Natural History **83**: 263-296.
- Cruzneto, A. P. & Abe, A. S. (1994). "Ontogenic Variation of Oxygen-Uptake in the Pitviper Bothrops moojeni (Serpentes, Viperidae)." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **108**(4): 549-554.
- Cundall, D. & Greene, H. (1982). "Evolution of the Feeding Apparatus in Alethinophidian Snakes." American Zoologist **22**(4): 924-924.
- Dlugosz, E. M.; Chappell, M. A.; Meek, T. H.; Szafranska, P. A.; Zub, K.; Konarzewski, M.; Jones, J. H.; Bicudo, J.; Nespolo, R. F.; Careau, V. & Garland, T. (2013). "Phylogenetic Analysis of Mammalian Maximal Oxygen Consumption During Exercise." Journal of Experimental Biology **216**(24): 4712-4721.
- Dorcas, M. E.; Hopkins, W. A. & Roe, J. H. (2004). "Effects of Body Mass and Temperature on Standard Metabolic Rate in the Eastern Diamondback Rattlesnake (Crotalus Adamanteus)." Copeia(1): 145-151.
- Egler, S. G.; Oliveira, M. E. & Martins, M. (1996). *Bothrops Atrox* (Common Lancehead), Foraging Behavior and Ophiophagy. *Herpetol. Rev.* **27**: 22-23.
- Enok, S.; Simonsen, L. S. & Wang, T. (2013). "The Contribution of Gastric Digestion and Ingestion of Amino Acids on the Postprandial Rise in Oxygen Consumption, Heart Rate and Growth of Visceral Organs in Pythons." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **165**(1): 46-53.
- Felsenstein, J. (1985). "Phylogenies and the Comparative Method." American Naturalist **125**(1): 1-15.
- Fenwick, A. M.; Gutberlet, R. L.; Evans, J. A. & Parkinson, C. L. (2009). "Morphological and Molecular Evidence for Phylogeny and Classification of South American Pitvipers, Genera Bothrops, Bothriopsis, and Bothrocophias (Serpentes: Viperidae)." Zoological Journal of the Linnean Society **156**(3): 617-640.

- Garland, T.; Harvey, P. H. & Ives, A. R. (1992). "Procedures for the Analysis of Comparative Data Using Phylogenetically Independent Contrasts." Systematic Biology **41**(1): 18-32.
- Garland, T. & Ives, A. R. (2000). "Using the Past to Predict the Present: Confidence Intervals for Regression Equations in Phylogenetic Comparative Methods." American Naturalist **155**(3): 346-364.
- Gavira, R. S. B. & Andrade, D. V. (2013a). "Meal Size Effects on the Postprandial Metabolic Response of Bothrops Alternatus (Serpentes: Viperidae)." Zoologia **30**(3): 291-295.
- Gavira, R. S. B. & Andrade, D. V. (2013b). "Temperature and Thermal Regime Effects on the Specific Dynamic Action of Bothrops Alternatus (Serpentes, Viperidae)." Amphibia-Reptilia **34**(4): 483-491.
- Gladden, L. B. (1996). Lactate Transport and Exchange During Exercise. In: Rowell, L. and Shepherd, J.. Handbook of Physiology. exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems., Oxford Univ. Press: 614-648.
- Grafen, A. (1989). "The Phylogenetic Regression." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **326**(1233): 119-157.
- Greene, H. W. (1997). Snakes: The Evolution of Mystery in Nature. London, *Univers. Californ. Press*.
- Greene, S.; McConnachie, S.; Secor, S. & Perrin, M. (2013). "The Effects of Body Temperature and Mass on the Postprandial Metabolic Responses of the African Egg-Eating Snakes Dasypeltis Scabra and Dasypeltis Inornata." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **165**(2): 97-105.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. (2006). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology with Student Consult Online Access* (11th Ed.), Philadelphia: Elsevier Saunders. ISBN 0-7216-0240-1.
- Hartmann, M. T.; Hartmann, P. A.; Cechin, S. Z. & Martins, M. (2005). "Feeding Habits and Habitat Use in Bothrops Pubescens (Viperidae, Crotalinae) from Southern Brazil." Journal of Herpetology **39**(4): 664-667.
- Hertz, P. E.; Huey, R. B. & Stevenson, R. D. (1993). "Evaluating Temperature Regulation by Field-Active Ectotherms - the Fallacy of the Inappropriate Question." American Naturalist **142**(5): 796-818.
- Hochachka, P. W. & Somero, G. N. (2002). **Biochemical Adaptation : Mechanism and Process in Physiological Evolution.**, Oxford University Press. Oxford ; New York.
- Hopkins, W. A.; Roe, J. H.; Philippi, T. & Congdon, J. D. (2004). "Standard and Digestive Metabolism in the Banded Water Snake, Nerodia Fasciata Fasciata." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **137**(1): 141-149.

Huey, R. B. (1982). Temperature Physiology and Ecology of Reptiles. *Biology of Reptilia*. (Edited by Gans C. and Pough F. H.), Academic press, London. **v.12**: 25-91.

Lignot, J. H.; Helmstetter, C. & Secor, S. M. (2005). "Postprandial Morphological Response of the Intestinal Epithelium of the Burmese Python (*Python Molurus*)."
Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **141**(3): 280-291.

Lillywhite, H. B. (1987). Temperature, Energetics, and Physiological Ecology. *In snakes: Ecology and Evolutionary Biology*. (Edited by Seigel R. A.; Collins J. T. And Novak S. S.), Macmillan, New York.: 422-477.

Marques, O. A. V.; Martins, M.; Develey, P. F.; Macarrao, A. & Sazima, I. (2012). "The Golden Lancehead Bothrops Insularis (Serpentes: Viperidae) Relies on Two Seasonally Plentiful Bird Species Visiting Its Island Habitat." Journal of Natural History **46**(13-14): 885-895.

Marques, O. A. V.; Martins, M. & Sazima, I. (2002). "A New Insular Species of Pitviper from Brazil, with Comments on Evolutionary Biology and Conservation of the Bothrops Jararaca Group (Serpentes, Viperidae)." Herpetologica **58**(3): 303-312.

Marques, O. A. V. & Sazima, I. (2009). "Old Habits Die Hard: Mouse Handling by a Pitviper Species on a Rodent-Free Island." Amphibia-Reptilia **30**(3): 435-438.

Martins, E. P. & Garland, T. (1991). "Phylogenetic Analyses of the Correlated Evolution of Continuous Characters - a Simulation Study." Evolution **45**(3): 534-557.

Martins, E. P. & Hansen, T. F. (1997). "Phylogenies and the Comparative Method: A General Approach to Incorporating Phylogenetic Information into the Analysis of Interspecific Data." American Naturalist **149**(4): 646-667.

Martins, M.; Araujo, M. S.; Sawaya, R. J. & Nunes, R. (2001). "Diversity and Evolution of Macrohabitat Use, Body Size and Morphology in a Monophyletic Group of Neotropical Pitvipers (Bothrops)." Journal of Zoology **254**: 529-538.

Martins, M. & Gordo, M. (1993). *Bothrops Atrox* (Common Lancehead), Diet,. *Herpetol. Rev.* **24**: 151-152.

Martins, M.; Marques, O. A. V. & Sazima, I. (2002). Ecological and Phylogenetic Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers (Genus *Bothrops*). In: Schuett G. W.; Hoggren M.; Douglas M. E. And Greene H. W. In *Biology of the Vipers*, Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, UT.: 307-328.

McCue, M. D. (2006a). "Cost of Producing Venom in Three North American Pitviper Species." Copeia(4): 818-825.

McCue, M. D. (2006b). "Specific Dynamic Action: A Century of Investigation." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **144**(4): 381-394.

- McCue, M. D.; Bennett, A. F. & Hicks, J. W. (2005). "The Effect of Meal Composition on Specific Dynamic Action in Burmese Pythons (*Python Molurus*).¹" Physiological and Biochemical Zoology **78**(2): 182-192.
- Monteiro, C.; Montgomery, C. E.; Spina, F.; Sawaya, R. J. & Martins, M. (2006). "Feeding, Reproduction, and Morphology of *Bothrops Mattogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal." Journal of Herpetology **40**(3): 408-413.
- Mori, A.; Toda, M. & Ota, H. (2002). Winter Activity of *Ovophis Okinavensis* in the Humid Subtropics: Foraging on Breeding Frogs under Cool Temperature. In Schuett G. W.; Hoggren M.; Douglas M. E. And Greene H. W. In *Biology of the Vipers*, Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, UT.
- Nagy, K. A. (1989). "Field Bioenergetics - Accuracy of Models and Methods." Physiological Zoology **62**(2): 237-252.
- Nagy, K. A. (2000). "Energy Costs of Growth in Neonate Reptiles." Herpetological Monographs(14): 378-387.
- Nagy, K. A.; Girard, I. A. & Brown, T. K. (1999). "Energetics of Free-Ranging Mammals, Reptiles, and Birds." Annual Review of Nutrition **19**: 247-277.
- Nogueira, C.; Sawaya, R. J. & Martins, M. (2003). "Ecology of the Pitviper, *Bothrops Moojeni*, in the Brazilian Cerrado." Journal of Herpetology **37**(4): 653-659.
- Oliveira, M. E. & Martins, M. (2001). When and Where to Find a Pitviper: Activity Patterns and Habitat Use of the Lancehead *bothrops Atrox* in Central Amazonia, Brazil. Herpetological Natural History **8**: 101-110.
- Ott, B. D. & Secor, S. M. (2007). "Adaptive Regulation of Digestive Performance in the Genus *Python*." Journal of Experimental Biology **210**(2): 340-356.
- Pagel, M. (1999). "Inferring the Historical Patterns of Biological Evolution." Nature **401**(6756): 877-884.
- Parkinson, C. L. (1999). "Molecular Systematics and Biogeographical History of Pitvipers as Determined by Mitochondrial Ribosomal DNA Sequences." Copeia(3): 576-586.
- Pough, F. H. (1980). The Advantages of Ectothermy for Tetrapods. *Am. Nat.* . **115**: 92-112.
- Pough, F. H. (1983). Amphibians and Reptiles as Low-Energy Systems. In *Behavioral Energetics: The Cost of survival in Vertebrates* (W, P, Aspley and S,I Lustyc), *Ohio State Univers, Press*, Columbus. **141-188**.
- Revell, L. J.; Harmon, L. J. & Collar, D. C. (2008). "Phylogenetic Signal, Evolutionary Process, and Rate." Systematic Biology **57**(4): 591-601.
- Reynolds, P. S. & Lee, R. M. (1996). "Phylogenetic Analysis of Avian Energetics: Passerines and Nonpasserines Do Not Differ." American Naturalist **147**(5): 735-759.

- Roe, J. H.; Hopkins, W. A.; Snodgrass, J. W. & Congdon, J. D. (2004). "The Influence of Circadian Rhythms on Pre- and Post-Prandial Metabolism in the Snake *Lamprophis Fuliginosus*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **139**(2): 159-168.
- Rohlf, F. J. (2001). "Comparative Methods for the Analysis of Continuous Variables: Geometric Interpretations." Evolution **55**(11): 2143-2160.
- Sazima, I. (1991). "Caudal Luring in 2 Neotropical Pitvipers, *Bothrops Jararaca* and *B. Jararacussu*." Copeia(1): 245-248.
- Sazima, I. (1992). natural History of the Jararaca Pitviper, *bothrops Jararaca*, in Southeastern Brazil. In: Biology of the pitvipers. Campbell, J. A.; Brodie, E. D., Tyler, Texas, EUA: Selva.: 199-216.
- Schmidt-Nielsen, K. (1997). *Animal Physiology: Adaptation and Environment*, Cambridge & New York: Cambridge University Press.
- Secor, S. (2007). "The Python Model: New Insights in the Regulation of Gastrointestinal and Cardiovascular Performance." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **148**: S103-S103.
- Secor, S. M. (2003). "Gastric Function and Its Contribution to the Postprandial Metabolic Response of the Burmese Python *Python Molurus*." Journal of Experimental Biology **206**(10): 1621-1630.
- Secor, S. M. (2009). "Specific Dynamic Action: A Review of the Postprandial Metabolic Response." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **179**(1): 1-56.
- Secor, S. M. & Boehm, M. (2006). "Specific Dynamic Action of Ambystomatid Salamanders and the Effects of Meal Size, Meal Type, and Body Temperature." Physiological and Biochemical Zoology **79**(4): 720-735.
- Secor, S. M. & Diamond, J. (1997). "Determinants of the Postfeeding Metabolic Response of Burmese Pythons, *Python Molurus*." Physiological Zoology **70**(2): 202-212.
- Secor, S. M. & Diamond, J. M. (2000). "Evolution of Regulatory Responses to Feeding in Snakes." Physiological and Biochemical Zoology **73**(2): 123-141.
- Secor, S. M. & Nagy, K. A. (1994). "Bioenergetic Correlates of Foraging Mode for the Snakes *Crotalus-Cerastes* and *Masticophis-Flagellum*." Ecology **75**(6): 1600-1614.
- Sievert, L. M. & Andreadis, P. (1999). "Specific Dynamic Action and Postprandial Thermophily in Juvenile Northern Water Snakes, *Nerodia Sipedon*." Journal of Thermal Biology **24**(1): 51-55.
- Speakman, J. R. & Racey, P. A. (1988a). "Consequences of Non Steady-State Co₂ Production for Accuracy of the Doubly Labeled Water Technique - the Importance of Recapture Interval." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **90**(2): 337-340.

Speakman, J. R. & Racey, P. A. (1988b). "The Doubly-Labeled Water Technique for Measurement of Energy-Expenditure in Free-Living Animals." Science Progress **72**(286): 227-237.

Stuginski, D. R.; Fernandes, W.; Tattersall, G. J. & Abe, A. S. (2011). "Postprandial Thermogenesis in Bothrops moojeni (Serpentes: Viperidae)." Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases **17**(3): 287-292.

Toledo, L. F.; Abe, A. S. & Andrade, D. V. (2003). "Temperature and Meal Size Effects on the Postprandial Metabolism and Energetics in a Boid Snake." Physiological and Biochemical Zoology **76**(2): 240-246.

Valdujo, P. H.; Nogueira, C. & Martins, M. (2002). "Ecology of Bothrops neuwiedi pauloensis (Serpentes : Viperidae : Crotalinae) in the Brazilian Cerrado." Journal of Herpetology **36**(2): 169-176.

Wuster, W.; Duarte, M. R. & Salomao, M. D. (2005). "Morphological Correlates of Incipient Arboreality and Ornithophagy in Island Pitvipers, and the Phylogenetic Position of Bothrops insularis." Journal of Zoology **266**: 1-10.

Zaidan, F. & Beaupre, S. J. (2003). "Effects of Body Mass, Meal Size, Fast Length, and Temperature on Specific Dynamic Action in the Timber Rattlesnake (Crotalus horridus)." Physiological and Biochemical Zoology **76**(4): 447-458.

Capítulo 2

“Efeitos da Ocupação de Diferentes Ambientes, da Ontogenia e do Hábito Alimentar Sobre as Taxas Metabólicas de Serpentes do Gênero *Bothrops* (Crotalinae), com Especial Ênfase Sobre as Relações Filogenéticas”.

2.0 Resumo

As taxas metabólicas de repouso padrão (TMRP) representam grande parte do custo energético diário das serpentes e estão intimamente associadas aos ritmos de vida destes animais. A hipótese vigente prediz que estas taxas estão essencialmente associadas a frequência alimentar das diferentes espécies a despeito da filogenia. Todavia, até o presente momento nenhum teste baseado nos contrastes filogenéticos havia sido utilizado para validar esta hipótese. O presente trabalho determinou e comparou as TMRP de 5 espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* em função da massa, filogenia e habitat ocupado. Os resultados foram somados a dados de taxa metabólica de repouso de outras 46 espécies (presentes na literatura) para que pudéssemos testar, utilizando a ponderação filogenética, a hipótese de que a frequência alimentar é o fator determinante nas taxas de repouso das serpentes. Os resultados obtidos pela análise filogenética apontam para um forte sinal filogenético ($\lambda \approx 1$) e falta de influência da estratégia

alimentar nas taxas metabólicas de repouso. Tais resultados vão na contramão da hipótese vigente e levantam a questão sobre a complexidade das respostas metabólicas das serpentes, a necessidade de dados ecológicos acurados e os problemas das generalizações de tais preceitos para um grupo tão diversificado.

2.01 Abstract

The standard metabolic rates (SMR) represent a large part of the daily energy cost of snakes and are closely related to the life rhythms of these animals. The current hypothesis predicts that SMR are primarily associated with the feeding frequency of the different species despite the phylogeny. However, up to the present time, no test based on phylogenetic contrasts was used to validate this hypothesis. This study determined and compared the SMR of 5 species of the genus *Bothrops* considering body mass, phylogeny and habitat. The results were summed with data of the metabolic rates of 46 other species and then we tested the hypothesis that feeding frequency is the determining factor in resting metabolic rates of snakes, using a phylogenetic method. The results indicate a strong phylogenetic signal ($\lambda \approx 1$) and lack of influence of feeding strategy in resting metabolic rates. These results contrasts with the current hypothesis and raise questions about of the complexity of metabolic responses of snakes, the necessity of accurate ecological data and the problematics of generalizations of such precepts for such a diverse group.

2.1. Introdução

O baixo consumo energético parece ser um dos fatores de grande influência na evolução dos répteis (Andrews & Pough, 1985; Secor & Diamond, 1998; Secor & Diamond, 2000). De maneira geral, um baixo custo de manutenção permite que um animal possa sobreviver com uma quantidade menor de recursos alimentares e explore habitats nem sempre ocupados por outros grupos animais (Pough, 1980; 1983). As serpentes são um grupo ecologicamente diverso e essa diversidade é refletida em seu grande número de espécies, em sua grande variação de tamanho, na diversidade de habitats ocupados bem como nos hábitos reprodutivos e alimentares (Greene, 1997). Assim, é possível concluir que a demanda metabólica dentro deste grupo também varie bastante entre as espécies; (Andrews & Pough, 1985; Dmiel, 1986; Chappell & Ellis, 1987; Cruzneto & Abe, 1994; Secor & Diamond, 1997; Bedford & Christian, 1998; Secor, 2000; Secor & Diamond, 2000; McCue & Lillywhite, 2002; Dorcas *et al.*, 2004; Hopkins *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2008; Bronikowski & Vleck, 2010; Greene *et al.*, 2013). Uma das teorias vigentes acerca da variação da taxa metabólica aeróbia das serpentes prediz que serpentes que se alimentam de maneira infrequente apresentam taxas metabólicas de repouso proporcionalmente menores do que aquelas que se alimentam mais frequentemente (Secor & Diamond, 2000). Em linhas gerais, tal hipótese baseia-se no fato de que animais que se alimentam infrequentemente mantêm parte de seus órgãos e tecidos em estado de mínima atividade

durante o jejum, ao passo que animais que se alimentam frequentemente devem manter os órgãos responsáveis pela digestão em um estado mais ativo, já que existe a possibilidade do próximo evento alimentar ocorrer em breve.

Em seu trabalho, Secor e Diamond (2000) analisaram uma série de fenômenos fisiológicos durante o processo digestório de 8 espécies diferentes de serpentes que apresentavam modos alimentares distintos na natureza (os dados de frequência foram obtidos através de observações de campo e estudos ecológicos). Para tanto, utilizaram a metodologia de contrastes independentes (Felsenstein, 1985) na tentativa de ponderar a filogenia na análise. A taxa metabólica de repouso padrão (TMRP) também foi avaliada, todavia, sua análise foi feita utilizando as ferramentas estatísticas tradicionais. Ao término do trabalho os autores concluíram, entre outras coisas, que a variação nas taxas metabólicas de repouso padrão (TMRP) entre os táxons era influenciada essencialmente pela estratégia alimentar, independentemente das relações filogenéticas entre os grupos. Todavia, dentre as principais críticas a este trabalho, destacam-se o pequeno número de espécies utilizadas, a distribuição irregular dessas espécies dentro da filogenia de serpentes, a não utilização da ponderação filogenética na avaliação do TMRP e o uso de uma hipótese filogenética pouco robusta (uma vez que foi utilizada uma árvore com fragmentos de outras árvores conhecidas), o que pode ter exercido influências indesejáveis nas análises.

Atualmente, acredita-se que as análises com ponderação filogenética sejam uma importante ferramenta na comparação de características fisiológicas entre diferentes táxons (Felsenstein, 1985; Garland *et al.*, 1992; Freckleton *et al.*, 2002; Blomberg *et al.*, 2003; Garland *et al.*, 2005; Dlugosz *et al.*, 2013). O conhecimento das relações filogenéticas e a determinação da influência de outras características sobre as taxas metabólicas de repouso podem auxiliar na compreensão dos determinantes ecológicos envolvidos. Para isso é necessário um número de espécies adequado e uma filogenia robusta das linhagens utilizadas (Blomberg *et al.*, 2003; Revell *et al.*, 2008). Felizmente, as taxas metabólicas de repouso das serpentes tem sido alvo de estudos recorrentes nas últimas décadas (Andrews & Pough, 1984; Dm'iel, 1986; Chapell & Ellis, 1987; Cruz-Neto & Abe, 1994; Bedford & Christian, 1998, Secor & Diamond, 2000; McCue & Lillywhite, 2002; Hopkins *et al.*, 2003; Dorcas *et al.*, 2004; Christian *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2008; Bronikowski & Vleck, 2010; Greene *et al.*, 2013) e tal fato juntamente com um grande avanço nos estudos filogenéticos dos Squamatas (Pyron *et al.*, 2013) podem enfim possibilitar uma compreensão mais ampla da relação entre a taxa metabólica de repouso, filogenia e estratégia alimentar.

Estudo das taxas metabólicas de repouso nas serpentes do gênero Bothrops.

As modificações da taxa metabólica ao longo da ontogenia assim como as relações filogenéticas devem ser determinantes nos estudos metabólicos acerca do custo de manutenção das serpentes (Chappell & Elis, 1987; Dorcas *et al.*, 2004) e uma das maneiras de se estudar esta questão é através determinação de como a taxa metabólica de repouso (TMR ou TMRP) varia em função da massa de animais adultos e filhotes.

As serpentes do gênero *Bothrops* representam a maior irradiação de Crotalinae dentro da América do Sul, estando virtualmente presentes em quase todos os habitats do continente (Martins *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002; Campbell & Lamar, 2004). Apresentam uma grande diversificação ecológica (ver introdução: *As serpentes do gênero Bothrops como sistemas-modelo para o estudo dos padrões evolutivos das taxas metabólicas*) e são as responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos no continente (Queiroz *et al.*, 2008). Entretanto, apesar de algumas de suas espécies serem relativamente bem estudadas no tocante a ecologia e a toxiconologia, pouco se sabe a respeito de seu metabolismo energético (Cruzneto & Abe, 1994; Stuginski *et al.*, 2011; Gavira & Andrade, 2013a; b). Aparentemente, as serpentes do gênero *Bothrops* tal qual a maioria dos demais Crotalinae aferidos até o momento apresentam taxas metabólicas de repouso relativamente baixas (Dorcas *et al.*, 2004) que são, geralmente, associadas aos baixos níveis de atividade e a estratégia de forrageamento. Todavia, pouco se sabe a respeito de como estas taxas variam ao longo de seu desenvolvimento e menos ainda

acerca de como estas taxas variam entre as espécies do grupo que ocupam habitats de diferentes características. Neste contexto, a determinação e comparação das taxas metabólicas de repouso ao longo do desenvolvimento são especialmente interessantes para a compreensão de como o alocamento de energia afeta a vida destes animais e de como fatores ecológicos e filogenéticos interagem com este balanço energético.

O trabalho referente a este capítulo tem como objetivos específicos: 1) determinar as taxas metabólicas de repouso padrão (TMRP) ao longo da ontogenia de cinco espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* ; 2) testar a hipótese de que serpentes provenientes de locais que, aparentemente, tem uma menor disponibilidade de recursos (*Bothrops erythromelas*) apresentam menor taxa metabólica aeróbia em comparação com espécies de ambientes mais providos de recursos alimentares, independente da proximidade filogenética entre elas 3) utilizar os dados gerados somados a dados disponíveis na literatura para calcular o sinal filogenético da taxa metabólica de repouso em serpentes. 4) testar a hipótese de que serpentes de habito alimentar infrequente possuem taxas metabólicas mais baixas do que serpentes que se alimentam de modo mais frequente.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1) Determinação das taxas metabólicas de repouso em *Bothrops*

a) Animais.

Entre os anos de 2009 e 2012 foram utilizadas 93 serpentes, entre filhotes, jovens e adultos, do gênero *Bothrops* das espécies: *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararacussu* e *B. jararaca* provenientes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Cujas massas variaram conforme apresentado na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Massa corpórea das espécies de *Bothrops* utilizadas neste trabalho.

Espécie	Intervalo de massa(g)	Média de massa(g)	N
<i>B. atrox</i>	4-600g	195,3g	14
<i>B. alternatus</i>	12-450g	111,07g	24
<i>B. erythromelas</i>	7-340g	118,7g	15
<i>B. jararacussu</i>	9,6-350g	107,7g	20
<i>B. jararaca</i>	8-370g	116,5g	20

Os valores representam o intervalo de massas registradas, a média do grupo e o número de indivíduos utilizados para cada espécie.

Os animais foram mantidos durante o período experimental no próprio biotério do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, em sala com temperatura variando entre 20°C e 30°C e fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro). As serpentes foram mantidas individualizadas dentro de caixas plásticas medindo 56,4 x 38,5 x 20,1 cm

fornecidas com papelão corrugado. A água foi fornecida *ad libitum* e a alimentação (*Mus musculus* provenientes do biotério central do Instituto Butantan) oferecida a cada 15 dias no caso dos filhotes e a cada 30 dias no caso de animais adultos. Trinta dias antes das medidas, a alimentação foi suspensa para evitar as modificações que ocorrem durante o período pós-prandial nestes animais. Durante todo o período experimental as serpentes foram monitoradas quanto à alimentação, ecdise e crescimento.

Todos os passos envolvidos neste trabalho foram julgados e acompanhados pela Comissão Interna de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação, do Instituto Butantan, sobre os aspectos éticos do projeto à luz dos princípios elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

b) *Medida da Taxa Metabólica*

b1) *Aparelhagem*

A mensuração das taxas de consumo de O_2 (VO_2) durante o repouso (TMRP) foi realizada no Laboratório de Ecofisiologia do Instituto de Biociências da USP, São Paulo, Brasil. Foi utilizado um sistema de respirometria fechada no caso das serpentes jovens e filhotes e um sistema de respirometria aberta no caso de adultos. Para tanto foi utilizado um analisador de oxigênio PA-1 (Sable Systems), acoplado a uma bomba de sucção e a um Fluxímetro (Omega Engineering Inc.). No caso do sistema aberto foram utilizadas bombas auxiliares (VigorAr). A amostra de ar foi seca através de resina

dessecante (Ascarite) e teve seu conteúdo de CO₂ absorvido (Drierite) antes de entrar no analisador de gases. Os sinais emitidos pelo analisador foram então enviados a um computador onde a análise dos dados foi feita automaticamente por um sistema de aquisição executado pelo programa Expedata (Sable Systems). Os fluxos utilizados variaram conforme a necessidade (entre 100 e 700 ml) e os valores obtidos foram convertidos para STPD, como descrito em (Dejours, 1981), segundo as condições de pressão barométrica e temperatura do experimento.

b2) Procedimento de Medida

Os animais foram previamente submetidos a um jejum alimentar de 30 dias, pesados e então colocados individualmente em câmaras respirométricas de acrílico cujo volume variou entre 450 e 3300 ml conforme o tamanho dos animais, montadas dentro de uma câmara climática (Eletrolab®) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Antes do início das análises os animais foram aclimatados nestas condições por 48 horas. As medidas de VO₂ foram realizadas durante 7 a 10 dias, de 3 a 8 vezes por dia durante a fotofase e scotofase. Seguindo a metodologia proposta por Roe e colaboradores (2004) foram utilizados como valores representativos da taxa metabólica de repouso padrão (TMRP) as medidas dos primeiros quartis de valores obtidos durante a fase de repouso dos animais (fotofase). Através deste procedimento foram removidos quaisquer valores que pudessem estar relacionados à outra condição dos animais.

c) Análise dos Dados Metabólicos de Bothrops:

Os valores de massa corpórea e VO_2 foram logaritimizados e regressões do $\text{Log}_{10}\text{VO}_2$ pelo $\text{Log}_{10}(\text{massa})$ foram geradas. Assim, foram determinados os expoentes e os coeficientes de massa corpórea em relação à taxa metabólica. As regressões foram comparadas através de ANCOVA, onde foi utilizada a espécie como variável categórica, o $\text{Log}_{10}(\text{massa})$ corpórea como cofator e o $\text{Log}_{10}\text{VO}_2$ como variável dependente. As inclinações e os interceptos dessas relações foram comparados entre si e o nível de significância adotado foi de 0,05.

2.2.3) Obtenção dos dados Pré-existentes e Análise Filogenética

Além dos resultados gerados em nosso trabalho para as cinco espécies de *Bothrops* utilizadas, valores de taxas metabólicas de repouso (TMR e TMRP) foram obtidos através de levantamento bibliográfico (Web of Knowledge). Os dados brutos ou médias foram utilizados quando estes eram disponíveis. Para os trabalhos que apresentaram apenas as equações metabólicas, foi gerado um valor utilizando uma massa comum à espécie (dentro do intervalo de massas disponíveis nos estudos). Trabalhos que apresentaram apenas valores de produção de gás carbônico (VCO_2) e valores de quociente respiratório para 25°C tiveram os valores de VO_2 calculados para cada espécie. Os valores de VO_2 também foram calculados para os trabalhos que apresentaram os valores de quociente de temperatura (Q_{10}) e forneceram dados das

medidas em temperaturas diferentes de 25°C. Três espécies para as quais foram obtidos os valores de VO_2 (*Dasypeltis inornata*, *Helicops modestus* e *Pseudonaja nuchalis*) não estão presentes na filogenia utilizada (Pyrón et al., 2013) e foram substituídas por espécies do mesmo gênero e filogeneticamente próximas (*Dasypeltis atra*, *Helicops infrataeniatus* e *Pseudonaja textilis* respectivamente).

Para a análise integrada dos resultados, foi gerada uma tabela relacionando as espécies, suas massas corpóreas, os valores de VO_2 no repouso e a estratégia de alimentação (alimentação frequente ou infrequente). As categorias alimentares de cada espécie foram determinadas conforme a literatura presente, ainda que para algumas espécies foram generalizadas as tendências do grupo seguindo o proposto pela teoria de forrageamento (Huey & Pianka, 1981). A tabela 2.2 mostra as espécies e as frequências determinadas.

Tabela 2.2: Valores de massa, VO_2 (ml/h) e frequências alimentares (IF = infrequentes, F= frequentes) das espécies utilizadas na análise. Os tipos de dados de repouso (TMR = taxa metabólica de repouso ou TMRP = taxa metabólica de repouso padrão) para cada um dos trabalhos também está representado na tabela.

Espécie	Massa (g)	VO_2	Freq.	TMR/TMRP	Fontes
<i>Acrantophis dumerili</i>	1030	10,09	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Lichanura trivirgata</i>	350	5,77	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Candoia carinata</i>	500	6,132	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Gongylophis colubrinus</i>	160	3,252	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Boa constrictor</i>	5000	55,774	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Corallus hortulanus</i>	1400	19,06	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Corallus caninus</i>	890	12,247	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Epicrates cenchria</i>	800	12,138	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Python molurus</i>	700	11,64	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)

<i>Python sebae</i>	700	13,9	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Python curtus</i>	763	10,4	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Python regius</i>	715	10,37	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Broghammerus reticulatus</i>	730	15,24	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Morelia spilota</i>	2020	36,41	IF	TMR	(Chappell & Ellis, 1987)
<i>Viridovipera stejnegeri</i>	70	2,294	IF	TMR	(Tsai <i>et al.</i> , 2008)
<i>Bothrops alternatus</i>	440	6,023	IF	TMRP	Presente estudo
<i>Bothrops jararaca</i>	350	4,309	IF	TMRP	Presente estudo
<i>Bothrops erythromelas</i>	340	3,493	IF	TMRP	Presente estudo
<i>Bothrops jararacussu</i>	350	5,787	IF	TMRP	Presente estudo
<i>Bothrops atrox</i>	600	7,6456	IF	TMRP	Presente estudo
<i>Bothrops moojeni</i>	500	40,778	IF	TMR	(Cruz-Neto & Abe, 1994)
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	500	2,762	IF	TMRP	(McCue & Lillywhite, 2002)
<i>Crotalus cerastes</i>	190	3,032	IF	TMRP	(Secor & Nagy, 1994)
<i>Crotalus horridus</i>	500	6,425	IF	TMRP	(Beaupre & Zaidan, 2001)
<i>Crotalus molossus</i>	610	4,455	IF	TMRP	(Beaupre, 1993)
<i>Crotalus atrox</i>	640	9,547	IF	TMRP	(Beaupre & Duvall, 1998)
<i>Crotalus adamanteus</i>	800	16,288	IF	TMRP	(Dorcas <i>et al.</i> , 2004)
<i>Acanthophis praelongus</i>	600	12,684	IF	TMR	(Christian <i>et al.</i> , 2007)
<i>Dasypeltis scabra</i>	100	3,199	F	TMRP	(Greene <i>et al.</i> , 2013)
<i>Masticophis flagellum</i>	130	3,593	F	TMRP	(Secor & Nagy, 1994)
<i>Nerodia fasciata</i>	40	2,086	F	TMRP	(Hopkins <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lampropeltis fuliginosus</i>	17	0,7	F	TMRP	(Roe <i>et al.</i> , 2004)
<i>Dasypeltis inornata*</i>	62	1,7	F	TMRP	(Greene <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pantherophis guttata</i>	800	30,4	F	TMR	(Smith, 1976)
<i>Helicops modestus**</i>	196	7,84	F	TMR	(Abe & Mendes, 1980)
<i>Lampropeltis getulus</i>	1217	34,08	F	TMR	(Davies, 1982)
<i>Liophis miliaris</i>	401	19,24	F	TMR	(Abe & Mendes, 1980)
<i>Thamnophis butleri</i>	19	1,21	F	TMRP	(Kamel & Gatten, 1983)
<i>Vipera berus</i>	100	8,3	IF	TMRP	(Lourdais <i>et al.</i> , 2013)
<i>Vipera aspis</i>	100	4,67	IF	TMRP	(Lourdais <i>et al.</i> , 2013)
<i>Cerastes cerastes</i>	120	3,12	IF	TMR	(Alsadoon, 1991)
<i>Malpolon moilensis</i>	145	7,94	F	TMR	(Alsadoon, 1991)

<i>Acrochordus arafurae</i>	1048	22,45	IF	TMRP	(Bedford & Christian, 1998)
<i>Aspidites melanocephala</i>	1027	42,9	IF	TMRP	(Bedford & Christian, 1998)
<i>Antaresia childreni</i>	332	13,04	IF	TMRP	(Bedford & Christian, 1998)
<i>Liasis fuscus</i>	1307	20,26	IF	TMRP	(Bedford & Christian, 1998)
<i>Antaresia stimsoni</i>	361	19,56	IF	TMRP	(Bedford & Christian, 1998)
<i>Liasis olivaceus</i>	3000	53	IF	TMRP	(Bedford & Christian, 1998)
<i>Pseudonaja nuchalis</i> ***	214	8,9	F	TMRP	(Bedford & Christian, 1998)
<i>Thamnophis sirtalis</i>	52	2,89	F	TMR	(Birchard <i>et al.</i> , 1984)
<i>Thamnophis elegans</i>	44	2,11	F	TMR	(Hicks & Riedesel, 1983)

Espécies utilizadas nas análises filogenéticas substituindo as espécies aferidas nos trabalhos: * *Dasypeltis atra*, ** *Helicops infrataeniatus*, *** *Pseudonaja textilis*.

Foram geradas duas matrizes de dados, sendo a primeira composta pelos valores de TMRP agrupados com valores de TMR (conjunto amplo) e a segunda contendo apenas os dados referentes ao TMRP (conjunto restrito). Os valores de VO₂ foram então corrigidos para a massa corpórea de acordo com Blomberg *et al.* (2003). Sucintamente, a correção dos valores de VO₂ pela massa e a determinação do sinal filogenético foram realizadas da seguinte forma: 1) os dados de massa e VO₂ foram logaritimizados, em seguida foram computados os contrastes para ambas as características 2) foi gerada uma regressão de mínimos quadrados (GLS) destes contrastes e calculada a inclinação desta reta (b) 3) a inclinação foi utilizada para computarmos os valores do carácter original corrigido pela massa através da fórmula Log [VO₂(massa^b)] 4). Os valores corrigidos foram usados para avaliar a influência da estratégia alimentar sobre a taxa metabólica através de uma análise de mínimos quadrados generalizados, levando em conta a filogenia das espécies (Figuras 2.1 e 2.2).

O coeficiente de determinação do sinal filogenético utilizado foi λ , onde λ próximos a 1 obedecem a um modelo de evolução browniana dentro da filogenia e valores próximos a zero são indicativos que os dados se ajustam melhor a outro modelo de evolução (Pagel, 1999). O sinal filogenético da variável categórica estratégia alimentar foi calculado através da estatística D para variáveis binárias com 1000 permutações. As análises foram realizadas através da plataforma R (Pacotes: Geiger, phytools, caper, nmle).

Figura 2.1: Árvore filogenética utilizada na análise da matriz completa. Baseada em Pyron *et al.*, 2013

Figura 2.2:Árvore filogenética utilizada na análise da matriz restrita. Baseada em Pyron *et al.*, 2013.

2.3. Resultados

2.3.1 Taxa Metabólica de Repouso Padrão (TMRP) de *Bothrops*

As regressões lineares individuais obtidas para cada uma das espécies estão apresentadas na tabela 2.3. Entre as diferentes espécies analisadas houve uma homogeneidade entre as inclinações das retas à excessão de *B. jararacussu* e *B. jararaca* ($p < 0,05$). A figura 2.3 mostra as diferentes regressões de $\text{Log}_{10}\text{VO}_2$ e $\text{Log}_{10}(\text{massa})$. Os interceptos divergiram significativamente entre (*B. atrox* e *B. alternatus*), (*B. erythromelas* e *B. alternatus*), (*B. erythromelas* e *B. jararaca*) e (*B. jararacussu* e *B. alternatus*) (tabela 2.4).

Tabela 2.3: Regressões lineares do consumo de oxigênio (VO_2) e massa corpórea das espécies de *Bothrops*

Espécie	Equação da regressão	R ²
<i>B. atrox</i>	$\text{Log}(\text{VO}_2) = -1,136 + 0,727 * X$	0,934
<i>B. alternatus</i>	$\text{Log}(\text{VO}_2) = -0,856 + 0,619 * X$	0,942
<i>B. erythromelas</i>	$\text{Log}(\text{VO}_2) = -0,953 + 0,591 * X$	0,897
<i>B. jararacussu</i>	$\text{Log}(\text{VO}_2) = -1,0362 + 0,707 * X$	0,972
<i>B. jararaca</i>	$\text{Log}(\text{VO}_2) = -0,8589 + 0,587 * X$	0,901

As regressões foram construídas sobre o logaritmo na base 10. Os valores de VO_2 estão representados como mL/h e de massa corpórea em gramas.

Tabela 2.4: Análise dos interceptos das regressões lineares entre a taxa de consumo de oxigênio (VO₂) e a massa corpórea das espécies de *Bothrops*.

sp	<i>B. atrox</i>	<i>B. alternatus</i>	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. jararacussu</i>
<i>B. atrox</i>				
<i>B. alternatus</i>	F=5,840 p<0,05			
<i>B. erythromelas</i>	F=1,275 p=0,270	F=19,41 p<0,05		
<i>B. jararacussu</i>	F=1,933 p=0,175	F=4,473 P<0,05	F=0,145 p=0,706	
<i>B. jararaca</i>	F=4,197 p=0,05	F=2,822 p=0,101	F=4,462 p<0,05	inclinações diferentes

As regressões foram construídas sobre o logaritmo na base 10. Os valores de VO₂ estão representados como mL/h e de massa corpórea em gramas.

Figura 2.3: Regressão linear entre a taxa de consumo de oxigênio (VO₂) e massa corpórea nas diferentes espécies de *Bothrops*. As regressões foram construídas sobre o logaritmo na base 10. Os valores de VO₂ estão representados como mL/h e de massa corpórea em gramas. Ba: *Bothrops alternatus*; Bax: *Bothrops atrox*; Be: *Bothrops erythromelas*; Bj: *Bothrops jararaca*; Bjs: *Bothrops jararacussu*.

2.3.2 Análise Filogenética:

A análise do conjunto amplo dos dados de taxa metabólica das serpentes pelo método proposto por Blomberg e colaboradores (2003) revelou um alto sinal filogenético ($\lambda=0,967$). Todavia não foi detectada qualquer influência do tipo de estratégia alimentar nas taxas metabólicas de repouso dos animais ($p=0,984$, $GL=51,49$ residuais).

Considerando apenas as taxas metabólicas de repouso padrão (TMRP) das serpentes, a análise também revelou um sinal filogenético alto ($\lambda=1,055$). Ainda assim novamente nenhuma influência das diferentes estratégias alimentares foi detectada ($p=0,326$ $GL=27$, residual 23). Também foram calculados os valores individuais de λ para as variáveis numéricas: VO_2 ($\lambda=0,999$; $p<0,01$), massa corpórea ($\lambda=0,999$; $p<0,01$), e VO_2 corrigido pela massa corpórea ($\lambda=0,999$; $p<0,01$). O sinal filogenético da variável categórica foi $D=-0,5244$ com probabilidade de um resultado randômico de 0,003.

2.4 Discussão:

2.4.1) Taxa metabólica das serpentes do gênero *Bothrops*

A massa corpórea exerceu grande influência nas taxas metabólicas de todas as espécies de *Bothrops* empregadas neste estudo, sendo que o expoente de massa corpórea (inclinação da reta) determinado para o conjunto das cinco espécies (0,655) e o intervalo

das inclinações específicas (0,598 - 0,727) foram bastante próximos da maioria das inclinações calculadas para as espécies de viperídeos até o momento (Secor & Nagy, 1994; Beaupre & Zaidan, 2001; McCue & Lillywhite, 2002; Dorcas *et al.*, 2004). Os resultados deste estudo sobre os expoentes de massa corpórea são bastante similares àqueles encontrados por Cruz-Neto e Abe em 1994, para as taxas metabólicas de repouso (TMR) de *Bothrops moojeni* (0,67-0,77), apesar dos valores dos interceptos serem significativamente menores. Esta diferença nos interceptos deve-se, provavelmente, as diferenças na técnica usada na determinação das taxas metabólicas de repouso. Os resultados do TMRP para *B. alternatus* também diferem um pouco daqueles encontrados por Gavira & Andrade (2013a), diferença esta que pode estar no fato dos autores terem utilizado a TMR média e feito medidas em um intervalo de tempo menor do que o presente trabalho (1 dia no trabalho de Gavira & Andrade vs. 10 dias neste estudo). O resultado do uso do primeiro quartil para a determinação do TMRP neste trabalho vai de acordo com os achados de Hopkins e colaboradores (2003) e Roe e colaboradores (2004) para *Nerodia fasciata* e *Lamprophis fuliginosus* respectivamente, onde a estimativa da taxa metabólica de repouso através da utilização do quartil inferior parece estar menos sujeita ao efeito de valores distantes do valor médio. Os menores valores de taxa metabólica das *Bothrops* apresentaram-se bastante próximos das taxas metabólicas do quartil inferior do conjunto de dados; todavia, a utilização do valor mínimo deve ser feita com cautela e pode ser especialmente

problemática no caso de animais com taxas metabólicas baixas. Em especial no caso de serpentes pouco ativas que podem apresentar períodos longos de apneia voluntária. Nestes casos, se as medidas forem realizadas em um pequeno intervalo de tempo, é possível que algum desses momentos seja detectado levando a uma subestimação da taxa metabólica aeróbia. Por outro lado, a utilização das médias do período pode incorrer no problema oposto, já que qualquer aumento de atividade pode interferir na medida gerando uma superestimativa caso estes aumentos de atividade não sejam prontamente detectados e descartados. Além disso, o monitoramento por câmeras e o acompanhamento do animal por todo o período de medição é especialmente importante nestes casos.

A análise interespecífica dos interceptos revela que *B. erythromelas* não apresentou a menor taxa metabólica aeróbia quando comparada as demais espécies de *Bothrops* utilizadas neste trabalho, não sendo significativamente diferente das taxas metabólicas de *B. atrox* e *B. jararacussu*. *Bothrops erythromelas* é um animal de ambiente árido (caatinga), ao passo que as demais serpentes do estudo ocupam áreas florestadas (*B. atrox*, *B. jararaca* e *B. jararacussu*) e áreas de cerrado (*B. alternatus*) (Campbell & Lamar, 2004). Trabalhos com outros grupos animais demonstraram que espécies que ocupam habitats onde supostamente a produtividade primária e a disponibilidade de alimento são menores, tendem a ter taxas metabólicas mais baixas do que seus congêneres de áreas com maior disponibilidade de recursos (Mautz & Nagy, 1988;

Lovegrove, 2000; Mautz & Nagy, 2000), ainda que alguma controvérsia exista a este respeito (Pianka & Vitt, 2006). A hipótese de que animais de ambientes com menos oferta alimentar apresentem menores taxas metabólicas baseia-se no fato que menores taxas metabólicas significam um menor consumo energético, logo, uma menor necessidade alimentar-se, algo especialmente relevante em áreas com pouca densidade de presas. Contudo, essa hipótese não foi corroborada para as serpentes do gênero *Bothrops* deste estudo. Uma das possíveis explicações para esta aparente divergência reside nas próprias características intrínsecas aos Crotalinae. As baixas taxas metabólicas do grupo e os baixos níveis de atividade aliados aos hábitos de forrageamento pouco custosos podem, por si só, serem suficientemente econômicos para permitirem sua irradiação em ambientes com poucos recursos alimentares (ver Martins *et al.*, 2002; Campbell & Lamar, 2004). O mesmo padrão aparece quando comparamos as taxas metabólicas de repouso padrão de certas espécies do gênero *Crotalus*, onde as linhagens de ambientes mais áridos (como *C. atrox* e *C. cerastes*) não parecem diferir neste aspecto de linhagens de zonas mais florestadas (como *C. adamanteus*, *C. lepidus* e *C. horridus*, ver Secor & Nagy, 1994; Dorcas *et al.*, 2004). É possível que estes animais de zona árida, como no caso de *B. erythromelas*, poupem energia restringindo os períodos de atividade, diminuindo suas taxas de deslocamento ou mesmo através de manobras fisiológicas que permitam uma redução ainda maior da taxa metabólica sazonalmente durante os períodos de diminuição de oferta alimentar (p.

ex. períodos de seca). Todavia, até o momento faltam indícios e estudos que avaliem tais aspectos ecológicos e fisiológicos destes animais. É possível que a quantidade de recursos alimentares limite relativamente pouco a distribuição dos viperídeos. Uma vida de baixos custos de manutenção pode ser vantajosa na colonização e ocupação de ambientes pouco favoráveis a outras espécies, algo observado não somente nas serpentes de zonas áridas como também naqueles animais de ilhas, cuja alimentação está absolutamente sujeita a flutuações sazonais (como por exemplo, nos casos de *B. insulares* e *G. shedaoensis*) (Shine & Sun, 2002; Sun *et al.*, 2002; Marques & Sazima, 2009) A densidade populacional destas serpentes nos diferentes habitats ocupados também poderia estar associada, entre outras coisas, a escassez de recursos alimentares, todavia, apesar de nenhum trabalho ter avaliado as diferentes densidades populacionais das serpentes do gênero *Bothrops* na caatinga e nas áreas florestadas, indícios de áreas com recursos limitados sazonalmente apontam o contrário, já que ao menos duas das maiores densidades populacionais de serpentes ocorrem em ambientes sujeitos a uma alta variação sazonal de recursos (Ilha de Shedao e Ilha da Queimada Grande) (Sun *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2012) Por outro lado já foi detectada uma expressiva diminuição na população de *Vipera berus* associada a uma diminuição na disponibilidade de roedores. (Lindell & Forsman, 1996). Assim, é possível que haja uma diferença consistente entre como as diferentes espécies de Viperidae lidam com a escassez de recursos. Coincidentemente, *Vipera berus* apresenta uma taxa metabólica de

repouso muito mais elevada do que os Crotalinae aqui estudados (cerca de 4 vezes maior do que a taxa metabólica de *B. jararaca* quando padronizadas para 100g de serpente, por exemplo). A carência de informações ecológicas sobre a real oferta de recursos alimentares a *B. erythromelas* na caatinga contribuem para os questionamentos acerca da ausência de diferenças contundentes nas taxas metabólicas de repouso dos animais deste grupo em relação a outras do gênero, como *B. atrox*. Ainda assim, devido ao paralelismo com outras espécies de viperídeos de zonas áridas e a aparentemente menor disponibilidade de presas neste tipo de ambiente, é possível que a disponibilidade de recursos não exerça um papel determinante sobre as taxas metabólicas aeróbias de repouso de *B. erythromelas*. Contudo, novos estudos ecológicos que abordem especificamente a disponibilidade dos itens predados por estes animais são necessários para o maior embasamento desta proposta.

Nenhum padrão filogenético ou ecológico relacionado à taxa metabólica aeróbia é evidente nos resultados deste estudo. Grupos supostamente irmãos como *B. erythromelas* e *B. jararaca*, não apresentaram taxas metabólicas de repouso mais próximas entre si do que entre as outras espécies, *B. atrox* e *B. jararacussu* (outro grupo filogeneticamente próximo) apresentaram taxas metabólicas próximas entre si, contudo indiferenciadas com relação à *B. erythromelas*, além disso, *B. alternatus* (grupo irmão de todas as demais *Bothrops* aferidas no estudo) apesar de ter apresentado uma TMRP superior a *B. atrox*, *B. jararacussu* e *B. erythromelas*, não apresentou qualquer diferença

significativa quando comparado a *B. jararaca*. Ainda que generalizações acerca das taxas metabólicas de *Bothrops* devam ser feitas com cautela, os indícios apontados por este trabalho sugerem que o uso de diferentes habitats ou hábitos alimentares são indicadores fracos das taxas metabólicas de repouso neste gênero.

2.4.2) *Análise das taxas metabólicas de repouso através da ponderação filogenética*

O uso da análise de ponderação filogenética é uma ferramenta bastante adequada para a comparação entre características de diferentes espécies (Felsenstein, 1985; Freckleton, 2002; Blomberg *et al.*, 2003). Ainda assim, tais ferramentas têm sido pouco utilizadas em análises de características fisiológicas dos ectotermos (Secor & Diamond, 2000). Dois dos maiores limitantes neste tipo de análise são: 1) o número de espécies envolvido que, em geral, deve ser grande e representativo; e 2) o conhecimento de uma filogenia robusta para os táxons avaliados (Blomberg *et al.*, 2003).

Na matriz geral os dados foram compilados de maneira mais “relaxada”, agrupando medidas de TMR e de TMRP. Tal procedimento não é sem precedentes na comparação entre taxas metabólicas de serpentes, já que para diversas espécies o TMR e o TMRP parecem ser equivalentes (Bedford & Christian, 1998). Ainda que o sinal filogenético tenha apresentado uma ligeira diferença em sua intensidade, os resultados da matriz geral estão em congruência com a matriz restrita (feita somente com dados de TMRP), sendo perceptível um alto sinal filogenético e uma ausência de influência do

fator “estratégia alimentar” sobre o consumo de oxigênio durante o repouso. Isso demonstra que o agrupamento das taxas metabólicas de repouso pouco influencia no resultado.

Nossos resultados vão na contramão dos achados de Secor e Diamond (2000), onde os autores propõe que o tipo de estratégia alimentar (frequente ou infrequente) exerce uma grande influência nas taxas metabólicas de repouso a despeito da filogenia. Apesar dos resultados destes autores estarem embasados na comparação de diferentes espécies de serpentes por eles aferidas, vale ressaltar que o trabalho avaliou 8 táxons bastante distintos, além de não haver uma ponderação filogenética para os dados de TMRP. A discordância de nossos achados com relação aos resultados de Secor e Diamond (2000) pode ser decorrente de alguns fatores inerentes a ambos os trabalhos, conforme discutidos em detalhes a seguir:

a) Categorização das serpentes conforme sua estratégia alimentar:

Primeiramente, vale ressaltar que a determinação da estratégia alimentar é dificilmente dicotomizada entre animais de ingestão frequente e infrequente. Ao invés disso, um contínuo entre extremos parece ser uma hipótese mais plausível. Esta dificuldade em categorizar as serpentes para análise advém inicialmente de uma escassez de trabalhos ecológicos que avaliem precisamente este tipo de informação. Assim, a própria determinação de que metodologia usar para estimativa de frequência alimentar é discutível, já que análises de conteúdos alimentares estão sujeitas a vieses

relacionados a sazonalidade e características fisiológicas conspícuas dos animais (como o tempo de trânsito intestinal), a ontogênese, a área onde foi feita a amostragem, entre outros fatores. Animais que se alimentam mais frequentemente durante determinadas épocas do ano (agindo como alimentadores frequentes neste interim) e que passem por longos períodos de jejum subsequentes podem ser especialmente complexos na hora de se categorizar. As serpentes do gênero *Dasypeltis*, por exemplo, que apresentam longos períodos de jejum entre as estações de reprodução de passeriformes e posteriormente apresentam uma alta frequência alimentar durante a época de postura das aves, são por vezes categorizadas como alimentadoras infrequentes, apesar de apresentarem pouca diferença em suas taxas metabólicas quando comparadas a animais considerados alimentadores frequentes como, por exemplo, *Masticophis flagelum* (Fig. 2.4 e 2.5). Dessa forma, se este resultado é um artefato de uma deficiência na categorização ou se de fato esta diferença não é real, é algo difícil de ser determinado.

Animais arborícolas por outro lado, tendem a ter um trânsito intestinal mais rápido (Tsai *et al.*, 2008), o que pode comprometer o tipo de inferência acerca de seu conteúdo alimentar e estratégia alimentar. Serpentes *Corallus hortulanus*, por exemplo, aparentemente fazem uso tanto de forrageamento ativo como caça por espreita, e são geralmente agrupadas junto aos outros boídeos como animais de alimentação infrequente (Secor & Diamond, 2000). Todavia, a quantidade e diversidade de itens alimentares, bem como, algumas características morfológicas da espécie podem sugerir

coloca-la dentro de um grupo intermediário (Henderson *et al.*, 2013), ainda que o perfil da taxa metabólica aeróbia deste animal esteja muito próximo dos demais boídeos (Chappell & Ellis, 1987) (Figs. 2.4 e 2.5). Da mesma forma, é possível que a espécie de Crotalinae arborícola utilizada em uma de nossas matrizes, *Trimeresurus stejnegeri*, também represente uma condição intermediária com relação a frequência alimentar, fato este que poderia estar relacionado a taxa metabólica um pouco mais alta com relação as demais espécies dentro desse grupo.

A associação da estratégia de caça com a estratégia alimentar é, geralmente, uma das características utilizadas na categorização da frequência alimentar dos répteis (Huey & Pianka, 1981). Em linhas gerais, por esta teoria, as espécies que caçam por emboscada se alimentam menos frequentemente do que os forrageadores ativos. Todavia, como foi demonstrado por Christian e colaboradores em 2007, tais generalizações devem ser vistas com cautela. No trabalho supracitado os autores discutem, entre outras coisas, a falta de diferença na frequência de itens alimentares encontrados no elapídeo *Acanthophis praelongus* (reconhecidamente um animal que apresenta um enorme paralelismo ecológico e morfológico com os viperídeos), quando comparada a elapídeos reconhecidos como forrageadores ativos. No caso de *Acanthophis* as taxas metabólicas de repouso corrigidas pela massa corpórea foram mais próximas das taxas dos Crotalinae a despeito de sua possível maior frequência alimentar (Fig. 2.4). Outros exemplos onde a estratégia de forrageamento e a frequência alimentar

aparentemente divergem ocorre com *Lichanura trivirgata* e *Eryx colubrinus* (Rodríguez-Robles *et al.*, 1999) já que o achado de presas de baixa mobilidade (filhotes de mamíferos) em seus conteúdos estomacais sugere que estes animais, classicamente vistos como caçadores de emboscada (Secor & Diamond, 2000), realizem também forrageamento ativo (Rodríguez-Robles *et al.*, 1999).

A dicotomização das estratégias alimentares baseada na estratégia de forrageamento também ignora o fato de que é provável que exista uma grande variação de movimentação entre os predadores de emboscada (“*mobile ambushers*”) e uma variação ontogenética ligada ao mesmo. Um provável exemplo deste caso são aquelas serpentes que se alimentam de endotermos durante toda a sua vida, como por exemplo *Bothrops alternatus* (Martins *et al.*, 2002), é provável que estes animais tenham de forragear ativamente para encontrar lactentes de roedores quando jovens e posteriormente, adotem uma estratégia de caça essencialmente por espreita para emboscar os roedores adultos. Neste exemplo em particular, novamente nossos resultados apontam para um cenário mais complexo devido as poucas diferenças entre as taxas metabólicas de repouso padrão dos filhotes de *B. alternatus* e das demais espécies mensuradas. Se estes resultados são reflexos de: 1- uma diferença na estratégia de forrageamento menor do que o esperada, 2- não diferenciação da frequência alimentar a despeito da diferença de estratégia de forrageamento ou 3- independência das taxas metabólicas de repouso padrão da frequência alimentar dentro do gênero

(dependência, por exemplo, de fatores filogenéticos) ainda é discutível. Assim sendo, é incerto como tal diferenciação ontogenética na estratégia de forrageamento pode ser refletida na frequência alimentar e até mesmo como uma possível demanda metabólica diferenciada ao longo da ontogênese poderia, em teoria, exigir uma maior frequência alimentar, sendo possível que um mesmo animal passe por diferentes estratégias de forrageamento ao longo de sua vida e que estas possam ou não vir acompanhadas de uma mudança na frequência alimentar.

b) Ruídos gerados por diferentes metodologias

Um possível viés deste trabalho advém do fato de que as taxas metabólicas de repouso foram, em sua maioria, obtidas por diferentes autores. Ainda que tenham sido tomadas precauções para todas as transformações necessárias, diferenças nas formas de medida das taxas metabólicas podem ter influenciado a análise. Alguns autores utilizaram as médias da taxa metabólica de cada indivíduo, enquanto outros utilizaram o valor mínimo. Outros ainda optaram pelos valores dos quartis inferiores, como no presente trabalho. Especificamente no caso deste trabalho os quartis pouco diferiram das médias e valores mínimos, todavia, este pode não ser o caso de medidas feitas em períodos curtos. Associado a isso, variações de temperatura e diferenças na calibragem dos equipamentos também são possíveis fontes de erro inerentes a trabalhos que analisem dados previamente instituídos.

Figura 2.4: Relação entre a taxa de consumo de oxigênio (VO_2) e massa corpórea nas diferentes espécies utilizadas na análise filogenética. IF= serpentes que se alimentam infrequentemente e F= serpentes que se alimentam frequentemente. As regressões foram construídas sobre o logaritmo na base 10. 1- *Acrantophis dumerilli*, 2- *Lichanura trivirgata*, 3- *Boa constrictor*, 4- *Corallus hortulanus*, 5- *Corallus caninus*, 6- *Epicrates cenchria*, 7- *Candoia carinata*, 8- *Gonglyophis colubrinus*, 9- *Python molurus*, 10- *Python sebae*, 11- *Python curtus*, 12- *Python regius*, 13- *Broghammerus reticulatus*, 14- *Morelia spilota*, 15- *Aspidites melanocephala*, 16- *Antaresia childreni*, 17- *Liasis fuscus*, 18- *Antaresia stimsoni*, 19- *Liasis olivaceus*, 20- *Viridovipera stejnegeri*, 21- *Bothrops alternatus*, 22- *Bothrops jararaca*, 23- *Bothrops erythromelas*, 24- *Bothrops jararacussu*, 25- *Bothrops atrox*, 26- *Bothrops moojeni*, 27- *Agkistrodon piscivorus*, 28- *Crotalus cerastes*, 29- *Crotalus horridus*, 30- *Crotalus molossus*, 31- *Crotalus atrox*, 32- *Crotalus adamanteus*, 33- *Acanthophis praelongus*, 34- *Pseudonaja nuchalis*, 35- *Vipera berus*, 36- *Vipera aspis*, 37- *Cerastes cerastes*, 38- *Lamprophis fuliginosus*, 39- *Malpolon moilensis*, 40- *Dasypeltis scabra*, 41- *Masticophis flagellum*, 42- *Nerodia fasciata*, 43- *Dasypeltis inornata*, 44- *Pantherophis guttata*, 45- *Helicops modestus*, 46- *Lampropeltis gettula*, 47- *Liophis miliaris*, 48- *Thamnophis butleri*, 49- *Thamnophis sirtalis*, 50- *Thamnophis elegans*, 51- *Acrochordus arafurae*.

As diferenças de TMR e TMRP poderiam representar uma fonte de erro relevante caso fossem muito diferentes entre si. Entretanto, apesar de alguma diferença relacionada à intensidade do sinal filogenético, os resultados em ambas as matrizes foram convergentes. Esta falta de diferenças nos resultados de ambas as matrizes é

indicativa de que a variação de TMR e TMRP para este conjunto de dados teve pouca influência nos resultados.

c) Crítica ao uso de diferentes espécies na amostragem

O uso de um número restrito de espécies e a não ponderação filogenética para os dados de TMRP por Secor e Diamond, em 2000, podem ter superestimado as diferenças entre os grupos dicotomizados conforme a frequência alimentar, já que a inclusão de outros táxons (como, por exemplo, de pythonídeos australianos) muda o perfil dos resultados. Em contrapartida, ambas as nossas análises utilizaram um número amostral expressivamente maior e, em ambas, um sinal filogenético proeminente foi detectado. É importante lembrar que o presente trabalho também incorporou táxons das famílias Elapidae, Acrochordidae, Lamprophidae e da subfamília Viperinae, além de colubrídeos de alimentação infrequente, viperídeos, boídeos e pythonídeos arborícolas, e os exemplos clássicos de alimentadores frequentes (Colubridae) e infrequentes (Pythonidae, Boidae e Crotalinae). Ainda assim, é certo que o presente trabalho apresenta um viés na amostragem com relação ao número de táxons classificados em cada categoria alimentar e uma deficiência na distribuição dos táxons ao longo da árvore de Alethinophidea. Esta deficiência deve-se, em parte, a discrepância no número de estudos atuais que mensuraram as taxas metabólicas de repouso nos diferentes grupos de serpentes. Contudo, as limitações impostas pelo uso de animais de diferentes grupos, associada a uma quantidade confiável de indivíduos disponíveis, sempre será

uma crítica contundente a análise de padrões filogenéticos de características fisiológicas, especialmente sendo estas de tamanha plasticidade.

Figura 2.5: Relação entre a taxa de consumo de oxigênio (VO_2) e massa corpórea nas diferentes espécies utilizadas na análise filogenética divididas em famílias e subfamílias. As regressões foram construídas sobre o logaritmo na base 10.

2.5 Conclusão:

A ideia de que serpentes que se alimentam infreqüentemente apresentam taxas metabólicas menores é bastante intuitiva, porém pouco testada até o momento. A análise feita neste estudo em conjunto com os dados disponíveis na literatura aponta para um cenário mais complexo do que aquele proposto anteriormente (Secor & Diamond, 2000). Diferentemente dos resultados de Secor e Diamond (2000), os achados desse trabalho suportam que a filogenia tem de fato uma interferência expressiva na variação da taxa metabólica de repouso em serpentes, independente da matriz de dados

utilizados. Ainda que não seja possível refutar a hipótese proposta por Secor e Diamond (2000) devido aos vieses introduzidos ao conjunto de dados (conforme discutido anteriormente), a falta de detecção da relação entre a frequência alimentar e a taxa metabólica de repouso levanta o questionamento sobre a generalização de tais hipóteses dentro de um grupo variado como o de serpentes. Caso o modelo proposto fosse fortemente suportado dentro do grupo, seria esperado encontrar uma clara diferenciação em termos de consumo de oxigênio entre os animais classificados como alimentadores infrequentes e alimentadores frequentes, a despeito dos vieses introduzidos pelos dados. No entanto os resultados aqui apresentados mostram uma série de taxas metabólicas intermediárias (Fig.2.4 e 2.5).

Ressalta-se aqui que novos estudos ecológicos que incorporem estimadores confiáveis de frequência alimentar para um maior número de espécies são a base fundamental para os trabalhos que envolvem a influência da frequência alimentar nas taxas metabólicas. É possível que o uso de uma variável categórica alimentar múltipla, definida entre intervalos alimentares rigorosamente medidos, apresente um maior significado ecológico e aumente o poder das análises. Igualmente importante é a padronização da forma como são feitas as medidas das taxas metabólicas de repouso, já que tal variação metodológica pode influenciar diretamente sobre os ruídos da análise. Por fim, estudos futuros que incorporem, além dos requisitos prévios, um grande número de táxons (igualmente dispersos numa filogenia robusta) e outras variáveis

explicativas (características ecológicas) podem ajudar na compreensão de como se deu a evolução da taxa metabólica de repouso em serpentes e quais fatores estão realmente envolvidos em sua diferenciação.

2.6 Referências Bibliográficas:

- Abe, A. S. & Mendes, E. G. (1980). "Effect of Body Size and Temperature on Oxygen-Uptake in the Water Snakes *Helicops-Modestus* and *Liophis-Miliaris* (Colubridae)." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **65**(3): 367-370.
- Alsadoon, M. K. (1991). "Metabolic Rate-Temperature Curves of the Horned Viper, *Cerastes-Cerastes-Gasperetti*, the Moila Snake, *Malpolon-Moilensis*, and the Adder, *Vipera-Berus*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **99**(1-2): 119-122.
- Andrews, R. M. & Pough, F. H. (1985). "Metabolism of Squamate Reptiles - Allometric and Ecological Relationships." Physiological Zoology **58**(2): 214-231.
- Beaupre, S. J. (1993). "An Ecological Study of Oxygen-Consumption in the Mottled Rock Rattlesnake, *Crotalus-Lepidus-Lepidus*, and the Black-Tailed Rattlesnake, *Crotalus-Molossus-Molossus*, from 2 Populations." Physiological Zoology **66**(3): 437-454.
- Beaupre, S. J. & Duvall, D. (1998). "Variation in Oxygen Consumption of the Western Diamondback Rattlesnake (*Crotalus Atrox*): Implications for Sexual Size Dimorphism." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **168**(7): 497-506.
- Beaupre, S. J. & Zaidan, F. (2001). "Scaling of Co₂ Production in the Timber Rattlesnake (*Crotalus Horridus*), with Comments on Cost of Growth in Neonates and Comparative Patterns." Physiological and Biochemical Zoology **74**(5): 757-768.
- Bedford, G. S. & Christian, K. A. (1998). "Standard Metabolic Rate and Preferred Body Temperatures in Some Australian Pythons." Australian Journal of Zoology **46**(4): 317-328.
- Birchard, G. F.; Black, C. P.; Schuett, G. W. & Black, V. (1984). "Influence of Pregnancy on Oxygen-Consumption, Heart-Rate and Hematology in the Garter Snake - Implications for the Cost of Reproduction in Live Bearing Reptiles." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **77**(3): 519-523.
- Blomberg, S. P.; Garland, T. & Ives, A. R. (2003). "Testing for Phylogenetic Signal in Comparative Data: Behavioral Traits Are More Labile." Evolution **57**(4): 717-745.
- Bronikowski, A. & Vleck, D. (2010). "Metabolism, Body Size and Life Span: A Case Study in Evolutionarily Divergent Populations of the Garter Snake (*Thamnophis Elegans*)." Integrative and Comparative Biology **50**(5): 880-887.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (2004). *Venomous of the Western Hemisphere*, Cornell University, Press, Ithaca, New York. v.1.
- Chappell, M. A. & Ellis, T. M. (1987). "Resting Metabolic Rates in Boid Snakes - Allometric Relationships and Temperature Effects." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **157**(2): 227-235.

- Christian, K.; Webb, J. K.; Schultz, T. & Green, B. (2007). "Effects of Seasonal Variation in Prey Abundance on Field Metabolism, Water Flux, and Activity of a Tropical Ambush Foraging Snake." Physiological and Biochemical Zoology **80**(5): 522-533.
- Cruzneto, A. P. & Abe, A. S. (1994). "Ontogenic Variation of Oxygen-Uptake in the Pitviper Bothrops Moojeni (Serpentes, Viperidae)." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **108**(4): 549-554.
- Davies, P. M. C. (1982). "The Ontogenetic Weight Dependence of Metabolism in the Florida King Snake, Lampropeltis-Getulus-Floridana." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **73**(2): 291-295.
- Dejours, P. (1981). Principles of Comparative Respiratory Physiology. Amsterdam, 2oed. Elsevier/North-Holland Biomedical Press: 265.
- Dlugosz, E. M.; Chappell, M. A.; Meek, T. H.; Szafranska, P. A.; Zub, K.; Konarzewski, M.; Jones, J. H.; Bicudo, J.; Nespolo, R. F.; Careau, V. & Garland, T. (2013). "Phylogenetic Analysis of Mammalian Maximal Oxygen Consumption During Exercise." Journal of Experimental Biology **216**(24): 4712-4721.
- Dmiel, R. (1986). "Intraspecific and Interspecific Allometry of Oxygen-Consumption in Snakes." Journal of Herpetology **20**(2): 265-267.
- Dorcas, M. E.; Hopkins, W. A. & Roe, J. H. (2004). "Effects of Body Mass and Temperature on Standard Metabolic Rate in the Eastern Diamondback Rattlesnake (Crotalus Adamanteus)." Copeia(1): 145-151.
- Felsenstein, J. (1985). "Phylogenies and the Comparative Method." American Naturalist **125**(1): 1-15.
- Freckleton, R. P.; Harvey, P. H. & Pagel, M. (2002). "Phylogenetic Analysis and Comparative Data: A Test and Review of Evidence." American Naturalist **160**(6): 712-726.
- Garland, T.; Bennett, A. F. & Rezende, E. L. (2005). "Phylogenetic Approaches in Comparative Physiology." Journal of Experimental Biology **208**(16): 3015-3035.
- Garland, T.; Harvey, P. H. & Ives, A. R. (1992). "Procedures for the Analysis of Comparative Data Using Phylogenetically Independent Contrasts." Systematic Biology **41**(1): 18-32.
- Gavira, R. S. B. & Andrade, D. V. (2013a). "Meal Size Effects on the Postprandial Metabolic Response of Bothrops Alternatus (Serpentes: Viperidae)." Zoologia **30**(3): 291-295.
- Gavira, R. S. B. & Andrade, D. V. (2013b). "Temperature and Thermal Regime Effects on the Specific Dynamic Action of Bothrops Alternatus (Serpentes, Viperidae)." Amphibia-Reptilia **34**(4): 483-491.
- Greene, H. W. (1997). Snakes: The Evolution of Mystery in Nature. London, *Univers. Californ. Press*.

- Greene, S.; McConnachie, S.; Secor, S. & Perrin, M. (2013). "The Effects of Body Temperature and Mass on the Postprandial Metabolic Responses of the African Egg-Eating Snakes *Dasypeltis Scabra* and *Dasypeltis Inornata*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **165**(2): 97-105.
- Henderson, R. W.; Pauers, M. J. & Colston, T. J. (2013). "On the Congruence of Morphology, Trophic Ecology, and Phylogeny in Neotropical Treeboas (Squamata: Boidae: Corallus)." Biological Journal of the Linnean Society **109**(2): 466-475.
- Hicks, J. W. & Riedesel, M. L. (1983). "Diurnal Ventilatory Patterns in the Garter Snake, *Thamnophis-Elegans*." Journal of Comparative Physiology **149**(4): 503-510.
- Hopkins, W. A.; Roe, J. H.; Philippi, T. & Congdon, J. D. (2004). "Standard and Digestive Metabolism in the Banded Water Snake, *Nerodia Fasciata Fasciata*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **137**(1): 141-149.
- Huey, R. B. & Pianka, E. R. (1981). "Ecological Consequences of Foraging Mode." Ecology **62**(4): 991-999.
- Kamel, S. & Gatten, R. E. (1983). "Aerobic and Anaerobic Activity Metabolism of Limbless and Fossorial Reptiles." Physiological Zoology **56**(3): 419-429.
- Lindell, L. E. & Forsman, A. (1996). "Density Effects and Snake Predation: Prey Limitation and Reduced Growth Rate of Adders at High Density of Conspecifics." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **74**(6): 1000-1007.
- Lourdais, O.; Guillon, M.; DeNardo, D. & Blouin-Demers, G. (2013). "Cold Climate Specialization: Adaptive Covariation between Metabolic Rate and Thermoregulation in Pregnant Vipers." Physiology & Behavior **119**: 149-155.
- Lovegrove, B. G. (2000). "The Zoogeography of Mammalian Basal Metabolic Rate." American Naturalist **156**(2): 201-219.
- Marques, O. A. V.; Martins, M.; Develey, P. F.; Macarrao, A. & Sazima, I. (2012). "The Golden Lancehead Bothrops Insularis (Serpentes: Viperidae) Relies on Two Seasonally Plentiful Bird Species Visiting Its Island Habitat." Journal of Natural History **46**(13-14): 885-895.
- Marques, O. A. V. & Sazima, I. (2009). "Old Habits Die Hard: Mouse Handling by a Pitviper Species on a Rodent-Free Island." Amphibia-Reptilia **30**(3): 435-438.
- Martins, M.; Araujo, M. S.; Sawaya, R. J. & Nunes, R. (2001). "Diversity and Evolution of Macrohabitat Use, Body Size and Morphology in a Monophyletic Group of Neotropical Pitvipers (Bothrops)." Journal of Zoology **254**: 529-538.
- Martins, M.; Marques, O. A. V. & Sazima, I. (2002). Ecological and Phylogenetic Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers (Genus *Bothrops*). In: Schuett G. W.; Hoggren M.; Douglas M. E. And Greene H. W. In *Biology of the Vipers*, Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, UT.: 307-328.

- Mautz, W. J. & Nagy, K. A. (1988). "Xantusiid Lizards Have Low Field Metabolic Rates." American Zoologist **28**(4): A103-A103.
- Mautz, W. J. & Nagy, K. A. (2000). "Xantusiid Lizards Have Low Energy, Water, and Food Requirements." Physiological and Biochemical Zoology **73**(4): 480-487.
- McCue, M. D. & Lillywhite, H. B. (2002). "Oxygen Consumption and the Energetics of Island-Dwelling Florida Cottonmouth Snakes." Physiological and Biochemical Zoology **75**(2): 165-178.
- Pianka, E. P. & Vitt, L. J. (2006). *Lizards: Windows to the Evolution Diversity.*, University of California.
- Pough, F. H. (1980). The Advantages of Ectothermy for Tetrapods. *Am. Nat.* . **115**: 92-112.
- Pough, F. H. (1983). Amphibians and Reptiles as Low-Energy Systems. In *Behavioral Energetics: The Cost of survival in Vertebrates* (W, P, Aspley and S,I Lustyc), *Ohio State Univers, Press*, Columbus. **141-188**.
- Pyron, R. A.; Burbrink, F. T. & Wiens, J. J. (2013). "A Phylogeny and Revised Classification of Squamata, Including 4161 Species of Lizards and Snakes." Bmc Evolutionary Biology **13**: 53.
- Queiroz, G. P.; Pessoa, L. A.; Portaro, F. C. V.; Furtado, M. D. D. & Tambourgi, D. V. (2008). "Interspecific Variation in Venom Composition and Toxicity of Brazilian Snakes from Bothrops Genus." Toxicon **52**(8): 842-851.
- Revell, L. J.; Harmon, L. J. & Collar, D. C. (2008). "Phylogenetic Signal, Evolutionary Process, and Rate." Systematic Biology **57**(4): 591-601.
- Rodriguez-Robles, J. A.; Bell, C. J. & Greene, H. W. (1999). "Gape Size and Evolution of Diet in Snakes: Feeding Ecology of Erycine Boas." Journal of Zoology **248**: 49-58.
- Roe, J. H.; Hopkins, W. A.; Snodgrass, J. W. & Congdon, J. D. (2004). "The Influence of Circadian Rhythms on Pre- and Post-Prandial Metabolism in the Snake *Lamprophis Fuliginosus*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **139**(2): 159-168.
- Secor, S. (2000). "Conferences Yield Benefits." Journal American Water Works Association **92**(3): 12-12.
- Secor, S. M. & Diamond, J. (1997). "Determinants of the Postfeeding Metabolic Response of Burmese Pythons, *Python Molurus*." Physiological Zoology **70**(2): 202-212.
- Secor, S. M. & Diamond, J. (1998). "A Vertebrate Model of Extreme Physiological Regulation." Nature **395**(6703): 659-662.
- Secor, S. M. & Diamond, J. M. (2000). "Evolution of Regulatory Responses to Feeding in Snakes." Physiological and Biochemical Zoology **73**(2): 123-141.

- Secor, S. M. & Nagy, K. A. (1994). "Bioenergetic Correlates of Foraging Mode for the Snakes *Crotalus-Cerastes* and *Masticophis-Flagellum*." Ecology **75**(6): 1600-1614.
- Shine, R. & Sun, L. X. (2002). "Arboreal Ambush Site Selection by Pit-Vipers *Gloydius Shedaoensis*." Animal Behaviour **63**: 565-576.
- Smith, G. C. (1976). "Ecological Energetics of 3 Species of Ectothermic Vertebrates." Ecology **57**(2): 252-264.
- Stuginski, D. R.; Fernandes, W.; Tattersall, G. J. & Abe, A. S. (2011). "Postprandial Thermogenesis in *Bothrops moojeni* (Serpentes: Viperidae)." Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases **17**(3): 287-292.
- Sun, L. X.; Shine, R.; Zhao, D. B. & Tang, Z. R. (2002). "Low Costs, High Output: Reproduction in an Insular Pit-Viper (*Gloydius shedaoensis*, Viperidae) from North-Eastern China." Journal of Zoology **256**: 511-521.
- Tsai, T. S.; Lee, H. J. & Tu, M. C. (2008). "Specific Dynamic Action, Apparent Assimilation Efficiency, and Digestive Rate in an Arboreal Pitviper, *Trimeresurus stejnegeri stejnegeri*." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **86**(10): 1139-1151.

Capítulo 3

“Aumento da taxa metabólica durante o período pós-prandial em 5 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (Crotalinae: Viperidae)”

3.0 Resumo:

Nas últimas décadas, o estudo do aumento metabólico pós-prandial (AMPP) em serpentes de alimentação infrequente vem ganhando destaque devido as particulares características fisiológicas destes animais, ainda assim, pouco enfoque tem sido dado as relações alométricas e filogenéticas envolvidas no AMPP. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e comparar o AMPP de filhotes e adultos de cinco espécies do gênero *Bothrops*, utilizando a massa corpórea como covariável, e testar a hipótese de que a diversidade dos hábitos alimentares (especialista ou generalista) dentro do grupo está relacionada a amplitude das respostas metabólicas pós-prandiais destes animais. Para tanto, 33 serpentes adultas e 38 serpentes filhotes foram alimentadas com respectivamente 15 e 20% de seu peso em roedores e tiveram suas taxas metabólicas aeróbias pós-prandiais mensuradas. As *Bothrops* aferidas apresentaram um AMPP característico de serpentes e próximo ao valor das demais Crotalinae. Houve uma marcante influência da massa corpórea sobre o AMPP, porém os valores pouco divergiram entre as espécies, exceto nos juvenis de *Bothrops alternatus* que

apresentaram valores de AMPP inferiores aos das demais *Bothrops* aferidas oque sugere um custo digestório diferenciado relacionado aos hábitos alimentares desta espécie. As taxas metabólicas pós-prandiais relativamente baixas dos Crotalinae permitem um alto rendimento energético durante a digestório quando comparados a outras serpentes oque provavelmente exerce uma grande influência na história evolutiva do grupo.

3.01 Abstract:

In the past few decades, the study of the specific dynamic action (SDA) in infrequently feeding snakes is gaining prominence due to the particular physiological characteristics of these animals. However, little attention has been given to the allometric and phylogenetic relationships involved in SDA. The present study aimed to characterize and compare the SDA in newborn and adults of five species of the genus *Bothrops* using body mass as a covariate, and test the hypothesis that the diversity of dietary habits (specialist or generalist) within the group is related to the magnitude of the postprandial metabolic responses of these animals. For this purpose, the SDA parameters were quantified in 33 adult and 38 newborn snakes that were fed with rodents equivalent to 15 and 20% of your weight, respectively. All the *Bothrops* species showed a typical SDA of snakes, with values close to the other Crotalinae. There is a marked influence of body mass on SDA and there are few differences between species except in young individuals of *B. alternatus*. which showed SDA values lower than the

other *Bothrops*, suggesting a different cost related to feeding habits in this specie. The relatively low SDA values of Crotalinae snakes allow a high food energy conversion when compared to other snakes and probably have a strong influence on the evolutionary history of the group.

3.1 Introdução

Os viperídeos estão entre as mais bem sucedidas famílias de serpentes, sendo representados por cerca de 320 espécies (três subfamílias) altamente diversificadas e distribuídas em todos os continentes à exceção da Oceania e da Antártida (Greene, 1997). Apesar da característica mais marcante do grupo ser seu aparato inoculador de veneno altamente diferenciado (dentição solenóglifa), outras características igualmente importantes parecem ter contribuído na história evolutiva do grupo (Campbell & Lamar, 2004). De maneira geral, os viperídeos são animais bastante econômicos em termos energéticos (Cruzneto & Abe, 1994; Secor & Nagy, 1994; Beaupre & Zaidan, 2001; Zaidan & Beaupre, 2003; Dorcas *et al.*, 2004). São considerados caçadores de espreita, permanecendo imóveis por longos períodos e emboscando suas presas, ainda que alguma variação desta estratégia de predação possa ocorrer entre as diferentes espécies e ao longo da ontogenia (Sazima, 1992; Egler *et al.*, 1996). Tais quais as demais serpentes que caçam por espreita, acredita-se que os viperídeos se alimentem em intervalos infrequentes na natureza (Secor & Nagy, 1994; Andrade *et al.*, 1997; Secor & Diamond,

2000; McCue, 2007). Além disso, são capazes de ingerir presas de grandes proporções devido à constituição e a alta cinesia de seu crânio (Cundall & Greene, 1982; Hampton & Moon, 2013).

A ingestão de presas de grandes proporções pode representar um grande desafio digestório para estes animais que, durante o jejum, mantem parte de seus órgãos em estado de senescência para poupar energia (Andrade *et al.*, 1997; Secor & Diamond, 2000; McCue, 2006; Secor, 2009; Enok *et al.*, 2013). A ingestão de presas (principalmente aquelas de grandes proporções) deflagra um considerável aumento no metabolismo aeróbio (AMPP- aumento metabólico pós-prandial) proveniente de um marcante remodelamento do trato gastrointestinal que ocorre a fim de permitir o processamento da ingesta (Secor & Nagy, 1994; Andrade *et al.*, 1997; Zaidan & Beaupre, 2003; Tsai *et al.*, 2008; Gavira & Andrade, 2013a; b).

O AMPP para estes animais representa uma parte importante do compromisso energético anual (Secor & Nagy, 1994; Zaidan & Beaupre, 2003; Christian *et al.*, 2007), e é influenciado preponderantemente pela proporção e tipo de alimento (McCue *et al.*, 2005; McCue, 2006; Secor & Boehm, 2006; Secor, 2009; Bessler *et al.*, 2010). A temperatura parece exercer certa influência na topologia deste aumento metabólico, porém pouco influencia no montante total de energia gasto durante todos os processos decorrentes da digestão do alimento (McCue, 2006), mas ver também (Toledo *et al.*, 2003). Um dos efeitos mais pronunciados da temperatura ocorre no tocante à duração do

fenômeno, que é drasticamente diminuída em temperaturas mais elevadas, o que apesar de não estar relacionado a um maior aproveitamento energético, pode estar ligado a uma vantagem ecológica (Secor, 2009).

Apesar de nas últimas décadas uma série de trabalhos ter se dedicado à compreensão de como a proporção alimentar, o tipo de alimento e a temperatura afetam o AMPP (para revisão ver McCue, 2006 e Secor, 2009), poucos estudos levaram em consideração os fatores alométricos envolvidos (Zaidan & Beaupre, 2003) ou foram conduzidos em um enfoque comparativo interespecífico (Ott & Secor, 2007). A compreensão de como o metabolismo pós-prandial varia ao longo de linhagens diferentes permite o questionamento de como esta característica fisiológica pode ou não ser influenciada pela história evolutiva compartilhada entre muitos grupos. Para tanto, o estudo de um grupo ecologicamente coeso, cujas relações filogenéticas estejam relativamente bem estabelecidas, é vantajoso e diminui o viés inserido por convergências de animais pouco aparentados, algo que facilita o estudo da evolução da característica no grupo.

O gênero *Bothrops* representa a maior irradiação da subfamília Crotalinae no continente sul-americano, apresentando grande diversidade morfológica e ecológica (Oliveira & Martins, 2001; Marques *et al.*, 2002; Valdujo *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2003; Campbell & Lamar, 2004; Hartmann *et al.*, 2005; Barbo *et al.*, 2012). Tal qual a maioria dos outros viperídeos, as serpentes deste grupo caçam preponderantemente por

espreita e são consideradas animais de alimentação infrequente (Secor & Diamond, 2000; Martins *et al.*, 2002). Apresentam certa variação no tocante ao tipo de item alimentar, sendo a maioria das espécies generalistas com mudança ontogenética na frequência de itens alimentares, passando de uma dieta preponderantemente composta por pequenas presas ectotérmicas durante a juventude para uma dieta preponderantemente composta por endotermos na fase adulta (Sazima, 1992; Valdujo *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006; Marques & Sazima, 2009). Todavia, existem dentro do gênero animais especialistas que se alimentam exclusivamente de presas endotérmicas ao longo da ontogenia, como é o caso de *B. alternatus*, além de outros animais com dietas diferenciadas, como por exemplo, *B. insulares* (Martins *et al.*, 2002).

A mudança ontogenética da dieta é geralmente acompanhada pela mudança da coloração da extremidade da cauda na maioria das espécies (engodo caudal) e, ao menos em *B. jararaca*, mudanças no horário de forrageamento (Hartmann *et al.*, 2003). Além disso, a mudança no tipo de dieta pode representar um diferente compromisso metabólico durante a digestão nestes animais, já que presas distintas podem divergir quanto a sua digestibilidade, quanto ao seu conteúdo energético e quanto a energia necessária para o seu processamento (Christel *et al.*, 2007; Secor, 2009; Bessler *et al.*, 2010).

Baseando-se nas características ecológicas do gênero o presente trabalho teve como objetivos; 1) caracterizar e comparar o perfil do aumento metabólico pós-prandial (AMPP) de jovens e adultos em 5 diferentes espécies do gênero *Bothrops*; 2) determinar como a massa corpórea dos animais influencia as diferentes características do AMPP; e 3) testar a hipótese de que um animal especialista em mamíferos (*B. alternatus*) apresenta um menor gasto energético durante digestão de uma presa mamífera do que espécies que se alimentam preponderantemente de ectotérmicos durante a fase juvenil.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1) Animais:

Foram utilizadas 71 serpentes, entre filhotes e adultos, do gênero *Bothrops* das espécies: *B. atrox*, *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararacussu* e *B. jararaca* provenientes do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Cujas massas variaram conforme a tabela 3.1.

Os animais foram mantidos durante o período experimental no próprio biotério do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, em sala com temperatura variando entre 20°C e 30°C e fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro). As serpentes foram mantidas individualizadas dentro de caixas plásticas medindo 56,4 x 38,5 x 20,1 cm forradas com papelão corrugado. A água foi fornecida *ad libitum* e a alimentação oferecida a cada 15 dias no caso dos filhotes e a cada 30 dias no caso de animais adultos

quando não submetidos aos experimentos. A alimentação dos animais foi constituída por camundongos (*Mus musculus*) provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Durante todo o período experimental as serpentes foram monitoradas quanto à alimentação, ecdise e crescimento.

Todos os passos envolvidos neste trabalho foram julgados e acompanhados pela Comissão Interna de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação, do Instituto Butantan, sobre os aspectos éticos do projeto à luz dos princípios elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Tabela 3.1: Massa corpórea das espécies de *Bothrops* utilizadas neste trabalho.

Espécie	Intervalo de massa(g)	Média de massa(g)	N
<i>B. atrox</i>	4,0-600g	205,35g	12
<i>B. alternatus</i>	12-450g	104,81g	22
<i>B. erythromelas</i>	7-340g	104,39g	11
<i>B. jararacussu</i>	9-350g	76,89g	14
<i>B. jararaca</i>	8-370g	87,77g	12

Os valores representam o intervalo de massas registradas, a média do grupo e o número de indivíduos utilizados para cada espécie.

3.2.2) Medida da Taxa Metabólica Aeróbia

a) Aparentação:

A taxa metabólica aeróbia foi estimada a partir das taxas de consumo de oxigênio (VO_2). Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia do Instituto de Biociências da USP em São Paulo. Foi utilizado um sistema de respirometria fechada no caso dos jovens e filhotes (animais com massa corpórea menor

que 50g) e um sistema de respirometria aberta no caso dos jovens maiores e adultos (animais com massa corpórea maior que 50g). Para tanto foi utilizado um analisador de oxigênio PA-1 (Sable Systems), acoplado a uma bomba de sucção e a um fluxímetro (Omega Engineering Inc.). No caso do sistema aberto foram utilizadas bombas auxiliares (VigorAr). A amostra de ar foi seca através de resina dessecante (Ascarite) e teve seu conteúdo de CO₂ absorvido (Drierite) antes de entrar no analisador de gases. Os sinais emitidos pelo analisador foram então enviados a um computador onde a coleta e análise dos dados foram feitas automaticamente por um sistema de aquisição executado pelo programa Expedata (Sable Systems). Os fluxos utilizados variaram entre 100-700 ml/minuto conforme a rodada experimental e os valores obtidos foram convertidos para STPD, como descrito em Dejours (1981), segundo as condições de pressão barométrica e temperatura do experimento.

b) Procedimento

Os animais foram previamente submetidos a um jejum alimentar de 30 dias, pesados, alimentados (descrição a seguir) e então colocados individualmente em câmaras respirométricas de acrílico cujo volume variou entre 450 e 3300 ml conforme o tamanho dos animais, montadas dentro de uma câmara climática (Eletrolab®) a 25±1°C. As medidas de VO₂ foram realizadas durante 10-11 dias, nos tempos 0, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 108, 120, 144, 168, 192, 240, 252, 264 horas pós-alimentar.

A alimentação foi feita através de método forçado, no qual o animal foi primeiramente introduzido em uma câmara saturada de dióxido de carbono por um período inferior a 2 minutos levando o animal a um leve estado de narcose. Em seguida, camundongos previamente sacrificados foram gentilmente introduzidos manualmente até o estômago dos animais. No geral a recuperação total dos animais demorou menos de 3 minutos e, após este tempo, as serpentes foram introduzidas nas câmaras metabólicas. A quantidade de alimento utilizada foi de: $20 \pm 1\%$ do peso corporal para as serpentes filhotes e de $15 \pm 1\%$ do peso corporal para os animais adultos.

3.2.3) Análise do aumento metabólico pós prandial de Bothrops

O AMPP foi quantificado para cada um dos animais através do cálculo da área sob a curva obtida a partir do consumo de oxigênio, expresso em mLO_2/h (na abscissa) e tempo em horas (na ordenada) excluindo-se a taxa metabólica de repouso padrão (TMRP) ao longo do tempo. Para o cálculo da área sob a curva foi utilizado o freeware AUC_Pgm disponível em http://www.statstodo.com/AUC_Pgm.php. Foram ainda calculados o escopo metabólico (EM), ou seja, em quantas vezes a taxa metabólica de repouso padrão foi aumentada durante o pico metabólico, o tempo até o pico metabólico (Tpeak), duração do AMPP (T_{AMPP}) e $E_{\text{AMPP}}\%$ que é a porcentagem do conteúdo energético da ingesta dispendida durante a AMPP.

3.2.4) Análise Estatística

Os valores referentes ao AMPP, EM, T_{peak}, T_{AMPP} e E_{AMPP}% foram analisados através de uma ANCOVA (Xlstat) utilizando-se a massa corpórea como cofator e a espécie como fator categórico. Os interceptos das regressões geradas para cada espécie foram comparados quando suas inclinações não divergiram significativamente. Os fatores que não apresentaram efeito da massa (inclinações não diferentes de zero) foram comparados através do Teste de Tukey após a determinação de sua homogeneidade pelo teste e Levene. O nível de significância assumido foi de 0,05. Os resultados de filhotes e adultos foram analisados separadamente devido às diferenças na proporção da alimentação. Os valores de consumo de oxigênio foram transformados para kilojoules (KJ) considerando uma relação de 19,8 KJ para cada litro de O₂ consumido (Secor & Diamond, 2000; Zaidan & Beaupre, 2003).

3.3 Resultados

Os resultados gerais com os valores obtidos de AMPP, EM, T_{peak}, T_{AMPP} e E_{AMPP}% estão representados na tabela 3.2. No caso dos filhotes de serpentes *Bothrops*, tanto a massa corpórea ($p < 0,05$; $F = 283,62$) quanto à espécie ($p < 0,05$; $F = 2,919$) influenciaram os valores de AMPP. As análises não revelaram diferenças significativas

entre as inclinações das diferentes espécies ($p=0,260$; $F=1,887$). Os resultados da análise dos interceptos entre os pares revelou que: *B. jararacussu*, *B. erythromelas* e *B. atrox* apresentaram um valor de intercepto significativamente menor do que *B. jararaca* que, por sua vez, apresentou um valor de intercepto significativamente menor do que *B. alternatus*. Os resultados da comparação de interceptos e as regressões do AMPP pela massa seguem nas tabela 3.3 e figura 3.1 respectivamente.

Tabela 3.2: Valores médios do aumento metabólico pós-prandial (AMPP), $E_{AMPP}\%$, escopo metabólico (EM), tempo até o pico de VO_2 (Tpeak) e tempo de duração do AMPP (T_{AMPP}) para os indivíduos filhotes (f) e adultos (a) das diferentes espécies de *Bothrops*.

<i>sp</i>		<i>B. atrox</i>	<i>B. alternatus</i>	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. jararacussu</i>	<i>B. jararaca</i>
AMPP(KJ)(f)	15g	3,38	1,46	3,59	4,59	2,49
	100g	16,57	15,41	20,51	17,78	18,56
	200g	27,94	32,72	38,22	32,41	32,81
	300g	45,95	50,82	55,01	46,04	45,22
$E_{AMPP}\%$ (f)	15g	12,66	5,47	13,44	17,19	9,3
$E_{AMPP}\%$ (a)	300g	10,48	12,69	13,73	11,5	11,3
EM-(f)	Md	6,60	3,00	4,71	4,64	2,61
	Min	3,72	2,27	3,71	2,63	4,17
	Max	12,14	4,04	5,98	5,67	1,53
EM (a)	Md	6,28	6,83	8,28	6,5	8,39
	Min	2,75	4,8	5,38	4,1	7,3
	Max	8,76	8,1	11,4	8,9	8,98
Tpeak (f)	Md	31,14	38,57	31,5	32	27,5
	Min	24	36	24	24	24

	Max	48	48	42	60	36
T_{peak} (a)	Md	46,8	50	51	41	44,4
	Min	30	60	36	30	30
	Max	54	30	60	54	48
T_{AMPP} (f)	Md	241,71	154,28	231	253	234,28
	Min	168	96	168	240	172
	Max	264	240	264	264	264
T_{AMPP} (a)	Md	234	231	252	230	240
	Min	192	196	240	252	216
	Max	252	264	264	216	252

Os valores estão expressos em KJ par aos valores de taxa metabólica, porcentagem do valor calórico da ingesta para EAMPP%, número de vezes em que a TMRP aumentou para os valores de escopo metabólico (EM) e horas para as medidas de tempo e representam: Md: média, Min: valor mínimo, Max: valor máximo.

Tabela 3.3. Análise dos interceptos da regressão entre a massa corpórea e as taxas metabólicas pós-prandiais em indivíduos filhotes de serpentes do gênero *Bothrops*.

<i>espécie</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. alternatus</i>	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. jararacussu</i>
<i>B. atrox</i> (N= 6)				
<i>B. alternatus</i> (N=14)	F=28,574 p<0,05			
<i>B. erythromelas</i> (N= 4)	F=0,02 p=0,931	F=18,990 p<0,05		
<i>B. jararacussu</i> (N= 8)	F=0,082 p=0,779	F=73,24 p<0,05	F=0,102 p=0,754	
<i>B. jararaca</i> (N= 6)	F=12,05 p<0,05	F=17,27 p<0,05	F=12,32 p<0,05	F=23,49 p<0,05

Os valores representam o F estatístico da ANCOVA, com o valor de probabilidade (p), para o valor de N indicado entre parentesis.

Figura 3.1 Regressão linear entre o consumo energético durante a digestão (AMPP) e massa corpórea nas diferentes espécies de *Bothrops*. As regressões foram construídas sobre o logaritmo na base 10. Os valores de AMPP estão representados como KJ e de massa corpórea em gramas. Ba: *Bothrops alternatus*; Bax: *Bothrops atrox*; Be: *Bothrops erythromelas*; Bj: *Bothrops jararaca*; Bjs: *Bothrops jararacussu*

A massa corpórea também influenciou os resultados de AMPP para os adultos das espécies de *Bothrops* ($p < 0,0001$, $F = 1,9778$). Tanto as inclinações como os interceptos não divergiram significativamente (tabela 3.4). A equação que descreve o modelo para a variação do AMPP em KJ em função da massa corpórea é:

$$\text{Log}_{10}\text{AMPP} = -0,304 + 0,791 * \text{massa corpórea} \quad (R^2 = 0,888, F = 244,7 \text{ } P < 0,05).$$

Tabela 3.4: Análise dos interceptos da regressão entre a massa corpórea e as taxas metabólicas pós-prandiais em indivíduos adultos de serpentes do gênero *Bothrops*.

<i>espécie</i>	<i>B.atrox</i>	<i>B. alternatus</i>	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. jararacussu</i>
<hr/>				
<i>B. atrox</i> (N = 6)				
<i>B. alternatus</i> (N = 8)	F=4,64 p=0,056			
<i>B. erythromelas</i> (N =7)	F=4,418 p=0,053	F=4,175 p=0,062		
<i>B. jararacussu</i> (N = 6)	F=1,44 p=0,260	F=0,02 p=0,886	F=7,509 p=0,098	
<i>B. jararaca</i> (N = 6)	F=1,515 p=0,253	F=0,008 p=0,992	F=3,704 p=0,086	F=0,039 p=0,849

Os valores representam o F estatístico da ANCOVA, com o valor de probabilidade (p), para o valor de N indicado entre parentesis.

Tanto nos indivíduos filhotes quanto em adultos não houve influência da massa corpórea sobre o escopo metabólico (p=0,38, F=0,790 e p=0,67, F=0,179 respectivamente). Para os indivíduos adultos não houve diferenças significativas entre as médias dos escopos metabólicos para das diferentes espécies, ao passo que entre os filhotes das espécies de *Bothrops* houve diferenças entre os escopos metabólicos decorrente da alimentação (ver tabela 3.5):

Tabela 3.5: Escopo metabólico referente ao AMPP para os indivíduos filhotes das espécies de *Bothrops*.

<i>espécie</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. alternatus</i>	<i>B. erythromelas</i>	<i>B. jararacussu</i>
<hr/>				
<i>B. atrox</i> (N = 6)				
<i>B. alternatus</i> (N=14)	p<0,05			
<i>B. erythromelas</i> (N = 4)	p=0,166	p=0,161		
<i>B. jararacussu</i> (N = 8)	p=0,96	p<0,05	p=0,99	
<i>B. jararaca</i> (N=6)	p<0,05	p=0,96	p=0,08	p<0,05

O tempo até o pico metabólico (Tpeak), tanto nos filhotes como nos adultos, não foi influenciado pela massa copórea (p=0,071, F=3,458 e p=0,482; F=0,988), e não divergiram significativamente entre as diferentes espécies. A duração total do AMPP, tanto nos filhotes como nos adultos, não foi afetada pela massa corpórea (p=0,058; F=3,884 e p=0,395, F=0,752), entre os filhotes *B. alternatus* apresentou uma duração total de AMPP significativamente menor do que as demais *Bothrops*, todavia, nenhuma diferença na duração do AMPP foi detectada entre os adultos.

3.4 Discussão

a) Caracterização das taxas metabólicas pós-prandiais em Bothrops

O padrão do AMPP apresentado por todas as 5 espécies de *Bothrops* avaliadas não diferiu dos padrões previamente estabelecidos para outras espécies de serpentes (Andrade *et al.*, 1997; Secor & Diamond, 2000; Toledo *et al.*, 2003; Zaidan & Beaupre, 2003; Hopkins *et al.*, 2004; Beaupre, 2005; McCue, 2006; Ott & Secor, 2007; Secor,

2009) e foi caracterizado por um rápido aumento metabólico até o ponto de máximo metabolismo (T_{peak}) e subsequentemente uma lenta e gradual diminuição da taxa metabólica até os valores de repouso. Os resultados deste estudo corroboram os achados de Zaidan e Beaupre (2003) no tocante a influência da massa corpórea sobre o AMPP. As variações do AMPP em relação a massa corpórea dos indivíduos filhotes das espécies de *Bothrops* aproximaram-se daquelas determinadas para outros ectotérmicos (Zaidan & Beaupre, 2003; Secor & Boehm, 2006; Tsai *et al.*, 2008). Já a aparente discrepância na inclinação da reta de regressão da taxa metabólica pela massa corpórea de *B. erythromelas*, ainda que não comprovada estatisticamente, deve-se provavelmente ao pequeno número de filhotes utilizado. A variação do AMPP em função da massa corpórea também foi evidente para os adultos; todavia, divergiu dos achados de Zaidan e Beaupre (2003) para *Crotalus horridus*, onde o expoente de massa corpórea foi maior do que um (1,15, Zaidan e Beaupre, 2003). O motivo da divergência dos resultados de ambos os trabalhos não está clara, mas pode estar relacionado a diferenças de massa dos indivíduos utilizados ou a uma real diferença do perfil da variação do AMPP em relação a massa nos dois gêneros distintos. Apesar disso, quando padronizados para a massa corpórea de 350g, proposta por Secor e Diamond (2000), e seguida por Zaidan e Beaupre (2003), os resultados deste estudo com *Bothrops* divergem em apenas 2% com relação ao $E_{AMPP}\%$ encontrado para *Crotalus horridus* alimentadas com a mesma proporção alimentar. Resultados semelhantes foram descritos por Andrade e

colaboradores (1997) para cascavéis *Crotalus durissus*, quando foram utilizados animais que ingeriram 25% do equivalente de suas massas corpóreas em roedores. Da mesma forma, quando padronizados para uma massa de 150g, o AMPP total dos adultos do presente trabalho foi intermediário ao AMPP determinado por (Gavira & Andrade, 2013a) para serpentes *Bothrops alternatus* alimentadas com o equivalente a 10 e 20% da sua própria massa em alimento. Os valores de AMPP são ainda mais próximos quando considerada a regressão individual de *B. alternatus* (AMPP= 29,65 KJ) em relação ao trabalho de Gavira e Andrade (2013).

Em 1997, Andrade e colaboradores obtiveram através de seus experimentos com *Crotalus durissus* uma resposta metabólica pós-prandial de menor intensidade quando comparada aos coeficientes registrados em pythonídeos obtidos por Secor e colaboradores (SECOR & DIAMOND, 1994; Secor & Diamond, 1998; Secor & Diamond, 2000; Ott & Secor, 2007), apresentando, inclusive, um $E_{AMPP}^{\%}$ equivalente àqueles de animais de alimentação frequente (Secor & Nagy, 1994; Hopkins *et al.*, 2004; Roe *et al.*, 2004; Greene *et al.*, 2013). Tal perfil também foi seguido pelos resultados de Zaidan e Beaupre (2003) para *Crotalus horridus* e *Crotalus cerastes*, Tsai e colaboradores (2008) para *Trimeresurus stejnegeri* e pelos resultados do presente trabalho para todas as cinco espécies de *Bothrops* (ver também os valores discordantes para *C. cerastes* em Secor & Diamond, 2000). Uma das possíveis explicações aventadas pelos autores do trabalho com *C. durissus* relaciona este menor custo energético

digestório a ação do veneno sobre a presa, o que facilitaria o processo digestório e, por conseguinte, diminuiria a quantidade de energia necessária para a sua conclusão (Andrade *et al.*, 1997). Diferentemente do veneno de *C. durissus*, que apresenta uma ação preponderantemente miotóxica, as serpentes do gênero *Bothrops* apresentam um veneno bastante complexo com uma pronunciada ação proteolítica que, em teoria, seria ainda mais adequada no auxílio do processo digestório (Queiroz *et al.*, 2008). Todavia, em um trabalho envolvendo duas espécies de viperídeos do velho mundo (*Trimeresurus stejnegeri* e *Trimeresurus gracilis*), que possuem um veneno caracteristicamente proteolítico, não foi detectada qualquer melhora no desempenho digestório através da ação do veneno (Chu *et al.*, 2009), assim como também não o foi para *Crotalus atrox* (McCue, 2007). Neste ponto, o presente trabalho corrobora com os resultados supracitados já que os indivíduos de *Bothrops* utilizados foram alimentados forçadamente durante o breve momento de inconsciência induzido pela utilização do gás carbônico. É improvável que alguma quantidade significativa de veneno tenha sido inoculada durante o processo, ainda assim os coeficientes de aumento metabólico pós-prandial são próximos dos encontrados em outros viperídeos estudados (Andrade *et al.*, 1997; Zaidan & Beaupre, 2003; Tsai *et al.*, 2008) e menores do que os coeficientes determinados para pythonídeos (Secor & Diamond, 2000; Ott & Secor, 2007).

Apesar da necessidade de se interpretar com cautela as comparações de resultados do AMPP e $E_{AMPP}\%$ para animais que apresentem massas corpóreas diferentes, devido a

variação não isométrica (inclinação = 1 e intercepto = 0) do $E_{AMPP}\%$ pela massa (ver Beaupre, 2006), é difícil negar que o conjunto de evidências apontam para um modelo digestório mais econômico. O motivo pelo qual os Crotalinae apresentam o AMPP e, por conseguinte, o $E_{AMPP}\%$ relativamente baixos quando comparadas a outras serpentes de alimentação infrequente permanece misterioso, já que aparentemente a hiper-responsividade pós-prandial envolvendo a remodelação de tecidos e atividade de transportadores é bastante representativa quando compara ao remodelamento dos animais de alimentação infrequente (ver Secor e Diamond, 2000 como exemplo), além das taxas metabólicas de repouso destes animais, no geral, não apresentam valores maiores do que os esperados para os animais de alimentação infrequente (Secor & Nagy, 1994; Beaupre & Duvall, 1998; McCue & Lillywhite, 2002; Zaidan & Beaupre, 2003; Dorcas *et al.*, 2004).

Outras características geralmente aferidas na caracterização do AMPP em serpentes como o escopo metabólico, o tempo para o pico metabólico e tempo total do AMPP também apresentaram congruência com outros trabalhos em que foram aferidas estas variáveis (Gavira & Andrade, 2013a; b). Todavia, por estarem diretamente relacionadas a temperatura em que a digestão está sendo processada e a quantidade de alimento ingerida extrapolações tem de ser feitas com cautela e tomando-se o cuidado para devidas correções.

Apesar da proporção relativa de alimento oferecido aos filhotes ter sido maior quando comparada ao que foi oferecido ao adultos de *Bothrops* desse estudo (20% vs 15%), o escopo metabólico médio dos filhotes foi, de um modo generalizado, inferior. Uma das possíveis explicações para este resultado advém da desproporcional diferença nas taxas metabólicas de repouso dos animais (TMRP). É possível que os filhotes estejam submetidos a um compromisso metabólico diferente dos animais adultos. A alometria metabólica, a necessidade de alocamento energético para o crescimento e a própria restrição espacial para o armazenamento de substratos energéticos podem exigir destes animais um maior nível de atividade e uma alimentação mais frequente. A manutenção de um organismo mais ativo, neste caso, implica numa menor necessidade de remodelamento digestório pós-prandial e, por conseguinte, menores valores de EM, AMPP, T_{peak} e T_{AMPP} (Secor e Diamond, 2000).

A despeito das demais diferenças estarem positivamente relacionadas com o tamanho dos animais, o tempo total de duração do AMPP (T_{AMPP}) dos indivíduos filhotes foi superior ao T_{AMPP} dos adultos. Apesar de animais em estado metabólico mais ativo apresentarem geralmente T_{AMPP} menores (Secor e Diamond, 2000), no caso de filhotes, o retorno dos valores de taxa metabólica aos níveis normais de repouso (T_{AMPP}) é complexo, dada sua alta taxa de conversão alimentar e elevado ganho de massa após a alimentação. Esses fatores, em conjunto, podem levar a um aumento substancial na massa do filhote em curto intervalo de tempo e, por conseguinte, elevar

sua taxa metabólica de repouso. A elevação da taxa metabólica pode postergar, ou mesmo impossibilitar, que os registros de consumo de oxigênio atinjam novamente os valores pré-prandiais. Ainda que não tenha sido avaliado no presente trabalho, o tempo de trânsito intestinal dos filhotes foi aparentemente mais curto do que o dos adultos e, ainda que este não seja um bom estimador do ciclo digestório dos animais, é possível que este fator esteja associado a taxas metabólicas mais altas (Lillywhite, 2014).

b) Relação entre a variação ontogenética na dieta e as taxas metabólicas pós-prandiais das serpentes do gênero Bothrops:

Um dos fatores preponderantes na gênese e dimensão da resposta metabólica pós-prandial é a constituição do alimento (McCue, 2006; Secor, 2009; Bessler *et al.*, 2010). Em termos gerais o AMPP está diretamente associado ao conteúdo proteico do alimento, já que carboidratos e gorduras rotineiramente levam a baixas respostas metabólicas pós-prandiais (McCue, 2006; Secor & Boehm, 2006; Secor, 2009; Bessler *et al.*, 2010). Como carnívoras estritas, as serpentes de modo geral ingerem proporcionalmente grandes quantidades de proteína em suas refeições (Greene, 1997; Bessler *et al.*, 2010). Todavia, diferentes itens alimentares podem variar consideravelmente em sua constituição assim como em seu conteúdo energético específico o que, por sua vez, pode exercer um efeito direto nos aumentos metabólicos pós-prandiais e coeficientes de AMPP. Neste sentido, Bessler e colaboradores (2010)

determinaram experimentalmente a influência de distintos itens alimentares na resposta pós-prandial de *Thamnophis sirtalis*. Seus resultados apontam para uma evidente diferença na amplitude do escopo metabólico, no AMPP e no $E_{AMPP}\%$ quando itens alimentares distintos são comparados. Segundo os autores o custo metabólico na digestão do anfíbio *Lithobates clamitans* é cerca de metade do custo metabólico decorrente da digestão do roedor (*Mus musculus*) (196 vs. 406 KJ/Kg, respectivamente, para itens alimentares de massa igual a 12g). Assumindo a aplicabilidade dos resultados de Bessler e colaboradores (2010) para outros grupos de serpentes e levando em consideração que o AMPP representa uma porção significativa do custo energético anual de serpentes pouco ativas (Secor & Nagy, 1994; Christian *et al.*, 2007) é possível hipotetizar que um animal especialista em mamíferos possa apresentar alguma característica fisiológica que lhe permita um maior aproveitamento energético da ingesta através, por exemplo, de uma diminuição na quantidade de energia dispendida durante a digestão destes itens. Os resultados do presente trabalho parecem corroborar com este cenário, já que os resultados de AMPP dos filhotes de *Bothrops alternatus* (especialista em mamíferos) foram significativamente menores do que os AMPPs estimados para os filhotes das demais espécies de *Bothrops*, que durante a juventude se alimentam preponderantemente de ectotermos.

Durante a ontogênese estas outras espécies de *Bothrops* tendem a incluir cada vez mais frequentemente mamíferos entre seus itens alimentares, até que estes componham

uma porção significativa de suas dietas (Martins *et al.*, 2002). Tal fato poderia ser refletido na perda desta diferença de custo energético na digestão dos roedores nos animais adultos. Neste contexto, novamente, os dados do presente trabalho corroboram com esta hipótese já que *Bothrops alternatus* adultos não apresentaram qualquer evidência de diferenças significativas no custo do AMPP frente a uma presa mamífera quando comparadas as demais *Bothrops* do presente trabalho. Outra possível explicação, não mutuamente exclusiva, poderia advir do fato de que filhotes de *Bothrops alternatus* são mais ativos e, por conseguinte, teriam uma taxa metabólica de repouso mais elevada do que as demais (Secor & Diamond, 2000). Apesar da falta de dados ecológicos precisos a respeito do padrão de atividade de filhotes de *B. alternatus* o fato de serem animais especializados em pequenos mamíferos desde o nascimento pode ajudar a prever a sua estratégia de forrageamento. É possível que sua dieta seja constituída principalmente por filhotes de roedores (animais de baixa mobilidade), obrigando estes animais ao uso de uma estratégia de forrageamento mais ativa e com maiores níveis de deslocamento. Entretanto, os interceptos gerados na regressão da taxa metabólica de repouso (TMRP) pela massa de *B. alternatus* não apresentaram diferenças significativas com relação àqueles obtidos para *B. jararaca* e mesmo as diferenças detectadas para *B. erythromelas*, *B. atrox* e *B. jararacussu* não são proporcionais a diferença no valor do AMPP para as diferentes espécies. Assim sendo, apesar da estratégia de forrageamento mais ativa nos filhotes de *B. alternatus* não ser

invalidada, já que já foram descritos forrageadores ativos com baixas taxas metabólicas (como por exemplo *Lichanura trivirgata*, Secor e Diamond, 2000), aparentemente seu baixo AMPP parece não estar ligado diretamente a um valor de TMRP proporcionalmente alto.

O mecanismo subjacente ao modesto custo metabólico da digestão de *B. alternatus* filhotes quando comparado às outras serpentes do gênero testadas não está claro, assim como ainda permanece desconhecido o efeito desta diferença no desenvolvimento dos animais. Por apresentarem uma taxa metabólica de repouso próxima aos demais filhotes das espécies de *Bothrops* medidos e um AMPP significativamente menor, é provável que *B. alternatus* apresente um maior crescimento relativo quando o tipo e tamanho proporcional do item alimentar é padronizado? Observações feitas em cativeiro levam a crer que essa é uma possibilidade (observações pessoais). Contudo, um estudo criterioso e de longo prazo que teste esta hipótese é necessário para a melhor compreensão do fenômeno. Um interessante ponto a ser considerado é referente a posição de *B. alternatus* dentro da filogenia de *Bothrops*, já que *B. alternatus* faz parte de um ramo que divergiu relativamente cedo dentro do gênero e seu agrupamento filogenético possui espécies generalistas e especialistas em mamíferos (Martins *et al.*, 2002). Neste contexto, trabalhos que investiguem o AMPP dentro do grupo podem ser especialmente esclarecedores no tocante a evolução destas respostas metabólicas. Por fim, futuros trabalhos que avaliem a influência de diferentes itens alimentares nos perfis das taxas

metabólicas pós-prandiais de espécies especialistas e generalistas são necessários para a melhor compreensão de como uma característica ecológica ligada a estratégia alimentar pode ou não afetar a resposta fisiológica digestória desses animais.

Referências Bibliográficas:

- Andrade, D. V.; Cruz-Neto, A. P. & Abe, A. S. (1997). "Meal Size and Specific Dynamic Action in the Rattlesnake *Crotalus Durissus* (Serpentes : Viperidae)." Herpetologica **53**(4): 485-493.
- Barbo, F. E.; Grazziotin, F. G.; Sazima, I.; Martins, M. & Sawaya, R. J. (2012). "A New and Threatened Insular Species of Lancehead from Southeastern Brazil." Herpetologica **68**(3): 418-429.
- Beaupre, S. J. (2005). "Ratio Representations of Specific Dynamic Action (Mass-Specific Sda and Sda Coefficient) Do Not Standardize for Body Mass and Meal Size." Physiological and Biochemical Zoology **78**(1): 126-131.
- Beaupre, S. J. & Duvall, D. (1998). "Variation in Oxygen Consumption of the Western Diamondback Rattlesnake (*Crotalus Atrox*): Implications for Sexual Size Dimorphism." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **168**(7): 497-506.
- Beaupre, S. J. & Zaidan, F. (2001). "Scaling of Co₂ Production in the Timber Rattlesnake (*Crotalus Horridus*), with Comments on Cost of Growth in Neonates and Comparative Patterns." Physiological and Biochemical Zoology **74**(5): 757-768.
- Bessler, S. M.; Stubblefield, M. C.; Ultsch, G. R. & Secor, S. M. (2010). "Determinants and Modeling of Specific Dynamic Action for the Common Garter Snake (*Thamnophis Sirtalis*)." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **88**(8): 808-820.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. (2004). *Venomous of the Western Hemisphere*, Cornell University, Press, Ithaca, New York. v.1.
- Christel, C.; DeNardo, D. & Secor, S. (2007). "Metabolic and Digestive Response to Food Ingestion in a Binge-Feeding Lizard, the Gila Monster (*Heloderma Suspectum*)." Journal of Experimental Biology **210**(19): 3430-3439.
- Christian, K.; Webb, J. K.; Schultz, T. & Green, B. (2007). "Effects of Seasonal Variation in Prey Abundance on Field Metabolism, Water Flux, and Activity of a Tropical Ambush Foraging Snake." Physiological and Biochemical Zoology **80**(5): 522-533.
- Chu, C. W.; Tsai, T. S.; Tsai, I. H.; Lin, Y. S. & Tu, M. C. (2009). "Prey Envenomation Does Not Improve Digestive Performance in Taiwanese Pit Vipers (*Trimeresurus Gracilis* and *T. Stejnegeri Stejnegeri*)." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **152**(4): 579-585.
- Cruzneto, A. P. & Abe, A. S. (1994). "Ontogenic Variation of Oxygen-Uptake in the Pitviper *Bothrops Moojeni* (Serpentes, Viperidae)." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **108**(4): 549-554.

- Cundall, D. & Greene, H. (1982). "Evolution of the Feeding Apparatus in Alethinophidian Snakes." American Zoologist **22**(4): 924-924.
- Dorcas, M. E.; Hopkins, W. A. & Roe, J. H. (2004). "Effects of Body Mass and Temperature on Standard Metabolic Rate in the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus Adamanteus*)." Copeia(1): 145-151.
- Egler, S. G.; Oliveira, M. E. & Martins, M. (1996). *Bothrops Atrox* (Common Lancehead), Foraging Behavior and Ophiophagy. *Herpetol. Rev.* . **27**: 22-23.
- Enok, S.; Simonsen, L. S. & Wang, T. (2013). "The Contribution of Gastric Digestion and Ingestion of Amino Acids on the Postprandial Rise in Oxygen Consumption, Heart Rate and Growth of Visceral Organs in Pythons." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **165**(1): 46-53.
- Gavira, R. S. B. & Andrade, D. V. (2013a). "Meal Size Effects on the Postprandial Metabolic Response of *Bothrops Alternatus* (Serpentes: Viperidae)." Zoologia **30**(3): 291-295.
- Gavira, R. S. B. & Andrade, D. V. (2013b). "Temperature and Thermal Regime Effects on the Specific Dynamic Action of *Bothrops Alternatus* (Serpentes, Viperidae)." Amphibia-Reptilia **34**(4): 483-491.
- Greene, H. W. (1997). *Snakes: The Evolution of Mystery in Nature*. London, *Univers. Californ. Press*.
- Greene, S.; McConnachie, S.; Secor, S. & Perrin, M. (2013). "The Effects of Body Temperature and Mass on the Postprandial Metabolic Responses of the African Egg-Eating Snakes *Dasypeltis Scabra* and *Dasypeltis Inornata*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **165**(2): 97-105.
- Hampton, P. M. & Moon, B. R. (2013). "Gape Size, Its Morphological Basis, and the Validity of Gape Indices in Western Diamond-Backed Rattlesnakes (*Crotalus Atrox*)." Journal of Morphology **274**(2): 194-202.
- Hartmann, M. T.; Hartmann, P. A.; Cechin, S. Z. & Martins, M. (2005). "Feeding Habits and Habitat Use in *Bothrops Pubescens* (Viperidae, Crotalinae) from Southern Brazil." Journal of Herpetology **39**(4): 664-667.
- Hartmann, P. A.; Hartmann, M. T. & Giasson, L. O. M. (2003). Uso Do Habitat E Alimentação Em Juvenis De *Bothrops Jararaca* (Serpentes: Viperidae) Na Mata Atlântica Do Sudeste Do Brasil. *Phyllomedusa* **v.2:1**: 35-41.
- Hopkins, W. A.; Roe, J. H.; Philippi, T. & Congdon, J. D. (2004). "Standard and Digestive Metabolism in the Banded Water Snake, *Nerodia Fasciata Fasciata*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **137**(1): 141-149.
- Lillywhite, H. B. (2014). *How Snakes Work: Structure, Function and Behaviour of the World's Snakes*, Oxford University Press.

- Marques, O. A. V.; Martins, M. & Sazima, I. (2002). "A New Insular Species of Pitviper from Brazil, with Comments on Evolutionary Biology and Conservation of the Bothrops Jararaca Group (Serpentes, Viperidae)." Herpetologica **58**(3): 303-312.
- Marques, O. A. V. & Sazima, I. (2009). "Old Habits Die Hard: Mouse Handling by a Pitviper Species on a Rodent-Free Island." Amphibia-Reptilia **30**(3): 435-438.
- Martins, M.; Marques, O. A. V. & Sazima, I. (2002). Ecological and Phylogenetic Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers (Genus *Bothrops*). In: Schuett G. W.; Hoggren M.; Douglas M. E. And Greene H. W. In *Biology of the Vipers*, Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, UT.: 307-328.
- McCue, M. D. (2006). "Specific Dynamic Action: A Century of Investigation." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **144**(4): 381-394.
- McCue, M. D. (2007). "Prey Envenomation Does Not Improve Digestive Performance in Western Diamondback Rattlesnakes (*Crotalus Atrox*)." Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology **307A**(10): 568-577.
- McCue, M. D.; Bennett, A. F. & Hicks, J. W. (2005). "The Effect of Meal Composition on Specific Dynamic Action in Burmese Pythons (*Python Molurus*)." Physiological and Biochemical Zoology **78**(2): 182-192.
- McCue, M. D. & Lillywhite, H. B. (2002). "Oxygen Consumption and the Energetics of Island-Dwelling Florida Cottonmouth Snakes." Physiological and Biochemical Zoology **75**(2): 165-178.
- Monteiro, C.; Montgomery, C. E.; Spina, F.; Sawaya, R. J. & Martins, M. (2006). "Feeding, Reproduction, and Morphology of *Bothrops Matogrossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal." Journal of Herpetology **40**(3): 408-413.
- Nogueira, C.; Sawaya, R. J. & Martins, M. (2003). "Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado." Journal of Herpetology **37**(4): 653-659.
- Oliveira, M. E. & Martins, M. (2001). When and Where to Find a Pitviper: Activity Patterns and Habitat Use of the Lancehead *bothrops Atrox* in Central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History* **8**: 101-110.
- Ott, B. D. & Secor, S. M. (2007). "Adaptive Regulation of Digestive Performance in the Genus *Python*." Journal of Experimental Biology **210**(2): 340-356.
- Queiroz, G. P.; Pessoa, L. A.; Portaro, F. C. V.; Furtado, M. D. D. & Tambourgi, D. V. (2008). "Interspecific Variation in Venom Composition and Toxicity of Brazilian Snakes from *Bothrops* Genus." Toxicon **52**(8): 842-851.
- Roe, J. H.; Hopkins, W. A.; Snodgrass, J. W. & Congdon, J. D. (2004). "The Influence of Circadian Rhythms on Pre- and Post-Prandial Metabolism in the Snake *Lamprophis Fuliginosus*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **139**(2): 159-168.

- Sazima, I. (1992). natural History of the Jararaca Pitviper, *bothrops Jararaca*, in Southeastern Brazil. In: Biology of the pitvipers. Campbell, J. A.; Brodie, E. D., Tyler, Texas, EUA: Selva.: 199-216.
- SECOR, S. & DIAMOND, J. (1994). "Burmese Pythons - a New Model of Gastrointestinal Adaptation." Faseb Journal **8**(4): A62-A62.
- Secor, S. M. (2009). "Specific Dynamic Action: A Review of the Postprandial Metabolic Response." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **179**(1): 1-56.
- Secor, S. M. & Boehm, M. (2006). "Specific Dynamic Action of Ambystomatid Salamanders and the Effects of Meal Size, Meal Type, and Body Temperature." Physiological and Biochemical Zoology **79**(4): 720-735.
- Secor, S. M. & Diamond, J. (1998). "A Vertebrate Model of Extreme Physiological Regulation." Nature **395**(6703): 659-662.
- Secor, S. M. & Diamond, J. M. (2000). "Evolution of Regulatory Responses to Feeding in Snakes." Physiological and Biochemical Zoology **73**(2): 123-141.
- Secor, S. M. & Nagy, K. A. (1994). "Bioenergetic Correlates of Foraging Mode for the Snakes *Crotalus-Cerastes* and *Masticophis-Flagellum*." Ecology **75**(6): 1600-1614.
- Toledo, L. F.; Abe, A. S. & Andrade, D. V. (2003). "Temperature and Meal Size Effects on the Postprandial Metabolism and Energetics in a Boid Snake." Physiological and Biochemical Zoology **76**(2): 240-246.
- Tsai, T. S.; Lee, H. J. & Tu, M. C. (2008). "Specific Dynamic Action, Apparent Assimilation Efficiency, and Digestive Rate in an Arboreal Pitviper, *Trimeresurus Stejnegeri Stejnegeri*." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **86**(10): 1139-1151.
- Valdujo, P. H.; Nogueira, C. & Martins, M. (2002). "Ecology of *Bothrops Neuwiedi Pauloensis* (Serpentes : Viperidae : Crotalinae) in the Brazilian Cerrado." Journal of Herpetology **36**(2): 169-176.
- Zaidan, F. & Beaupre, S. J. (2003). "Effects of Body Mass, Meal Size, Fast Length, and Temperature on Specific Dynamic Action in the Timber Rattlesnake (*Crotalus Horridus*)." Physiological and Biochemical Zoology **76**(4): 447-458.

4.0 Discussão geral e Considerações finais:

As taxas metabólicas de serpentes vêm sendo alvo de estudos em diferentes contextos durante as últimas décadas (Andrews & Pough, 1985; Chappell & Ellis, 1987; Cruzneto & Abe, 1994; Secor & Nagy, 1994; Andrade *et al.*, 1997; Bedford & Christian, 1998; Beaupre & Zaidan, 2001; McCue & Lillywhite, 2002; Dorcas *et al.*, 2004; Hopkins *et al.*, 2004; Roe *et al.*, 2004; Lignot *et al.*, 2005; McCue *et al.*, 2005; McCue, 2006; Christian *et al.*, 2007; Ott & Secor, 2007; Secor, 2009; Bessler *et al.*, 2010; Bronikowski & Vleck, 2010; Gavira & Andrade, 2013; Greene *et al.*, 2013). O avanço tecnológico dos equipamentos utilizados bem como o refinamento dos métodos de análise empregados permitiram, ao longo deste período, resultados cada vez mais representativos.

A maioria dos trabalhos realizados até o presente momento concentrou-se na caracterização e análise das taxas metabólicas de repouso (TMR e TMRP) e pós-prandiais das diferentes espécies. Tal enfoque deve-se, em grande parte, a importância destes dois parâmetros no modo de vida dos animais, sendo geralmente responsáveis pela maior parte de sua despesa energética anual (Secor & Nagy, 1994; Christian *et al.*, 2007). Além disso, outras questões também tem ganhado destaque, como o emprego das serpentes de alimentação infrequente como modelos de estudos de fisiologia digestória (Secor & Diamond, 1998; Secor & Diamond, 2000).

Apesar do número relativamente alto de estudos sobre as taxas metabólicas de repouso e pós-prandiais em serpentes nas últimas décadas, existe uma forte tendência no tipo de abordagem que geralmente é realizada, o que por vezes acaba deixando importantes lacunas na compreensão de como tais taxas variam na história evolutiva do grupo. Um exemplo deste fato advém da falta de emprego de ferramentas filogenéticas nas comparações metabólicas entre os diferentes táxons. Há mais de duas décadas ferramentas de ponderação filogenética foram desenvolvidas e aperfeiçoadas (Felsenstein, 1985; Grafen, 1989; Garland *et al.*, 1992; Pagel, 1999; Rohlf, 2001; Freckleton *et al.*, 2002; Blomberg *et al.*, 2003; Garland *et al.*, 2005; Ives *et al.*, 2007; Revell *et al.*, 2008; Ives & Garland, 2010). Contudo, até o presente momento nosso trabalho foi o primeiro a usar esta abordagem no estudo das taxas metabólicas de repouso de serpentes. Da mesma forma, as relações alométricas das taxa metabólicas de repouso de serpentes têm sido estudadas ao longo dos últimos anos com certa frequência (Andrews & Pough, 1985; Chappell & Ellis, 1987; Cruzneto & Abe, 1994; Secor & Nagy, 1994; Andrade *et al.*, 1997; Bedford & Christian, 1998; Beaupre & Zaidan, 2001; McCue & Lillywhite, 2002; Dorcas *et al.*, 2004; Hopkins *et al.*, 2004; Roe *et al.*, 2004; Lignot *et al.*, 2005; McCue *et al.*, 2005; McCue, 2006; Christian *et al.*, 2007; Ott & Secor, 2007; Secor, 2009; Bessler *et al.*, 2010; Bronikowski & Vleck, 2010; Gavira & Andrade, 2013; Greene *et al.*, 2013), porém poucos desses estudos abordaram a influência da massa nas taxas metabólicas pós-prandiais destes animais a despeito de seu importante efeito (Zaidan & Beaupre, 2003; Beaupre, 2005; Tsai *et al.*, 2008). Ao invés disso, alguns dos autores

utilizaram o cálculo da taxa metabólica para uma massa comum através do emprego de expoentes de regressão de repouso para as comparações entre diferentes táxons (Secor & Diamond, 2000). Este procedimento é criticável, pois provavelmente, incorre em um erro já que, ao menos nos trabalhos que determinaram expoentes de massa corpórea para AMPP (Beaupre & Zaidan, 2003; Tsai, 2008), estes foram consideravelmente maiores do que aqueles determinados para TMRP. No presente trabalho foi usada uma abordagem que incorpora nas análises alguns dos pontos menos explorados até o momento como: 1) a influência das relações filogenéticas da taxa metabólica de repouso; 2) a incorporação da massa corpórea nas análises sobre o AMPP; e 3) a incorporação de uma análise sobre a variação ontogenética sobre o AMPP. Em linhas gerais, os principais resultados deste trabalho acerca da análise da influência filogenética e da estratégia alimentar sobre a TMRP discordam da hipótese proposta por Secor & Diamond (2000) ainda que as interpretações de ambas as análises devam ser vistas com cautela (ver discussão específica no capítulo 2). Os achados aqui apresentados para o gênero *Bothrops* apontam para as conclusões de que:

1) as serpentes deste gênero são animais econômicos do ponto de vista de suas demandas energéticas em repouso tais quais as demais espécies de Crotalinae estudadas, uma vez que estas apresentam TMRP inferior as taxas metabólicas de repouso da maioria das outras espécies de serpentes medidas até o presente momento (Chappell & Ellis, 1987; Beaupre & Duvall, 1998; McCue & Lillywhite, 2002; Zaidan & Beaupre, 2003; Dorcas *et al.*, 2004);

2) as taxas metabólicas de repouso das serpentes de *Bothrops* aqui estudadas variaram positivamente com a massa corpórea e não apresentaram diferenças significativas entre si, independentemente da filogenia ou do habitat que ocupam;

3) o perfil das alterações relacionadas ao AMPP foi semelhante ao de outras serpentes, com um abrupto aumento metabólico nas primeiras horas após a ingestão do alimento e um lento e gradual retorno as taxas metabólicas pré-prandiais (ver McCue, 2006; Secor, 2009);

4) os valores de AMPP e $E_{AMPP}\%$ determinados foram próximos àqueles aferidos para os demais Crotalinae e estão de acordo com a hipótese de que estes animais apresentam um custo digestório bastante inferior àqueles mensurados em outras serpentes que se alimentam infreqüentemente, como pythonídeos e bóídeos (ver Andrade et al., 1997; Zaidan e Beaupre, 2003);

5) Os indivíduos filhotes de *Bothrops alternatus* (especialista em mamíferos) apresentaram um menor custo energético para o processamento da ingesta (lactentes de camundongos) quando comparados as espécies de *Bothrops* generalistas alimentares, o que representa diferentes compromissos metabólicos relacionados as diferentes estratégias alimentares (especialista x generalista).

Ainda que a quantidade de informações acerca das taxas metabólicas das serpentes venha acumulando-se ao longo dos anos, a compreensão de como outros elementos

relacionados ao modo de vida destes animais influenciam em seu balanço energético ainda é incipiente. Dentro deste contexto, alguns desses principais elementos serão discutidos a seguir com perspectivas para futuros estudos:

a) Ritmos circadianos

A incorporação de elementos cronobiológicos é um aspecto que deve ser levado em consideração em futuros estudos que avaliem o metabolismo das serpentes e parece variar consideravelmente de espécie para espécie. Roe e colaboradores (2004) notaram um forte componente circadiano nas taxas metabólicas de *Lamprophis fuliginosus*. Por outro lado, nenhuma diferença metabólica circadiana foi notada por Bedford e Christian (1998) para 7 espécies de pythonídeos australianos. É provável que, para certas espécies de serpentes, a ritmicidade na taxa metabólica possa guardar relações com as condições do ambiente, e fatores sazonais (Stuginski *et al.*, 2012). Neste contexto, a determinação do padrão circadiano e sazonal das atividades é essencial e tanto estudos de campo como estudos desenvolvidos em laboratório podem contribuir em tais determinações (Oliveira & Martins, 2001; Brown *et al.*, 2005; Christian *et al.*, 2007; Abom *et al.*, 2012; Howze & Smith, 2012; Maritz & Alexander, 2012; Stuginski *et al.*, 2012).

b) Biologia térmica das serpentes

As serpentes, tal qual a imensa maioria dos demais répteis, são incapazes de sustentar altas temperaturas corporais através de seu metabolismo energético (Cowles & Bogert, 1944; Huey, 1982; Lillywhite, 1987; Hertz *et al.*, 1993), salvo em determinadas situações particulares (Tattersall *et al.*, 2004; Stuginski *et al.*, 2011). Assim, a dependência da temperatura ambiental é, provavelmente, um dos fatores de grande relevância na dispersão, atividades diárias e sazonais destes animais (Jacobson *et al.*, 2012). Ainda que tal dependência seja mais evidente nas espécies termorreguladoras ativas (Lillywhite, 1987; Roark & Dorcas, 2000; Luiselli & Akani, 2002), mesmo espécies que não apresentam termorregulação comportamental, ou aquelas que vivem em ambientes termoe estáveis, sofrem alguma influência da temperatura ambiental (Shine *et al.*, 2002). Isto deve-se ao fato de que a muitos dos desempenhos fisiológicos nestes animais (p.ex.: locomoção, digestão, capacidade de percepção através dos sentidos, reprodução entre outras) são dependentes do intervalo de temperaturas disponíveis no ambiente (Huey, 1982; Lillywhite, 1987; Mori *et al.*, 2002; Ladyman *et al.*, 2003; Lourdais *et al.*, 2004; Aubret *et al.*, 2005; Bessler *et al.*, 2010; Beaupre & Zaidan, 2012; Aidam *et al.*, 2013). As taxas metabólicas são especialmente sensíveis à temperatura e, em termos gerais, tendem a aumentar significativamente em animais ectotérmicos conforme a temperatura aumenta, podendo mais do que dobrar em um

intervalo térmico de 10°C (Chappell & Ellis, 1987; Bedford & Christian, 1998; Dorcas *et al.*, 2004). A magnitude deste aumento é simbolizada pelos valores de Q10 e varia conforme a espécie e o intervalo térmico em que é aferido. Chappell e Ellis em 1987 determinaram valores médios de Q10 ao redor de 2,61 para os pythonídeos e boídeos aferidos entre 20-30°C. Já Bedford e Christian em 1998, observaram valores de Q10 que variavam entre 1,48 e 4,10 (24-30°C) para 7 espécies de pythonídeos australianos. Em viperídeos, uma série de trabalhos apontam para valores que variaram entre 1,8 e 4,8 (Beaupre & Duvall, 1998; Beaupre & Zaidan, 2001; McCue & Lillywhite, 2002; Zaidan & Beaupre, 2003; Dorcas *et al.*, 2004). Assim sendo, as mudanças na temperatura corporal destes animais decorrentes de mudanças no ambiente tem um efeito direto sobre o seu custo de manutenção, o que de fato é notado pela procura por temperaturas preferenciais diferenciadas durante o repouso e a atividade (Stuginski *et al.*, dados não publicados). O efeito da temperatura sobre a digestão destes animais é mais sutil. Como foi discutido anteriormente, diferentes temperaturas parecem afetar pouco o AMPP em diversas espécies, ocorrendo apenas uma aceleração do processo digestório (McCue, 2006; Secor, 2009). Todavia, este fator pode representar uma significativa vantagem ecológica já que animais que completem a digestão mais rapidamente podem alimentar-se novamente em um intervalo mais curto e evitarem o risco de predação pela limitação de sua mobilidade dado o grande volume de alimento no trato gastrointestinal (Lillywhite, 2014). Assim, a variação na taxa metabólica em

função da temperatura e a diversidade de estratégias termais empregadas por estes animais durante as suas atividades levam a uma enorme consequência energética. Certamente, o conhecimento sobre a biologia termal destes animais é fundamental na aplicação dos dados metabólicos gerados em laboratório para modelos que contemplem a ecologia de vida livre desses animais.

c) Taxas metabólicas de campo

A mensuração das taxas metabólicas de repouso e pós-prandiais sobre regimes térmicos pré-estabelecidos fornecem importantes evidências sob como tais taxas se modificam em função de outras variáveis. Todavia, em vida livre, as relações metabólicas destes animais são mais complexas e envolvem diferentes níveis de atividades e variação termal. Neste contexto, as medidas metabólicas de campo (FMR do inglês *field metabolic rate*) são de extrema importância, por avaliarem o gasto metabólico dos animais em campo durante suas atividades rotineiras e sob condições abióticas naturais (Secor & Nagy, 1994; Christian *et al.*, 2007). Tal técnica usa a ciclagem de isótopos marcados de hidrogênio e oxigênio para estimar a taxa metabólica destes animais e seu uso em répteis vem se mostrando promissor (Speakman & Racey, 1988a; b; Nagy, 1989; Butler *et al.*, 2004; Nagy, 2005). A compilação dos dados das taxas metabólicas de campo (FMR), somados ao TMPR, AMPP e o conhecimento da biologia térmica destes animais é determinante na

compreensão de como as serpentes alocam sua energia ao longo da vida e permite, por exemplo, estimar a quantidade de energia empregada nas diferentes atividades diárias e sazonais. Isso permite estimar quanto da energia anual é devotada à digestão, repouso, deslocamento entre outras atividades (Christian *et al.*, 2007). Neste contexto, a associação de mais estudos que avaliem os padrões de atividade e deslocamento dos animais em seu ambiente natural é absolutamente crucial na interpretação dos resultados fisiológicos interpretados à luz da ecologia dos animais.

d) Custo metabólico da reprodução

As serpentes apresentam uma biologia reprodutiva bastante diversificada. Esta variedade é evidente nos modos de reprodução (viviparidade e oviparidade), nos períodos em que esta ocorre, nos rituais comportamentais ligados a corte e a cópula, na diversificação do grau de interação entre a mãe e os embriões (placentação), nas estratégias fisiológicas envolvidas na capitalização de recursos para o ato reprodutivo (*Capital breeders* vs *Incoming breeders*), além de outras intrigantes características fisiológicas ligadas a estocagem espermática (Bonnet & Naulleau, 1994; 1996; Naulleau & Bonnet, 1996; Almeida-Santos *et al.*, 2004; Michel *et al.*, 2013). Assim como o é para uma grande variedade de espécies, o investimento reprodutivo nas serpentes representa uma parte significativa do orçamento metabólico. Fêmeas de serpentes *capital breeders* em áreas sujeitas a uma forte variação da atividade sazonal,

por exemplo, podem ter de estocar reservas por alguns anos até estarem aptas ao evento reprodutivo (Bonnet & Naulleau, 1994; Naulleau & Bonnet, 1996; Ladyman *et al.*, 2003; Lourdais *et al.*, 2004). Além do custo metabólico associado a vitelogênese, o aumento de massa metabolicamente ativa e, por vezes, padrões termorregulatórios diferenciados também afetam diretamente as taxas metabólicas de repouso e por conseguinte o gasto energético destes animais (ver Van Dyke & Beaupre, 2011). Apesar da enorme consequência metabólica da reprodução, até o presente momento, poucos estudos avaliaram o custo energético ao longo da gestação (Van Dyke & Beaupre, 2011). Neste contexto, o emprego de técnicas respirométricas associadas ao acompanhamento ultrassonográfico do desenvolvimento dos embriões parece ser uma opção extremamente interessante para estudos futuros que tencionem esclarecer este ponto ainda obscuro acerca do metabolismo de serpentes.

Por fim, o estudo das taxas metabólicas de serpentes é uma área em expansão e aberta a ilimitadas possibilidades. O avanço tecnológico dos equipamentos, o refinamento das técnicas de análise, o melhor conhecimento acerca da ecologia dos animais e o crescente número de pesquisadores e estudantes interessados em desenvolver projetos nesta área destacam-na como um campo promissor dentro da herpetologia. Todavia, a integração entre as diferentes áreas do conhecimento neste campo ainda é deficitária e neste aspecto a multidisciplinaridade é uma importante ferramenta. É imperativo que futuros estudos tenham

uma abordagem cada vez mais multidisciplinar, incluindo elementos de áreas como a ecologia, sistemática, genética entre outras, para que seja possível uma compreensão mais holística dos fenômenos envolvidos neste aspecto tão importante da vida destes animais.

Referências bibliográficas:

- Abom, R.; Bell, K.; Hodgson, L. & Schwarzkopf, L. (2012). "Moving Day and Night: Highly Labile Diel Activity Patterns in a Tropical Snake." Biotropica **44**(4): 554-559.
- Aidam, A.; Michel, C. L. & Bonnet, X. (2013). "Effect of Ambient Temperature in Neonate Aspic Vipers: Growth, Locomotor Performance and Defensive Behaviors." Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology **319A**(6): 310-318.
- Almeida-Santos, S. M.; Abdalla, F. M. F.; Silveira, P. F.; Yamanouye, N.; Breno, M. C. & Salomao, M. G. (2004). "Reproductive Cycle of the Neotropical Crotalus Durissus Terrificus: I. Seasonal Levels and Interplay between Steroid Hormones and Vasotocinase." General and Comparative Endocrinology **139**(2): 143-150.
- Andrade, D. V.; Cruz-Neto, A. P. & Abe, A. S. (1997). "Meal Size and Specific Dynamic Action in the Rattlesnake Crotalus Durissus (Serpentes : Viperidae)." Herpetologica **53**(4): 485-493.
- Andrews, R. M. & Pough, F. H. (1985). "Metabolism of Squamate Reptiles - Allometric and Ecological Relationships." Physiological Zoology **58**(2): 214-231.
- Aubret, F.; Bonnet, X.; Shine, R. & Maumelat, S. (2005). "Why Do Female Ball Pythons (Python Regius) Coil So Tightly around Their Eggs?" Evolutionary Ecology Research **7**(5): 743-758.
- Beaupre, S. J. (2005). "Ratio Representations of Specific Dynamic Action (Mass-Specific Sda and Sda Coefficient) Do Not Standardize for Body Mass and Meal Size." Physiological and Biochemical Zoology **78**(1): 126-131.
- Beaupre, S. J. & Duvall, D. (1998). "Variation in Oxygen Consumption of the Western Diamondback Rattlesnake (Crotalus Atrox): Implications for Sexual Size Dimorphism." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **168**(7): 497-506.
- Beaupre, S. J. & Zaidan, F. (2001). "Scaling of Co₂ Production in the Timber Rattlesnake (Crotalus Horridus), with Comments on Cost of Growth in Neonates and Comparative Patterns." Physiological and Biochemical Zoology **74**(5): 757-768.
- Beaupre, S. J. & Zaidan, F. (2012). "Digestive Performance in the Timber Rattlesnake (Crotalus Horridus) with Reference to Temperature Dependence and Bioenergetic Cost of Growth." Journal of Herpetology **46**(4): 637-642.
- Bedford, G. S. & Christian, K. A. (1998). "Standard Metabolic Rate and Preferred Body Temperatures in Some Australian Pythons." Australian Journal of Zoology **46**(4): 317-328.

- Bessler, S. M.; Stubblefield, M. C.; Ultsch, G. R. & Secor, S. M. (2010). "Determinants and Modeling of Specific Dynamic Action for the Common Garter Snake (*Thamnophis Sirtalis*)."
Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **88**(8): 808-820.
- Blomberg, S. P.; Garland, T. & Ives, A. R. (2003). "Testing for Phylogenetic Signal in Comparative Data: Behavioral Traits Are More Labile." Evolution **57**(4): 717-745.
- Bonnet, X. & Naulleau, G. (1994). "A Body Condition Index (Bci) in Snakes to Study Reproduction." Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences **317**(1): 34-41.
- Bonnet, X. & Naulleau, G. (1996). "Catchability in Snakes: Consequences for Estimates of Breeding Frequency." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **74**(2): 233-239.
- Bronikowski, A. & Vleck, D. (2010). "Metabolism, Body Size and Life Span: A Case Study in Evolutionarily Divergent Populations of the Garter Snake (*Thamnophis Elegans*)."
Integrative and Comparative Biology **50**(5): 880-887.
- Brown, G. P.; Shine, R. & Madsen, T. (2005). "Spatial Ecology of Slatey-Grey Snakes (*Stegonotus Cucullatus*, Colubridae) on a Tropical Australian Floodplain." Journal of Tropical Ecology **21**: 605-612.
- Butler, P. J.; Green, J. A.; Boyd, I. L. & Speakman, J. R. (2004). "Measuring Metabolic Rate in the Field: The Pros and Cons of the Doubly Labelled Water and Heart Rate Methods." Functional Ecology **18**(2): 168-183.
- Chappell, M. A. & Ellis, T. M. (1987). "Resting Metabolic Rates in Boid Snakes - Allometric Relationships and Temperature Effects." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **157**(2): 227-235.
- Christian, K.; Webb, J. K.; Schultz, T. & Green, B. (2007). "Effects of Seasonal Variation in Prey Abundance on Field Metabolism, Water Flux, and Activity of a Tropical Ambush Foraging Snake." Physiological and Biochemical Zoology **80**(5): 522-533.
- Cowles, R. B. & Bogert, C. M. (1944). "A Preliminary Study of the Thermal Requirements of Desert Reptiles." Bulletin of the American Museum of Natural History **83**: 263-296.
- Cruzneto, A. P. & Abe, A. S. (1994). "Ontogenic Variation of Oxygen-Uptake in the Pitviper Bothrops Moojeni (Serpentes, Viperidae)." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **108**(4): 549-554.
- Dorcas, M. E.; Hopkins, W. A. & Roe, J. H. (2004). "Effects of Body Mass and Temperature on Standard Metabolic Rate in the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus Adamanteus*)."
Copeia(1): 145-151.
- Felsenstein, J. (1985). "Phylogenies and the Comparative Method." American Naturalist **125**(1): 1-15.

- Freckleton, R. P.; Harvey, P. H. & Pagel, M. (2002). "Phylogenetic Analysis and Comparative Data: A Test and Review of Evidence." American Naturalist **160**(6): 712-726.
- Garland, T.; Bennett, A. F. & Rezende, E. L. (2005). "Phylogenetic Approaches in Comparative Physiology." Journal of Experimental Biology **208**(16): 3015-3035.
- Garland, T.; Harvey, P. H. & Ives, A. R. (1992). "Procedures for the Analysis of Comparative Data Using Phylogenetically Independent Contrasts." Systematic Biology **41**(1): 18-32.
- Gavira, R. S. B. & Andrade, D. V. (2013). "Meal Size Effects on the Postprandial Metabolic Response of Bothrops Alternatus (Serpentes: Viperidae)." Zoologia **30**(3): 291-295.
- Grafen, A. (1989). "The Phylogenetic Regression." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **326**(1233): 119-157.
- Greene, S.; McConnachie, S.; Secor, S. & Perrin, M. (2013). "The Effects of Body Temperature and Mass on the Postprandial Metabolic Responses of the African Egg-Eating Snakes Dasypeltis Scabra and Dasypeltis Inornata." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **165**(2): 97-105.
- Hertz, P. E.; Huey, R. B. & Stevenson, R. D. (1993). "Evaluating Temperature Regulation by Field-Active Ectotherms - the Fallacy of the Inappropriate Question." American Naturalist **142**(5): 796-818.
- Hopkins, W. A.; Roe, J. H.; Philippi, T. & Congdon, J. D. (2004). "Standard and Digestive Metabolism in the Banded Water Snake, Nerodia Fasciata Fasciata." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **137**(1): 141-149.
- Howze, J. M. & Smith, L. L. (2012). "Factors Influencing Eastern Kingsnake Diel Activity." Copeia(3): 460-464.
- Huey, R. B. (1982). Temperature Physiology and Ecology of Reptiles. *Biology of Reptilia*. (Edited by Gans C. and Pough F. H.), Academic press, London. **v.12**: 25-91.
- Ives, A. R. & Garland, T. (2010). "Phylogenetic Logistic Regression for Binary Dependent Variables." Systematic Biology **59**(1): 9-26.
- Ives, A. R.; Midford, P. E. & Garland, T. (2007). "Within-Species Variation and Measurement Error in Phylogenetic Comparative Methods." Systematic Biology **56**(2): 252-270.
- Jacobson, E.; Barker, D.; Barker, T.; Mauldin, R.; Avery, M.; Engeman, R. & Secor, S. (2012). "Environmental Temperatures, Physiology and Behavior Limit the Range Expansion of Invasive Burmese Pythons in Southeastern USA." Integrative Zoology **7**(3): 271-285.
- Ladyman, M.; Bonnet, X.; Lourdaïs, O.; Bradshaw, D. & Naulleau, G. (2003). "Gestation, Thermoregulation, and Metabolism in a Viviparous Snake, Vipera Aspis:

Evidence for Fecundity-Independent Costs." Physiological and Biochemical Zoology **76**(4): 497-510.

Lignot, J. H.; Helmstetter, C. & Secor, S. M. (2005). "Postprandial Morphological Response of the Intestinal Epithelium of the Burmese Python (*Python Molurus*)."
Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **141**(3): 280-291.

Lillywhite, H. B. (1987). Temperature, Energetics, and Physiological Ecology. *In snakes: Ecology and Evolutionary Biology*. (Edited by Seigel R. A.; Collins J. T. And Novak S. S.), Macmillan, New York.: 422-477.

Lillywhite, H. B. (2014). *How Snakes Work: Structure, Function and Behaviour of the World's Snakes*, Oxford University Press.

Lourdais, O.; Shine, R.; Bonnet, X.; Guillon, M. & Naulleau, G. (2004). "Climate Affects Embryonic Development in a Viviparous Snake, *Vipera Aspis*." Oikos **104**(3): 551-560.

Luiselli, L. & Akani, G. C. (2002). "Is Thermoregulation Really Unimportant for Tropical Reptiles? Comparative Study of Four Sympatric Snake Species from Africa." Acta Oecologica-International Journal of Ecology **23**(2): 59-68.

Maritz, B. & Alexander, G. J. (2012). "Movement Patterns in the Smallest Viper, *Bitis Schneideri*." Copeia(4): 732-737.

McCue, M. D. (2006). "Specific Dynamic Action: A Century of Investigation." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **144**(4): 381-394.

McCue, M. D.; Bennett, A. F. & Hicks, J. W. (2005). "The Effect of Meal Composition on Specific Dynamic Action in Burmese Pythons (*Python Molurus*)."
Physiological and Biochemical Zoology **78**(2): 182-192.

McCue, M. D. & Lillywhite, H. B. (2002). "Oxygen Consumption and the Energetics of Island-Dwelling Florida Cottonmouth Snakes." Physiological and Biochemical Zoology **75**(2): 165-178.

Michel, C. L.; Pastore, J. H. & Bonnet, X. (2013). "Impact of Cool Versus Warm Temperatures on Gestation in the Aspic Viper (*Vipera Aspis*)."
Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **165**(3): 338-342.

Mori, A.; Toda, M. & Ota, H. (2002). Winter Activity of *Ovophis Okinavensis* in the Humid Subtropics: Foraging on Breeding Frogs under Cool Temperature. In Schuett G. W.; Hoggren M.; Douglas M. E. And Greene H. W. In *Biology of the Vipers*, Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, UT.

Nagy, K. A. (1989). "Field Bioenergetics - Accuracy of Models and Methods." Physiological Zoology **62**(2): 237-252.

Nagy, K. A. (2005). "Field Metabolic Rate and Body Size." Journal of Experimental Biology **208**(9): 1621-1625.

- Naulleau, G. & Bonnet, X. (1996). "Body Condition Threshold for Breeding in a Viviparous Snake." Oecologia **107**(3): 301-306.
- Nogueira, C.; Sawaya, R. J. & Martins, M. (2003). "Ecology of the Pitviper, Bothrops Moojeni, in the Brazilian Cerrado." Journal of Herpetology **37**(4): 653-659.
- Oliveira, M. E. & Martins, M. (2001). When and Where to Find a Pitviper: Activity Patterns and Habitat Use of the Lancehead *bothrops Atrox* in Central Amazonia, Brazil. Herpetological Natural History **8**: 101-110.
- Ott, B. D. & Secor, S. M. (2007). "Adaptive Regulation of Digestive Performance in the Genus Python." Journal of Experimental Biology **210**(2): 340-356.
- Pagel, M. (1999). "Inferring the Historical Patterns of Biological Evolution." Nature **401**(6756): 877-884.
- Revell, L. J.; Harmon, L. J. & Collar, D. C. (2008). "Phylogenetic Signal, Evolutionary Process, and Rate." Systematic Biology **57**(4): 591-601.
- Roark, A. W. & Dorcas, M. E. (2000). "Regional Body Temperature Variation in Corn Snakes Measured Using Temperature-Sensitive Passive Integrated Transponders." Journal of Herpetology **34**(3): 481-485.
- Roe, J. H.; Hopkins, W. A.; Snodgrass, J. W. & Congdon, J. D. (2004). "The Influence of Circadian Rhythms on Pre- and Post-Prandial Metabolism in the Snake Lamprophis Fuliginosus." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **139**(2): 159-168.
- Rohlf, F. J. (2001). "Comparative Methods for the Analysis of Continuous Variables: Geometric Interpretations." Evolution **55**(11): 2143-2160.
- Secor, S. M. (2009). "Specific Dynamic Action: A Review of the Postprandial Metabolic Response." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **179**(1): 1-56.
- Secor, S. M. & Diamond, J. (1998). "A Vertebrate Model of Extreme Physiological Regulation." Nature **395**(6703): 659-662.
- Secor, S. M. & Diamond, J. M. (2000). "Evolution of Regulatory Responses to Feeding in Snakes." Physiological and Biochemical Zoology **73**(2): 123-141.
- Secor, S. M. & Nagy, K. A. (1994). "Bioenergetic Correlates of Foraging Mode for the Snakes Crotalus-Cerastes and Masticophis-Flagellum." Ecology **75**(6): 1600-1614.
- Shine, R.; Sun, L. X.; Kearney, M. & Fitzgerald, M. (2002). "Thermal Correlates of Foraging-Site Selection by Chinese Pit-Vipers (Gloydius Shedaoensis, Viperidae)." Journal of Thermal Biology **27**(5): 405-412.
- Speakman, J. R. & Racey, P. A. (1988a). "Consequences of Non Steady-State Co₂ Production for Accuracy of the Doubly Labeled Water Technique - the Importance of Recapture Interval." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **90**(2): 337-340.

Speakman, J. R. & Racey, P. A. (1988b). "The Doubly-Labeled Water Technique for Measurement of Energy-Expenditure in Free-Living Animals." Science Progress **72**(286): 227-237.

Stuginski, D. R.; Fernandes, W.; Tattersall, G. J. & Abe, A. S. (2011). "Postprandial Thermogenesis in Bothrops Moojeni (Serpentes: Viperidae)." Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases **17**(3): 287-292.

Stuginski, D. R.; Sant'Anna, S. S.; Fernandes, W. & Abe, A. S. (2012). "Circadian Pattern of Bothrops Moojeni in Captivity (Serpentes: Viperidae)." Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases **18**(1): 97-102.

Tattersall, G. J.; Milsom, W. K.; Abe, A. S.; Brito, S. P. & Andrade, D. V. (2004). "The Thermogenesis of Digestion in Rattlesnakes." Journal of Experimental Biology **207**(4): 579-585.

Tsai, T. S.; Lee, H. J. & Tu, M. C. (2008). "Specific Dynamic Action, Apparent Assimilation Efficiency, and Digestive Rate in an Arboreal Pitviper, Trimeresurus Stejnegeri Stejnegeri." Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **86**(10): 1139-1151.

Van Dyke, J. U. & Beaupre, S. J. (2011). "Bioenergetic Components of Reproductive Effort in Viviparous Snakes: Costs of Vitellogenesis Exceed Costs of Pregnancy." Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology **160**(4): 504-515.

Zaidan, F. & Beaupre, S. J. (2003). "Effects of Body Mass, Meal Size, Fast Length, and Temperature on Specific Dynamic Action in the Timber Rattlesnake (Crotalus Horridus)." Physiological and Biochemical Zoology **76**(4): 447-458.