

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL
NÍVEL MESTRADO

Natália Souto Maior Sales Valença

**CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE
Crotalus durissus cascavella (SERPENTES, CROTALINAE) ACOMETIDAS POR
ACROMIA CUTÂNEA EM CATIVEIRO**

Recife

2012

Natália Souto Maior Sales Valença

**CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE
Crotalus durissus cascavella (SERPENTES, CROTALINAE) ACOMETIDAS POR
ACROMIA CUTÂNEA EM CATIVEIRO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para
a obtenção título de Mestre, pelo Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal da Universidade
Federal de Pernambuco.

Orientadora: Dra. Míriam Camargo Guarnieri

Recife

2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

V152c Valença, Natália Souto Maior Sales

Caracterização hematológica e bioquímica sanguínea de *Crotalus durissus cascavella* (Serpentes, Crotalinae) acometidas por acromia cutânea em cativeiro / Natália Souto Maior Sales Valença. – Recife: O Autor, 2012.

107 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Míriam Camargo Guarnieri

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Animal, 2012.

Inclui bibliografia

1. Cobra 2. Células sanguíneas 3. Fungos I. Míriam Camargo Guarnieri (orientador) II. Título.

597.9638

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-159

Natália Souto Maior Sales Valença

**CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE
Crotalus durissus cascavella (SERPENTES, CROTALINAE) ACOMETIDAS POR
ACROMIA CUTÂNEA EM CATIVEIRO**

Aprovada em 29 de março de 2012

BANCA EXAMINADORA

Orientador: _____
Dr^a. Míriam Camargo Guarnieri, Universidade Federal de Pernambuco

I Examinador: _____
Dr^a. Nádia Regina Pereira Almosny, Universidade Federal Fluminense

II Examinador: _____
Dr^a. Miriam Nogueira Teixeira, Universidade Federal Rural de Pernambuco

III Examinador: _____
Dr. Fabrício Bezerra de Sá, Universidade Federal Rural de Pernambuco

I Suplente: _____
Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque, Universidade Federal de Pernambuco

II Suplente: _____
Dr. Eneida Willcox Rêgo, Universidade Federal Rural de Pernambuco

Agradecimentos

Nesses dois anos muitas pessoas contribuíram para a construção desse mestrado, me ajudando não apenas no desenvolvimento do trabalho apresentado, mas também na minha formação pessoal.

Agradeço a todos da minha família que sempre se fizeram presentes, me trazendo alegria e força, sendo fundamentais para eu enfrentar os obstáculos e seguir em frente. Em especial à minha mãe, por toda paciência, carinho e dedicação; à minha irmã Tatiana, por está sempre ao meu lado, me dando força e me ajudando com tudo que foi preciso; e a minha tia Teca, por todo afeto e apoio profissional, disponibilizando diversos materiais para realização de boa parte do projeto.

Um agradecimento singular a minha orientadora e Míriam Camargo Guarnieri. As palavras são poucas para expressar imensa admiração e amor por você. Você é um exemplo de ser humano, não apenas de uma grande profissional. Obrigada pela oportunidade e pelos conhecimentos a mim transmitidos. Posso dizer que minha formação como mestra se deu porque tive ao meu lado uma pessoa que sempre acreditou em mim, incentivou o meu crescimento pessoal e profissional e me ajudou de uma maneira imensurável em tudo que precisei.

Não posso deixar de agradecer aos profissionais médicos veterinários que se fizeram presentes durante todo esse mestrado.

Primeiramente, imensa gratidão à veterinária e professora Dr^a Nádia Almosny, da Universidade Federal Fluminense (UFF), por ter aceitado a “bióloga de selvagem” e me possibilitado um estágio com sua equipe, me tratado como membro do seu grupo de pesquisa. Obrigada pelos conhecimentos e matérias fornecidos, que me possibilitaram conhecer uma nova área fascinante sobre os répteis e, principalmente, por toda confiança, atenção, disponibilidade a mim concedida.

Meu imenso agradecimento à médica veterinária Isabela Poubel. Você foi peça fundamental no desenvolvimento desse trabalho. Sem sua dedicação e paciência para nossas intermináveis e dificultosas leituras de lâminas, muitas vezes regadas à “Bob’s”

nos fins de semanas no laboratório, nada teria acontecido. A você, minha nova irmã, toda minha admiração, gratidão e amizade.

Não posso deixar de agradecer aos integrantes do Laboratório de Patologia e Clínica Veterinária da (UFF) pelo conhecimento a mim transmitido, em especial a Livia, Renata, Eduardo, Laís, Sabrina, Rafael, Rafaela e Camila.

Muito obrigada aos veterinários Dênisson Silva, pela amizade e por todo suporte dado ao cuidado e tratamento das serpentes, e à Luciana Rameh, por ter aceitado participar desse projeto, me ensinando sobre hematologia dos répteis e sempre se disponibilizando a me ajudar.

Gostaria de agradecer infinitamente aos integrantes do Laboratório de Animais Peçonhento e Toxinas. Todos aqueles que fazem e fizeram parte desse grupo durante o período do mestrado foram de total contribuição para o desenvolvimento deste. Em especial à 4 pessoas que não foram apenas companheiros de trabalho, mas sim uma equipe de amigos em prol de um objetivo. Chi, minha professora de manejo, Ikaro, meu agente de relações interestaduais, Lila, minha bailarina gestora e Arthur, minha estrelinha rosa, a vocês meu imenso amor e agradecimento.

Agradeço também aos meus amigos “extra faculdade” que sempre se fizeram presentes, me ajudando com bons conselhos e risadas nos momentos mais difíceis. Obrigada à Carol, Érico, Paloma, Rafael Arruda, Priscylla, Naia e Gabi.

Aos meus “companheiros de apartamento”; Zé, Sady e Helena; que dividiram comigo bons momentos durante minha estadia no Rio de Janeiro.

Às minhas “amigas da graduação” que por mais que distantes em certos momentos, sempre estiveram comigo. Rebeqa, Rafaela, Planta, Juliana, Carolina (Cau), Paloma (Pali), Monique, Gabriela, Camila e Bruna, vocês foram e sempre serão peças fundamentais na minha vida. Dois agradecimentos em especial: à Roberta (Enimal), por toda preocupação, conversas, risadas, lágrimas e até mesmo ajuda estatística, compartilhando comigo, na pele, o que é ser mestranda; e à Sabine, por todo carinho, amizade, telefonemas, disponibilidade e presença.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia animal e a todos os seus docentes que contribuíram com a manutenção da educação e pesquisa de qualidade.

Agradeço ao professor Paulo Jorge Parreira dos Santos pelas análises estatísticas do presente trabalho e a professora Oliane Maria Correia Magalhães e toda sua equipe pelas análises micológicas.

Também sou grata a todos os laboratórios e seus professores responsáveis que disponibilizaram seus equipamentos para o desenvolvimento do projeto. Obrigada ao professor Ranilson de Souza Bezerra, José Roberto Botelho, Ulisses Santos Pinheiro e Antônio Fernando Moraes de Oliveira.

Agradeço à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa no período do mestrado.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Deus por me erguer nos momentos mais difíceis e me ajudar a seguir sempre em frente, permitindo que eu conseguisse concluir o presente projeto e mais uma etapa na minha vida.

“A solução é voltar ao marco zero.
Desaprender para aprender.
Deletar para escrever em cima.
Houve um tempo em que eu pensava que, para isso, seria preciso nascer de
novo,
mas hoje sei que dá pra renascer várias vezes nesta mesma vida.
Basta desaprender o receio de mudar”.
Martha Medeiros

RESUMO

A acromia cutânea é uma enfermidade pouco conhecida e sem diagnóstico conclusivo em cascavéis. O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações cutâneas, bioquímicas sanguíneas e hematológicas em cascavéis (*Crotalus durissus cascavella*) mantidas em cativeiro, na presença e ausência do agente da acromia. Para tanto, 7 animais controles mantidos isolados; 8 animais sem manchas mantidos na mesma sala dos animais acrômicos (assintomáticos) e 9 animais acrômicos (sintomáticos) foram analisados em março e agosto de 2011. Os resultados mostraram que os animais controles e assintomáticos não apresentaram manchas e que o grupo sintomático manteve o número médio de lesões (6,14 e 5,85) e percentual de área lesionada da pele (0,55% e 0,54%) nas duas coletas. Além das lesões acrômicas e hiperacrômicas já descritas, foram identificadas lesões de ruptura e consumo da epiderme nos animais com acromia. As dosagens de albumina, globulina, PPT, triglicerídeo, cálcio e ácido úrico mostraram redução significativa nos animais do grupo sintomático em relação aos grupos assintomático e/ou controle. A presença de hemoparasitas (*Hemogregarina* sp. e/ou *Hepatozoon* sp.) foi verificada nos grupos controle e sintomático. Todos os animais apresentaram heterofilia, linfócitos e trombócitos ativados, pleomorfismo nuclear em eritrócitos e infecção por fungos oportunistas, porém os animais do grupo sintomático apresentaram uma alteração mais acentuada, seguida do grupo assintomático e do controle. Os resultados sugerem que o estresse ao cativeiro causou aumento da susceptibilidade à infecções no grupo controle, enquanto o agente da acromia induziu imunossupressão nos grupos assintomáticos e sintomáticos, levando a infecção secundária por fungos e uma resposta exacerbada e mais expressiva no grupo sintomático em relação aos demais grupos.

Palavras-chave: cascavel, células sanguíneas, estresse, pele, fungos.

ABSTRACT

The cutaneous achromia is a little known illness that has no conclusive diagnosis on rattlesnakes. The objective of this study was to evaluate the skin, hematological and biochemical alterations on rattlesnakes (*Crotalus durissus cascavella*) kept in captivity, in the presence and absence of the achromia agent. To this end, 7 control animals were kept isolated; 8 animals without lesions were kept in the same room with achromic animals (asymptomatic) and 9 achromic (symptomatic) animals were analyzed in March and August 2011. The results showed that the control and asymptomatic animals did not show lesions and the symptomatic group maintained the average number of lesions (6.14 and 5.85) and percentage of the injured area of the skin (0.55% and 0.54%) in both collection. In addition to the achromic and hiperchromic lesions already described, lesions of rupture and consumption of skin were identified in achromic animals. Dosages of albumin, globulin, TPP, triglycerides, calcium and uric acid showed significant reduction in the symptomatic group compared to the asymptomatic and/or control groups. The presence of hemoparasites (*Hemogregarina* sp. and/or *Hepatozoon* sp.) was detected in the control and symptomatic groups. All animals presented heterophilia, lymphocytes and activated thrombocytes, nuclear pleomorphism in erythrocytes and opportunistic fungi infection, however, the animals of the symptomatic group showed a steeper alteration, followed by the asymptomatic and control groups. The results suggest that the captivity stress caused increased susceptibility to infections in the control group, while the achromia agent induced immunosuppression in the symptomatic and asymptomatic groups, leading to secondary infection by opportunistic fungi, and a more exacerbated and expressive reply in the other groups.

Keywords: rattlesnake, blood cells, stress, skin, fungi.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE SERPENTES	12
1.2 BIOLOGIA DE SERPENTES.....	17
1.3 ACROMIA CUTÂNEA	21
1.4 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA.....	23
1.4.1 Creatinoquinase (CK).....	24
1.4.2 Aspartato aminotransferase (AST).....	25
1.4.3 Alanina aminotransferase (ALT)	26
1.4.4 Fosfatase alcalina (FA)	27
1.4.5 Glicose.....	28
1.4.6 Creatinina.....	28
1.4.7 Ácido úrico.....	29
1.4.8 Ureia.....	30
1.4.9 Colesterol.....	31
1.4.10 Triglicerídeos.....	31
1.4.11 Cálcio.....	32
1.4.12 Potássio.....	33
1.4.13 Cloreto.....	33
1.4.14 Sódio.....	34
1.4.15 Ferro.....	34
1.4.16 Proteína Plasmática Total (PPT) e frações.....	35
1.5. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	36
1.5.1 Contenção, coleta de sangue e anticoagulantes.....	36

1.5.2 Considerações gerais sobre a composição e constituintes do sangue de répteis.....	38
1.5.3 Células sanguíneas.....	40
1.5.3.1 Eritrócitos.....	40
1.5.3.2 Leucócitos.....	42
1.5.3.3 Linfócitos.....	42
1.5.3.4 Monócitos.....	43
1.5.3.5 Azurófilos.....	43
1.5.3.6 Basófilos.....	44
1.5.3.7 Heterófilos.....	44
1.5.3.8 Eosinófilos.....	45
1.5.3.9 Trombócitos.....	45
1.5.3.10 Hematócrito, hematimetria e concentração de hemoglobina.....	46
1.5.3.11 Índices hematimétricos.....	47
2. OBJETIVOS.....	48
2.1 OBJETIVO GERAL.....	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 SERPENTES.....	49
3.2 SERPENTÁRIOS.....	49
3.3 MANUTENÇÃO EM CATIVEIRO.....	51
3.4 BIOMETRIA E ESTUDO MACROSCÓPICO DA PELE.....	52
3.5. PROCEDIMENTOS MICOLÓGICOS DAS BIÓPSIAS DE PELE.....	53

3.5.1 Coleta de escamas.....	53
3.5.2 Exame direto das escamas.....	53
3.5.3 Cultura fúngica das escamas.....	54
3.5.4 Purificação e isolamento das culturas fúngicas.....	54
3.5.5 Identificação micológica.....	54
3.6. COLETA SANGUÍNEA.....	55
3.7. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	56
3.8 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	57
3.8.1 Coloração dos esfregaços sanguíneos.....	57
3.8.2 Contagem global dos tipos celulares.....	57
3.8.3 Determinação do Volume Globular (VG)	58
3.8.4 Hemoglobinometria.....	58
3.8.5 Determinação do VCM, CHCM e HCM.....	59
3.8.6 Leucometria específica.....	59
3.8.7 Pesquisa de Hemoparasitos.....	59
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4. RESULTADOS.....	61
4.1 Biometria e estudo macroscópico da pele.....	61
4.2. Estudo micológico da pele.....	65
4.3. Parâmetros bioquímicos.....	65
4.4 Parâmetros hematológicos.....	66
5. DISCUSSÃO.....	76
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DE SERPENTES

As serpentes são consideradas um dos animais mais temidos e rejeitados do mundo, possivelmente por conta da ausência de patas, da forma alongada do corpo, dos ágeis movimentos ondulatórios, do olhar fixo, das cores vivas e, definitivamente, da capacidade de produzir e injetar uma peçonha mortal (MELGAREJO, 2009).

As serpentes, comumente conhecidas como “cobras” são encontradas em quase todo mundo, ocupando praticamente todos os ambientes disponíveis, desde os terrestres, subterrâneos e arbóreos, até as águas continentais e oceânicas, diversificando-se notavelmente para se adaptar a divergências tão díspares (MELGAREJO, 2009).

Esses animais apresentam algumas características diagnósticas como o corpo alongado, escamas epidérmicas cobrindo todo o corpo, ausência de apêndices locomotores e cintura escapular, perda da sínfise mandibular, fechamento lateral da caixa craniana, perda de pálpebras móveis, ouvido externo ausente e língua extensível e bífida (ORR, 1986; POUGH, 2008; FRANCO, 2009).

No mundo estão descritas, atualmente, 3.378 espécies de serpentes distribuídas em 23 famílias (UETZ & HOSEK, 2012). O Brasil possui uma riquíssima fauna de serpentes, responsável por 10% do total das espécies, tendo representantes de 375 espécies distribuídas em nove famílias, das quais apenas Colubridae, Elapidae e Viperidae possuem animais com aparelhos produtores e inoculadores de peçonha (FRANCO, 2009; MELGAREJO, 2009; BÉRNILS, 2012).

A família Viperidae divide-se em duas subfamílias: Viperinae, onde estão agrupadas as víboras verdadeiras, encontradas por todo Velho Mundo; e Crotalinae, encontrada no continente americano e sul da Ásia (STOCKER, 1990; POUGH, 2008).

As serpentes dessa família são de médio ou grande porte (2 metros), sendo facilmente identificadas pela cabeça triangular e por possuírem dentição solenóglifa. Tal

aparelho inoculador é caracterizado por grandes presas inoculadoras, totalmente canaliculadas, cobertas por uma membrana e que são articuladas de modo a dobrarem-se contra o palato quando a boca está fechada (Figura 1) (POUGH, 2008; MELGAREJO, 2009).



Figura 1: Dentição solenóglifa de cascavel (Fonte: www.guiamedicodabahia.com.br).

As viperídeas do Brasil pertencem à subfamília Crotalinae e compreendem sete gêneros e 28 espécies representadas por serpentes chamadas popularmente de surucurus (gênero *Lachesis*), jararacas (gêneros *Rhinocerothis*, *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothrocophias* e *Bothriopsis*) e cascaveis (gênero *Crotatus*) (BÉRNILS, 2012). Estas podem ser facilmente identificadas pela dentição solenóglifa e presença de um par de orifícios com função termorreceptora, localizados entre o olho e a narina, denominados fossetas loreais (Figura 2) (FUNK, 2006; MELGAREJO, 2009).

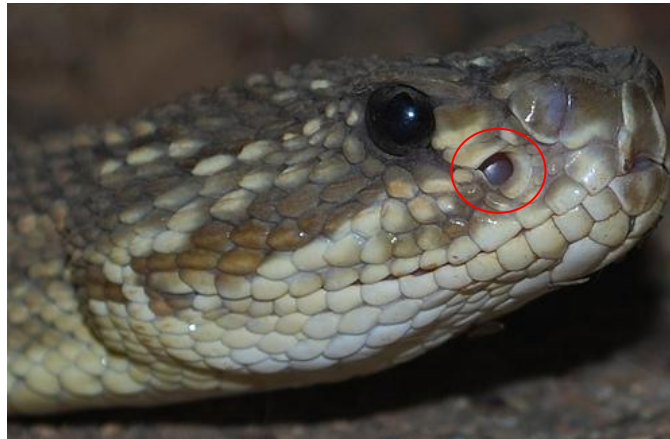


Figura 2: Detalhe da cabeça de uma cascavel evidenciando uma fosseta loreal entre o olho e narina (Fonte: www.flickr.com).

Segundo registros fósseis, o gênero *Crotalus* tem origem norte-americana (VANZOLINI & HEYER, 1985) e a sua migração para América do Sul parece ter ocorrido no Plioceno, quando estes dois continentes encontravam-se interligados (CAMPBELL & LAMAR, 1989).

Esse gênero é caracterizado por uma estrutura caudal conhecida como guizo ou chocalho, cuja função é advertir os potenciais predadores da sua posição. Este é formado a partir de vestígios cornificados de pele na base da cauda que não se perdem durante a troca de pele (ecdise), devido à presença do estilo que consiste de uma peça única formada pela fusão das últimas vértebras caudais. Assim, cada segmento córneo formado representa uma porção remanescente da ecdise (MOSMANM, 2001; MELGAREJO, 2009).

As serpentes do gênero *Crotalus*, chamadas popularmente de cascavéis, são representadas na América do Sul apenas pela espécie *Crotalus durissus*, que é subdividida em seis subespécies, das quais *Crotalus durissus cascavella* pode ser encontrada, principalmente, nas áreas secas da região Nordeste (HOGE & ROMANO-HOGE, 1978/79) e regiões antropizadas do litoral de Pernambuco (RODOVALHO et al., 2009).

As serpentes *Crotalus durissus* são terrícolas; de hábitos predominantemente crepuscular e noturno; atingem um comprimento que ultrapassa 160 cm; alimentam-se de lagartos, aves e, principalmente, de roedores que capturam através do bote predatório

com comprimento equivalente a um terço do seu corpo e velocidade de 0,004 segundos (COBORN, 1991). As cascavéis são vivíparas e possuem uma média de 14 filhotes por ninhada, os quais nascem com aproximadamente 30 centímetros de comprimento (MELGAREJO, 2009). O corpo das cascavéis apresenta um colorido de fundo castanho-claro, de tonalidades variáveis sobre o qual se destaca uma fileira de manchas dorsais losangulares marrons, mais ou menos escuras, marginadas de branco ou amarelo (MELGAREJO, 2009).

São conhecidas cinco subespécies brasileiras de *Crotalus durissus*: *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768), que se encontra no Sul e se estende pelo oeste, até algumas áreas abertas do Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Pará; *Crotalus durissus collilineatus* (AMARAL, 1926), distribuída em áreas abertas dos estados de São Paulo, Mato Grosso, Mina Gerais, Distrito Federal e Goiás; *Crotalus durissus ruruima* (HOGE, 1965), presente nas savanas de Roraima; *Crotalus durissus marajoensis* (HOGE, 1966), descrita em áreas abertas da Ilha de Marajó e *Crotalus durissus cascavella* (WAGLER, 1824), uma subespécie predominante do Nordeste e em regiões antropizadas do litoral de Pernambuco e da Bahia (AQUINO, 1999; SILVA, 2000; PINHO, 2002; RODOVALHO et al., 2009; LIRA-DA-SILVA et al., 2009; MARQUES & SAZIMA, 2009; MELGAREJO, 2009) (Figura 3).

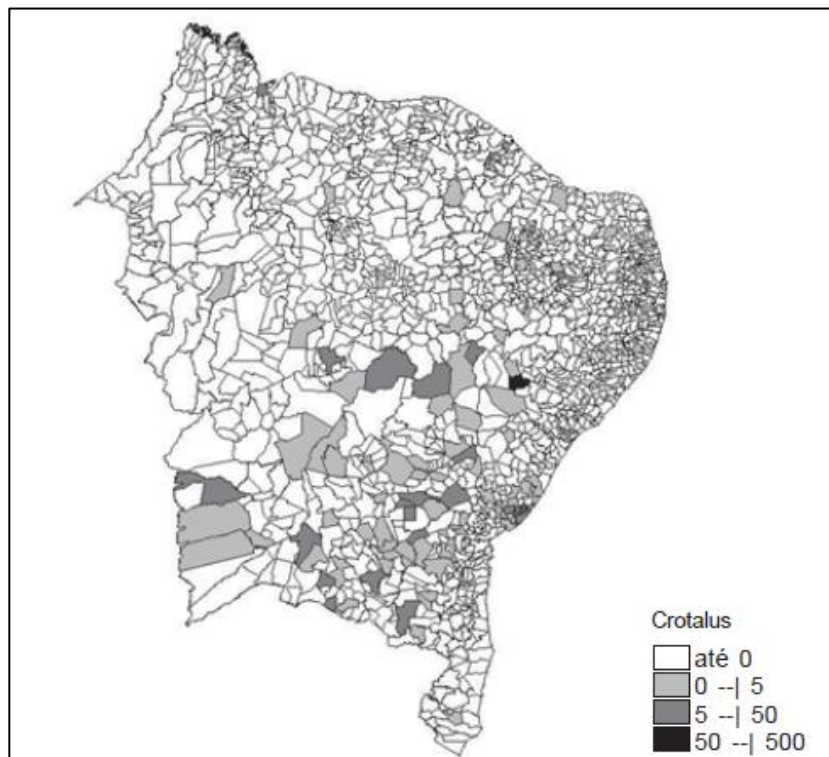


Figura 3: Distribuição geográfica dos registros da espécie *C. durissus cascavella* na região Nordeste do Brasil (Fonte: LIRA-DA-SILVA et al., 2009).

Os viperídeos representam o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública brasileira, não somente pela sua alta magnitude, mas também pela gravidade e sequelas marcantes dos acidentes registrados no país (MELGAREJO, 2009; BRASIL, 2010).

Os envenenamentos por serpentes do gênero *Crotalus* são responsáveis por 9% dos acidentes causados por serpentes peçonhentas no Brasil, no entanto, essa proporção varia de maneira importante de acordo com a região, representando 12% e 18% dos acidentes ofídicos em todo o Nordeste (OLIVEIRA et al., 2009) e em Pernambuco (AQUINO, 1999, respectivamente).

Apesar das cascavéis não serem as serpentes que causam o maior número de envenenamentos, são as que causam acidentes mais graves, sendo responsáveis pela maior letalidade registrada no Brasil no ano de 2009 (1,25%), em decorrência de acidentes com serpentes peçonhentas (BRASIL, 2010). Tal fato dá-se por esses animais possuírem uma peçonha com ação miotóxica, neurotóxica e coagulante, possuindo uma

letalidade seis vezes maior do que a peçonha das jararacas, a principal serpente causadora de acidentes ofídicos no Brasil (OLIVEIRA, 1999; BRASIL, 2010).

1.2.BIOLOGIA DE SERPENTES

Segundo Withers (1992), um animal ectotérmico é aquele em que o equilíbrio térmico ocorre com predomínio das fontes externas de calor e produção metabólica de calor insignificante. As serpentes são animais ectotérmicos e controlam a própria temperatura utilizando, principalmente, o comportamento (SANDRIN et al., 2005). Diversas atividades biológicas como locomoção, digestão, produção de espermatozoides e ovos, e desenvolvimento de embriões processam-se mais eficazmente em temperaturas mais elevadas do que as usadas habitualmente pelas serpentes, fazendo com que esses animais procurem lugares mais aquecidos para melhor funcionalidade dessas atividades (MELGAREJO, 2009).

Algumas das características mais interessantes das serpentes estão relacionadas com os órgãos sensoriais. A visão apresenta diversos graus de desenvolvimento nos diferentes grupos, mas em geral a acomodação visual é ineficiente, sendo consideradas míopes, estando este sentido mais vinculado à detecção de movimentos do que de formas (MELGAREJO, 2009).

A audição é praticamente inexistente devido à falta de ouvido externo e médio, no entanto, devido à presença do ouvido interno, são capazes de perceber sons dentro de uma faixa limitada de baixa frequência (100 a 700 Hz) e de sentir vibrações do substrato através da conexão mandíbula-osso quadrado-columela-ouvido interno (HICKMAN, 2001).

No entanto, para a maioria das serpentes é a sensação química e não a visão ou audição que é empregada para caçar suas presas. Além da usual área olfativa nas narinas (que não é bem desenvolvida), os ofídios possuem dois orifícios na região do palato chamados órgão de Jacobson, principal responsável pelo eficiente olfato desses animais. A língua bífida é responsável pela captação de partículas do ar e transporte dessas até o órgão de Jacobson, onde a informação é então transmitida para o cérebro e os aromas são identificados (HICKMAN, 2001; MELGAREJO, 2009).

A termorrecepção é uma adaptação presente nos viperídeos e boídeos, o que permite uma maior facilidade na detecção, aproximação e captura das presas emissoras de radiação infravermelha. Nos viperídeos da subfamília Crotalinae os órgãos responsáveis pela termorrecepção são as fossetas loreais, definidas como estruturas localizadas entre os olhos e as narinas, bilateralmente, capazes de distinguir diferenças de temperatura de apenas 0,003°C (HICKMAN, 2001; MELGAREJO, 2009).

A organização interna de uma serpente, apesar do alongamento impressionante do corpo, detém um padrão semelhante ao dos demais répteis, com algumas modificações consideráveis (MELGAREJO, 2009). A familiaridade com anatomia desses animais é um pré-requisito para entender a fisiologia, bem como os processos patológicos (PARÉ et al., 2006).

As serpentes são animais exclusivamente carnívoros que ingerem suas presas inteiras (FRANCO, 2009; MARQUES, 2009). O sistema gastrointestinal é formado por um ducto linear entre a cavidade oral e a cloaca. O tubo digestivo caracteriza-se por sua capacidade de distensão, que é muito grande no esôfago e estômago, e pela simplicidade do intestino, por ser curto e relativamente desenrolado. O fígado é bem desenvolvido e alongado, com a vesícula biliar separada, disposta em posição posterior, junto ao pâncreas e o baço, que são estruturas pequenas e a cloaca recebe os produtos do trato urinário, digestivo e sistemas reprodutivos (DIAZ-FIGUEROA, 2006; FUNK, 2006; MELGAREJO, 2009).

A glote das serpentes está situada rostralmente na cavidade oral, podendo ser deslocada lateralmente para facilitar a respiração durante a deglutição de grandes presas (DIAZ-FIGUEROA, 2006; FUNK, 2006; MURRAY, 2006). O pulmão direito sofre hipertrofia, estendendo-se pelos dois terços iniciais do corpo, como um grande reservatório de ar, enquanto o esquerdo não existe na maioria das espécies, sendo praticamente atrofiado quando presente (MELGAREJO, 2009). A parte anterior do pulmão é vascularizada, efetuando trocas gasosas, enquanto a porção posterior do pulmão é avascular e funciona principalmente como um saco de ar (FUNK, 2006; MURRAY, 2006).

A traquéia é formada por anéis cartilaginosos incompletos que, conforme se estendem caudalmente, se abrem no interior do pulmão, sendo essa porção inicial denominada de pulmão traqueal. Alguns autores sugerem que essa estrutura permite a troca gasosa mesmo com o restante do pulmão comprimido por uma presa grande

(FUNK, 2006; MURRAY, 2006). O intercâmbio gasoso realiza-se principalmente por meio do pulmão traqueal e pela porção anterior do pulmão funcional (MELGAREJO, 2009).

O coração das serpentes é dividido em três câmaras, sendo dois átrios completamente separados entre si por um septo e um ventrículo parcialmente dividido em três câmaras (*cava pulmonale*, *arteriosum* e *venosum*) (KIK & MITCHELL, 2005; FUNK, 2006; MURRAY, 2006; PARÉ et al., 2006). O sangue oxigenado advindo do pulmão retorna ao átrio esquerdo pelas veias pulmonares, enquanto o sangue venoso retorna ao átrio direito (MURRAY, 2006).

Embora exista comunicação entre os ventrículos, funcionalmente ocorre uma separação entre o sangue oxigenado e não oxigenado em serpentes (FUNK, 2006). No entanto, em situações extremas, ocorrem desvios através do canal inter-ventricular (desvio esquerda-direita), misturando parcialmente o sangue venoso com o arterial (JACOBSON, 1984; MURRAY, 2006).

Assim como a maioria dos vertebrados inferiores, as serpentes possuem um sistema porta-renal, onde parte do sangue proveniente das porções caudais do corpo é desviado para os rins antes de ganhar a circulação central em sentido do coração (ORR, 1986; GOULART, 2004; KIK & MITCHELL, 2005). Durante períodos de desidratação, o sistema porta-renal funciona para fornecer o sangue aos rins, impedindo uma necrose isquêmica (KIK & MITCHELL, 2005; HOLZ, 2006).

Os rins, supra-renais, testículos e ovários são órgãos alongados com uma disposição assimétrica, estando os do lado direito disposto cranialmente ao do lado esquerdo (HOLZ, 2006; MELGAREJO, 2009). O córtex renal contém apenas néfrons simples (néfrons corticais) que têm um sistema tubular desprovido de alça nefrídica, fazendo com que as serpentes sejam incapazes de concentrar a sua urina, portanto, para conservar a água, répteis terrestres produzem resíduos nitrogenados mais insolúveis sob a forma de ácido úrico e sais de urato, que são eliminados em um estado semi-sólido (CAMPBELL, 2006). O sistema excretor não possui bexiga, e as excretas são transportadas do ureter para a cloaca, que se abre ao exterior numa fenda anal transversal (JACOBSON, 2007; MELGAREJO, 2009).

Os órgãos copuladores dos machos, denominados hemipênis, são estruturas pares e esponjosas, que apresentam espinhos e encontram-se invaginados na cauda.

Durante a cópula, o hemipênis é evertido, inflado com sangue e introduzido na cloaca da fêmea (MELGAREJO, 2009; MARQUES & SAZIMA, 2009).

As serpentes possuem crânio extremamente cinético, contendo oito ligações pareadas, com articulações entre estas, fazendo com que cada lado da cabeça atue independentemente. Além disso, possuem as articulações da mandíbula que se unem com o crânio pelos ossos móveis quadrado e supratemporal e ligam-se entre si apenas por um ligamento elástico. Tudo isso resulta em um grau considerável de movimento tridimensional no crânio de uma serpente (POUGH, 2008; MELGAREJO, 2009).

A pele ofídica é considerada o maior órgão do corpo e, apesar de formada por escamas, apresenta uma flexibilidade conferida pela zona de articulação ou dobradiça situada entre as escamas. A pele é frequentemente mais permeável na região dorsal do que na ventral e a é composta de duas camadas principais: a epiderme superficial, de origem ectodérmica, e a derme mais profunda, de origem mesodérmica (ACKERMAN et al., 1982; VENENONEMIA, 2005; JACOBSON, 2007).

A epiderme é particularmente complexa, pois além de diferenciar-se em escamas, apresenta-se estruturalmente estratificada, sendo periodicamente regenerada e trocada através da ecdise, permitindo o crescimento corpóreo da serpente e a manutenção da sua integridade tegumentar. No processo de ecdise ocorrem divisões mitóticas das células do estrato germinativo da camada epidérmica, resultando em uma camada de epiderme que substitui a camada exterior (ACKERMAN et al.; 1982; COOPER, 2006; JACOBSON, 2007).

A pele é trocada com certa periodicidade e, geralmente, se desprende numa peça única, começando pela borda dos lábios. Alguns dias antes da muda, as serpentes ficam com a pele leitosa pela interposição de líquido entre a velha e a nova camada epidérmica, e diminuem bastante a atividade, recolhendo-se a cantos tranquilos. Logo depois da troca da pele, as serpentes ficam novamente muito ativas, com um aspecto renovado e cores mais vivas (MELGAREJO, 2009).

A aparência e a condição da pele de um organismo vivo são indicadores precisos do bem-estar geral das serpente, sendo o padrão de ecdise um guia útil para avaliar a saúde das mesmas (COOPER, 2006; FITZGERALD & VERA, 2006; JACOBSON, 2007).

A dificuldade em realizar a ecdise é denominada disecdise, podendo estar relacionada a fatores como temperatura, umidade, fotoperíodo, nutrição, hidratação,

idade, sexo, infecção (bacteriana, viral, fúngica), parasitismo, trauma, regulação hormonal e estresse (FUNK, 2006; FITZGERALD & VERA, 2006; COOPER, 2006; FUNK, 2006).

A pele das serpentes pode ser o mais versátil de todos os órgãos. Dentre as suas muitas funções, incluem apoio e proteção das estruturas internas; estabelecimento de uma barreira preventiva de doenças infecciosas por patógenos invasores; um papel em processos fisiológicos, como a regulação do calor e da respiração, retardo da dessecação e ainda permitir a expansão e acomodação para o crescimento do animal (COOPER, 2006; FITZGERALD & VERA, 2006; JACOBSON, 2007).

Apesar do revestimento cutâneo atuar como barreira protetora, este não é completamente imune ao ataque de agentes patógenos, os quais podem ser distribuídos em três categorias: (1) os que facilitam a ação de microrganismos, sua expansão e multiplicação; (2) os que contribuem para superar as defesas do organismo; (3) e os que provocam a ação lesiva quando o microrganismo já está instalado (FILHO et al., 1994).

1.3 ACROMIA CUTÂNEA

A manutenção de cascavéis em serpentários visa a obtenção de peçonhas e toxinas utilizadas para a pesquisa básica, para uso em estudos visando a melhoria do tratamento às vítimas de envenenamento crotálico (AZOFEIFA-CORDERO et al., 2008; DAL BELO et al., 2008; BEGHINI et al., 2008; DOS-SANTOS et al., 2011; NUDEL et al., 2012;), bem como em pesquisas com aplicação biotecnológica para obtenção de novas drogas (KONNO et al., 2008).

Apesar do grande período de experiência na criação e manutenção de serpentes em cativeiro, existem inúmeras dificuldades em relação ao diagnóstico precoce, prevenção e controle de doenças infecciosas (KOLESNIKOVAS, 1997 apud RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007).

As serpentes são animais susceptíveis a diversas patologias, desde parasitárias, bacterianas, fúngicas até virais, que podem provocar problemas clínicos locais ou

mesmo enfermidades sistêmicas, necessitando de diagnóstico e tratamento eficazes. (BARNARD, 1996; KAPLAN, 2003). Estas, quando mantidas em cativeiro, tornam-se mais vulneráveis à ação desses patógenos, visto que as mesmas são submetidas a diferentes condições ambientais e, conseqüentemente, à depressão do sistema imune (ACKERMAN, 2003; JACOBSON, 2004, GOULART, 2004) que pode levar a morbidade dos animais e afetar a produção de peçonha (WELLEHAN & JONHSON, 2005).

Durante o ano de 2003, sete cascavéis da subespécie *Crotalus durissus cascavella* mantidas no serpentário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) apresentaram lesões acrômicas (manchas brancas) na pele, distribuídas em todo o corpo, em diferentes estágios de desenvolvimento, iniciando-se na região entre escamas e espalhando-se para as demais (ARAÚJO, 2003). A região entre escamas, também denominada de dobradiça, é mais susceptível aos parasitas devido a uma redução na espessura das camadas de queratina no momento de sua flexão, o que pode facilitar a instalação de doenças cutâneas (CHEATWOOD, 2000).

As análises em busca da determinação do agente etiológico desta doença descartaram as hipóteses de contaminação por fungos e bactérias (ARAÚJO, 2003). Histopatologicamente, observou-se que as escamas estavam acometidas por um distúrbio pigmentar caracterizado pela destruição nuclear progressiva dos melanócitos epidérmicos e dérmicos com conseqüente diminuição ou ausência da produção de melanina, bem como o desaparecimento gradual da camada de cromatóforos e a presença de corpúsculos de inclusão intranucleares semelhantes a colônias virais (ARAÚJO, 2003; 2006).

No período de 2003 a 2009, 25 cascavéis apresentaram acromia cutânea, das quais 40% foram a óbito. A causa da morte não pode ser esclarecida por necropsia, uma vez que os óbitos foram constatados quando os animais já estavam em avançado estado de degeneração dos tecidos (GUARNIERI, 2012).

Patologias envolvendo os melanócitos são conhecidas em peixes, répteis, aves e mamíferos. A despigmentação na pele de animais por ausência de melanina ocorre devido à perda regional dos melanócitos nas seguintes patologias: 1) piebaldismo ou vitiligo, provavelmente, devido a uma alteração auto-imune (CORNSSNAKE, 2005); 2) albinismo, amelanismo e hipomelanismo devido a mutações genéticas que levam a

hipopigmentação em homozigotos (IHLE et al., 2000); 3) melanosarcoma devido à propriedade metastática das células pigmentares (FRYE et al., 1975; JACOBSON et al., 1989), 4) infecção por poxvírus (STAUBER & GOGOLEWSKI, 1990; FRANCISCO, 1997; HUCHZERMEYER, 2002; GÁL et al., 2003; GÁL et al., 2005) e 5) infecção por herpesvírus (MICHEL et al., 2010). Os diagnósticos de vitiligo, albinismo e melanosarcoma para a acromia observada nas cascavéis mantidas na UFPE foram descartados pelo fato dos mesmos não serem contagiosos, e porque as células acometidas por estas patologias não apresentam corpúsculos de inclusão intranucleares como observado na pele acrômica dos animais da UFPE. As análises em busca da determinação do agente etiológico desta doença sugerem infecção de origem viral, por herpesvírus e/ou poxvírus, devido à presença de corpúsculos de inclusão intranucleares semelhantes a colônias virais (ARAÚJO, 2006).

1.4. BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Os exames hematológicos, tanto celulares quanto bioquímicos, são extremamente importantes para conhecer as alterações patológicas dos animais, uma vez que as células sanguíneas são alteradas qualitativa ou quantitativamente devido a anemias, doenças inflamatórias, parasitemias, desordens hematopoiéticas e alterações hemostáticas (CAMPBELL, 2006). Esses exames têm um papel relevante no diagnóstico diferencial e monitoramento de doenças em mamíferos e aves, situação que está se reproduzindo, pelos mesmos motivos, em outros vertebrados (HAWKEY et al., 1989).

Diante de uma infecção, as células sanguíneas constituem o principal sistema de defesa do organismo, pois participam tanto do sistema de defesa inato quanto do sistema imune adaptativo (GOULART, 2004). As células comumente encontradas no sangue de serpentes são eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Atualmente, leucócitos no sangue periférico de serpentes são geralmente descritos como azurófilos, heterófilos, linfócitos, basófilos, monócitos e eosinófilos (DOTSON et al., 1995; BOUNOUS et al., 1996). Víroses e outras doenças infecciosas podem causar anemias não regenerativas e

leucopenias. Uma acentuada heteropenia sem a presença de bactérias fagocitadas e aumento de linfócitos sugerem infecção viral severa (GOULART, 2004; GREGO et al., 2006).

Fatores como espécie, sexo, idade, estado nutricional, estação do ano e estado fisiológico influenciam na bioquímica do sangue dos répteis, fazendo com que a interpretação dos resultados seja um desafio (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006; CAMPBELL, 2006).

As análises bioquímicas fornecem informações importantes em relação ao estado clínico e metabólico do indivíduo; servem como indicador no metabolismo energético, mineral e protéico; e oferecem subsídios na interpretação do funcionamento hepático, pancreático, renal, muscular e ósseo; podendo ser utilizados no auxílio do diagnóstico, no acompanhamento clínico e no prognóstico de diversas moléstias que acometem os animais (GONZÁLEZ & SILVA, 2006; SILVA, 2010).

A bioquímica clínica de répteis ainda não alcançou o estágio verificado na medicina de animais domésticos, pois ainda há poucas pesquisas controladas a respeito do significado das alterações verificadas neste grupo, carecendo de dados disponíveis na literatura (CAMPBELL, 2006; SILVA, 2010).

Os testes sanguíneos mais utilizados para répteis são proteína total, albumina, glicose, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatina quinase (CK), cálcio, fósforo, creatinina, lactato desidrogenase (LDH), sódio, potássio, cloro e eletroforese de proteínas (CAMPBELL, 1996; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006; CAMPBELL, 2006).

1.4.1. Creatinoquinase (CK)

A enzima creatinoquinase (CK) catalisa a fosforilação reversível da creatina pela adenosina trifosfato (ATP) com a formação de creatina fosfato, estando, dessa forma, associada com a geração de ATP nos sistemas contráteis ou de transporte (MOTTA, 2003; HOFFMANN & SOLTER, 2008).

A creatinoquinase, com suas três isoenzimas CK-MM (músculo esquelético), CK-MB (miocárdio) e CK-BB (cérebro), é encontrada no músculo esquelético, miocárdio,

cérebro e músculo liso (MOTTA, 2003; CAMPBELL, 2006; HOFFMANN & SOLTER, 2008).

Esta é uma enzima bastante específica para a avaliação de danos musculares em mamíferos, aves e répteis. Normalmente, a elevação da concentração plasmática de CK reflete lesão muscular e pode ocorrer após injeções intramusculares e infecções sistêmicas que afetam os músculos esquelético ou cardíaco (CAMPBELL, 2004; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006; CAMPBELL, 2006). Elevações na atividade dessa enzima são frequentemente observadas em animais que lutam e fazem esforço na hora da contenção e coleta de sangue (CAMPBELL, 2004, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

A lesão muscular também resulta em aumento leve a moderado da atividade plasmática de aspartato aminotransferase (AST) e de lactato desidrogenase (LD). No entanto, estas enzimas não são órgão-específicas para o músculo, podendo aumentar em doenças hepatobiliares. Dessa forma, quando a atividade plasmática de CK não é aumentada em face da atividade plasmática aumentada de AST e LD, deve-se suspeitar de doença hepatobiliar. Danos no fígado e músculo esquelético podem ocorrer simultaneamente, tal como ocorre com trauma e septicemia, o que resulta em elevações plasmáticas de CK, AST e LD (CAMPBELL, 1996, 2004, 2006)

Ao avaliar o plasma de cascavéis clinicamente saudáveis, Rameh-De-Albuquerque (2007) obteve, para a creatinoquinase, variações de 46,6 a 182 U/L para *Crotalus durissus collilineatus* e de 42,3 a 139,5 U/L para *Crotalus durissus terrificus*.

1.4.2. Aspartato aminotransferase (AST)

A enzima aspartato aminotransferase, anteriormente conhecida como transaminase glutâmico oxalacético (TGO), é uma aminotransferase que tem por função catalisar a transferência de grupos amino durante a conversão de aminoácidos à α -oxo-ácidos, mais especificamente de L-aspartato e 2-oxoglutarato em oxalacetato e glutamato (HOFFMANN & SOLTER, 2008; LOPES et al., 2007).

A atividade plasmática de AST não é órgão-específica, visto que tal enzima está presente em vários tecidos, principalmente no fígado e no músculo, estando seu

aumento sérico relacionado às lesões hepáticas, musculares e no miocárdio. Entretanto, durante doenças generalizadas, tais como septicemias ou toxemias, a elevação da atividade plasmática dessa transaminase pode estar associada com necrose de células de diferentes tecidos (CAMPBELL, 2006; HOFFMANN & SOLTER, 2008; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006). Segundo Silvestre (2003), os níveis de AST aumentam no sangue na vigência de processos infecciosos.

Tendo em vista que o aumento da atividade sérica de AST não pode ser diferenciada entre lesão hepática ou muscular, esta deve ser mensurada juntamente com uma enzima músculo-específica, como a creatinoquinase (CK), para que seja possível diferenciar dano hepático ou muscular (HOFFMANN & SOLTER, 2008, SCHMIDT et al., 2007).

Utilizando-se animais clinicamente saudáveis, Silva e colaboradores (2010), ao avaliarem o plasma de *Crotalus durissus*, obtiveram média de AST de $22,25 \pm 11,4$ U/L enquanto Kolesnikovas et al. (2001) observaram valores de 9,73 U/L para mesma espécie. Rameh-De-Albuquerque (2007) obteve variações de 3,79 a 10,1 U/L para *Crotalus durissus collilineatus* e de 4,04 a 7,72 U/L para *Crotalus durissus terrificus*, enquanto Troiano et al (2001) encontraram valores de 20,00 U/L ($\pm 7,6$) para *Crotalus durissus terrificus*.

1.4.3. Alanina aminotransferase (ALT)

Alanina aminotransferase (ALT), antigamente conhecida como transaminase glutâmico piruvato (TGP), é uma aminotransferase que catalisa a transaminação de L-alanina e 2-oxoglutarato a piruvato e L-glutamato (HOFFMANN & SOLTER, 2008; LOPES et al, 2007) .

A atividade sérica de ALT é elevada no fígado dos répteis, no entanto, esta não é considerada um indicador sensível no diagnóstico da doença hepática, uma vez que várias espécies de animais não têm um nível significativo de atividade da ALT no tecido hepático (CAMPBELL, 1996, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Por outro lado, o rim dos répteis tem alta atividade de ALT e fosfatase alcalina (FA). Entretanto, o aumento significativo na atividade plasmática dessas enzimas não

ocorre com doença renal, pois a maior parte da enzima libertada a partir de células renais danificadas é excretada na urina, e não no plasma (CAMPBELL, 2006).

Silva e colaboradores (2010), ao avaliarem o plasma de *Crotalus durissus*, obtiveram média de ALT de $7,11 \pm 5,4$ U/L, enquanto Kolesnikovas et al. (2001) observaram valores de 11,32 U/L para mesma espécie. Rameh-De-Albuquerque (2007) obteve variações de 3,2 a 8,1 U/L para *Crotalus durissus collilineatus* e de 3,1 a 5,37 U/L para *Crotalus durissus terrificus*, enquanto Troiano et al (2001) encontraram valores de $13,00 \pm 4,1$ U/L para *Crotalus durissus terrificus*.

1.4.4. Fosfatase alcalina (FA)

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

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída em vários tecidos do corpo dos répteis e apesar de possuir uma elevada atividade nos rins, esta enzima não é um indicador sérico confiável de doença renal nestes animais por ser excretada na urina (CAMPBELL, 1996, 2004, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Existem poucas informações sobre a interpretação do aumento da atividade sérica da fosfatase alcalina em répteis, no entanto, sabe-se que essas elevações podem refletir atividade osteoblástica ou doença hepatobiliar em algumas espécies e, também, que animais mais jovens podem apresentar valores mais elevados que os adultos (CAMPBELL, 1996, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006). Durante um processo infeccioso, a fosfatase alcalina também pode estar aumentada (SILVESTRE, 2003).

Silva e colaboradores (2010), ao avaliarem a atividade plasmática de FA de *Crotalus durissus*, obtiveram média de $31,04 \pm 12,4$ U/L, enquanto Kolesnikovas et al. (2001) obtiveram uma variação de 11,34 a 195,42 U/L sob avaliação da mesma espécie. Rameh-De-Albuquerque (2007) observou uma média de 31,9 U/L para *Crotalus durissus collilineatus* e de 34,9 U/L para *Crotalus durissus terrificus*, enquanto Troiano et al (2001) encontraram valores de $17,1 \pm 2,7$ U/L para *Crotalus durissus terrificus*.

1.4.5. Glicose

A glicose é um dos principais combustíveis utilizados pelo organismo para a realização dos trabalhos biológicos (GONZÁLEZ & SILVA, 2006).

A concentração sanguínea de glicose em répteis varia de acordo com a espécie animal, o estado nutricional e as condições ambientais, podendo ainda apresentar variação sazonal em algumas espécies. A concentração normal de glicose no sangue dos répteis varia entre 60 e 100 mg/dL (CAMPBELL, 1996, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

As causas mais comuns de hipoglicemia em répteis incluem falta de alimentação e desnutrição, dietas altamente protéicas, hepatopatia severa, septicemia, endocrinopatias e glicosúria (CAMPBELL, 1996, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

A hiperglicemia em répteis, raramente documentada, é, geralmente, iatrogênica por administração excessiva de glicose ou ainda de glicocorticóides. O *diabetes mellitus* também é descrito nestes animais que, quando acometidos, fazem hiperglicemia e glicosúria (CAMPBELL, 1996; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Valores da glicose sérica para *Crotalus durissus* foram observados por Troiano et al. (2001) identificando uma média de 23,96 mg/dL, e por Rameh-De-Albuquerque (2007), com variações de 18,6 a 31,9 mg/dL para *C. d. collilineatus* e de 15,5 a 24,6 mg/dL para *C. d. terrificus*.

1.4.6. Creatinina

A creatinina é uma molécula produzida pela degradação da creatina e da creatino fosfato. A excreção da creatinina só é realizada por via renal, refletindo a taxa de filtração, de forma que níveis altos de creatinina indicam uma deficiência na funcionalidade desse órgão (BRAUN & LEFEBVRE, 2008; GONZÁLEZ & SILVA, 2006).

Os valores de creatinina em répteis podem se elevar em casos de desidratação severa e doença renal. Todavia, o nível sérico encontrado, geralmente, é muito baixo ($<1\text{mg/dL}$), sendo considerado um pobre indicador de doenças renais (CAMPBELL, 1996, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Valores de creatinina encontrados na literatura para *Crotalus durissus* foram observados por Silva et al. (2010) ($0,52\text{ mg/dL}$) e por Kolesnikovas et al. (2001) ($1,04\text{ mg/dL}$). Segundo Rameh-De-Albuquerque (2007), foram observados variações de $0,7$ a $0,94\text{ mg/dL}$ para *C. d. collilineatus* e de $0,73$ a $1,6\text{ mg/dL}$ para *C. d. terrificus*. Troiano et al (2001) também relatou valores de $0,75 \pm 0,24\text{ mmol/L}$ para *Crotalus durissus terrificus*.

1.4.7. Ácido úrico

O ácido úrico é o produto primário final do catabolismo de proteínas, nitrogênio não protéico e purinas em répteis terrestres e representa 80 a 90% do nitrogênio total excretado pelos rins (CAMPBELL, 1996, 2004, 2006).

A concentração normal sanguínea de ácido úrico para a maioria répteis é inferior a 10 mg/dL , podendo sofrer influência da dieta, especialmente aquelas ricas em proteínas e ureia. Os carnívoros tendem a apresentar níveis séricos mais elevados de ácido úrico do que os herbívoros (CAMPBELL, 1996; 2006). Em répteis carnívoros esta concentração se eleva até duas vezes no período pós-prandial (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

A hiperuricemia pode estar associada com doenças renais severas, tais como aquelas causadas por bacteremia, nefrocalcinose e septicemia. O uso indevido de antibióticos nefrotóxicos, como aminoglicosídeos pode causar necrose tubular renal, predispondo ao aumento do ácido úrico plasmático (CAMPBELL, 1996, 2004, 2006; GREGO et al., 2001).

Segundo Silva e colaboradores (2010), foram encontrados valores plasmáticos médios de $2,08 \pm 1,4\text{ mg/dL}$ de ácido úrico para *Crotalus durissus*, enquanto que para Kolesnikovas et al. (2001) foi obtido valor médio de $5,8\text{ mg/dL}$. Em estudo por Rameh-De-Albuquerque (2007) obteve-se variações de $2,64$ a $3,42\text{ mg/dL}$ para *Crotalus*

durissus collilineatus e de 4,28 a 11,97 mg/dL para *Crotalus durissus terrificus*, ao passo que Troiano et al (2001) encontraram valor médio de $0,450 \pm 0,143$ mmol/L (7,57 mg/dL) para *Crotalus durissus terrificus*.

1.4.8. Ureia

A ureia é uma pequena molécula hidrossolúvel sintetizada no fígado a partir do grupo amina liberado pelos aminoácidos durante o catabolismo das proteínas, sendo transportada pelo plasma até os rins, onde é filtrada, e depois excretada na urina (MOTTA, 2003; GONZÁLEZ & SILVA, 2006; RAUN & LEFEBVRE, 2006).

Os répteis são animais primariamente uricotélicos, portanto a concentração de ureia no sangue destes animais é relativamente baixa (< 10 mg/dL). Os valores plasmáticos de ureia geralmente são pobres indicadores de doença renal em répteis, podendo ser mais útil na avaliação de répteis aquáticos, que excretam primariamente a ureia como catabólito proteico (CAMPBELL, 1996; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

A elevação dos valores normais pode ser observada na vigência de doença renal ou pré-renal, podendo se elevar também com a elevada ingestão proteica, sendo considerado um pobre indicador de doença renal (CAMPBELL, 1996; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Valores de ureia plasmática para *Crotalus durissus* foram relatados por Silva et al. (2001), com média de 1,32 mg/dL, por Kolesnikovas et al. (2001), com valores médios de ureia de 3,19 mg/dL. Em estudos por Rameh-De-Albuquerque (2007) foram observados valores médios de 3 mg/dL para *Crotalus durissus terrificus* e de 2 mg/dL para *Crotalus durissus collilineatus*.

1.4.9. Colesterol

O colesterol é um esterol que compõe as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e membranas celulares sendo, também, substância precursora na síntese dos hormônios esteróides e ácidos biliares (MOTTA, 2003).

Mudanças nos níveis de colesterol sérico em répteis podem ser utilizadas para avaliar distúrbios no metabolismo lipídico (SWIMMER, 2000). A elevação pode estar associada, muitas vezes, à casos de lipidose hepática, mas pode ser fisiologicamente aumentado durante vitelogênese e antes da hibernação (CALLE et al., 1994; HERNANDEZ-DIVERS & COOPER, 2006).

As médias dos valores de colesterol plasmático para *Crotalus durissus* foram relatados por Silva et al (2010) (171,58 mg/dL ou 4,44 mmol/L) e por Kolesnikovas et al. (2001) (239,8mg/dL ou 6.18054 mmol/L). Também foram observados valores médios de 2,07 mmol/L (80.0464 mg/dL) e de 5.48232 mmol/L (212 mg/dL) para *Crotalus durissus terrificus* por Troiano et al (2001) e Rameh-De-Albuquerque (2007), respectivamente; e de 4.56429 mmol/L (176,5mg/dL) para *Crotalus durissus collilineatus* (RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007).

1.4.10. Triglicerídeos

Os triglicerídeos são o produto da esterificação dos ácidos graxos livres com o glicerol, servindo de reserva de energia (GONZÁLEZ & SILVA, 2006). Estes são sintetizados no fígado e intestino e são as formas mais importantes de armazenamento e transporte de ácidos graxos; constituindo as principais frações dos quilomícrons, das VLDL (*very-low-density-lipoproteins*) e pequena parte das LDL (*Low-density lipoprotein*) presentes no plasma sanguíneo (MOTTA, 2003).

Os valores séricos de triglicerídeos em répteis podem estar fisiologicamente aumentados durante a vitelogênese e pré-hibernação em decorrência de uma lipidose hepática (HERNANDEZ-DIVERS & COOPER, 2006). Em répteis mantidos em cativeiro, a causa mais comum de valores elevados nos níveis de triglicerídeos é um

defeito metabólico no transporte dos lipídios ou na síntese de proteínas, resultando em obesidade causada por superalimentação (FRYE, 1981 *apud* SWIMMER, 2000).

Valores séricos de triglicerídeos para *Crotalus durissus* foram observados por Silva et al. (2010), com média de 19,29 mg/dL (0,22 mmol/L). Para subespécie *Crotalus durissus terrificus*, Troiano et al. (2001) obtiveram média de 2,80 mmol/L.

1.4.11. Cálcio

O metabolismo do cálcio no sangue e a quantidade de cálcio ionizado no plasma de répteis é mediado pelo paratormônio (PTH), calcitonina e vitamina D₃ ativada. Outros hormônios como o estrogênio, tiroxina e glucagon também podem influenciar o metabolismo do cálcio nos répteis (CAMPBELL, 2004, 2006).

A hipocalcemia pode ocorrer devido à dietas com deficiência em cálcio e vitamina D₃ e com excesso de fósforo, alcalose, hipoalbuminemia ou hipoparatiroidismo; enquanto que a hipercalcemia é observada em dietas com excesso de vitamina D₃ e cálcio, no hiperparatiroidismo primário, no pseudo-hiperparatiroidismo, em doenças ósseas osteolíticas ou em fêmeas durante o desenvolvimento dos ovos (CAMPBELL, 2004, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Os valores de cálcio plasmático para a espécie *Crotalus durissus* foram observados por Silva et al. (15,25mg/dL ou 3,81mmol/L) e Kolesnikovas et al. (2001) (15,13mg/dL). Também foram descritos valores médios de 11,3 mg/dL (2,82 mmol/L) para *Crotalus durissus collilineatus* (RAMEH-DE-ALBUQUERQUE; 2007) e de 11,7 mg/dL (2,92 mmol/L) e 2,03 mmol/L (8,12 mg/dL) para *Crotalus durissus terrificus* por Rameh-De-Albuquerque (2007) e Troiano et al. (2001), respectivamente.

1.4.12. Potássio

O potássio é um íon predominantemente intracelular com mais de 98% localizado intracelularmente e a sua distribuição através da membrana celular desempenha um papel crítico na manutenção da excitabilidade cardíaca e neuromuscular (CARLSON, 2006).

Concentrações plasmáticas normais de potássio podem variar entre as espécies de répteis, variando, nas serpentes, entre 3 e 6 mEq/L. Troiano e colaboradores (2001) encontraram valor médio de $5,2 \pm 0,6$ mmol/L em *Crotalus durissus terrificus*.

Desequilíbrios comuns de potássio plasmático incluem ingestão inadequada de potássio na dieta, perda gastrointestinal de potássio (hipocalemia) ou diminuição da secreção renal de potássio (hipercalemia) (CAMPBELL, 2004, 2006).

Hipocalemia também pode estar associada à alcalose grave, enquanto a hipercalemia pode resultar de acidose grave ou de ingestão excessiva de potássio na dieta. Hipercalemia na presença de hiperfosfatemia geralmente indica lise dos eritrócitos (hemólise) ou uma amostra de sangue danificada (CAMPBELL, 2004, 2006).

1.4.13. Cloreto

O cloreto é o principal ânion no sangue e um componente osmoticamente ativo primário do plasma na maioria dos répteis (CAMPBELL, 2004, 2006). Sua concentração sanguínea é uma informação útil a respeito de distúrbios hidroeletrólíticos e do equilíbrio ácido-base (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Na maioria dos lagartos e serpentes, a concentração de cloreto varia entre 100 e 130 mEq/L (CAMPBELL, 2004, 2006). Troiano e colaboradores (2001) encontraram valor médio de 109 ± 5 mmol/L em *Crotalus durissus terrificus*.

A hipocloremia é rara em répteis e, quando acontece, sugere perda excessiva de cloro ou hiperidratação com fluidos com baixo nível de cloretos. A hipercloremia está associada à desidratação, doença tubular renal ou distúrbios na glândula de sal, em

serpentes marinhas (CAMPBELL, 1996; CAMPBELL, 2004, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

1.4.14. Sódio

O sódio advindo da dieta é absorvido no intestino e transportado para os rins, onde é eliminado ou reabsorvido dependendo da necessidade do réptil (CAMPBELL, 2006).

A concentração plasmática de sódio é uma informação útil a respeito de distúrbios hidroeletrolítico, do equilíbrio ácido-base, na desidratação e na hiperidratação (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

A concentração de sódio normal no plasma de répteis varia entre 120 e 170 mEq/L (CAMPBELL, 2006). Estudos realizados por Troiano e colaboradores (2001) observaram valores médios de $142 \pm 4,1$ mmol/L em *Crotalus durissus terrificus*.

Em répteis, a hiponatremia pode ser resultado da perda excessiva de sódio associado a desordens do trato gastrointestinal (diarreia), renal e alteração das glândulas de sal (em serpentes marinhas) ou iatrogênica por hiperidratação por via venosa ou intracoelômica com líquidos com baixo teor de sódio. A hipernatremia pode ocorrer devido à desidratação, a partir da perda excessiva ou baixa ingestão de água, e ao consumo excessivo de sal na dieta (CAMPBELL, 2004, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

1.4.15. Ferro

O ferro é um nutriente essencial e necessário em uma ampla variedade de processos metabólicos (HARVEY, 2008). A determinação de ferro sérico é útil no diagnóstico diferencial das anemias hipocrômicas e microcíticas.

Este está diminuído na ingestão e absorção inadequada, na perda crônica de sangue e na liberação diminuída de ferro dos estoques orgânicos (anemia da inflamação)

e infecções (GRIEGER & KLUGER, 1978; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006; ORIGGI, 2007), enquanto seu aumento ocorre na hemossiderose, em anemias hemolíticas (especialmente hemoparasitas), nas hepatopatias, na necrose hepática aguda e na sobrecarga de ferro (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

1.4.16. Proteína Plasmática Total (PPT) e frações

As proteínas plasmáticas são um grupo heterogêneo de proteínas com diversas funções, pesos moleculares e densidades de carga elétrica (VARGAS, 2007), as quais são sintetizadas e secretadas principalmente no fígado, a partir de hepatócitos, (ECKERSALL, 2007; LOPES et al.2007).

Entende-se por dosagem de proteínas plasmáticas totais, a dosagem de albumina e globulinas (RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007), as quais são subdivididas em alfa, beta e gama globulinas (CAMPBELL, 2006).

O método de biureto é o método mais preciso para a determinação da concentração plasmática de proteína total, embora o método do refratômetro seja comumente usado para estimar rapidamente a concentração plasmática de proteínas no sangue reptiliano (CAMPBELL, 2006).

A concentração plasmática normal de proteína total em répteis geralmente varia entre 3 e 7 g/dL. Os valores médios para *Crotalus durissus* foram descritos por Silva et al. (2010) (3,70 g/dL), Kolesnikovas et al. (2001) (3,71 g/dL) e Troiano et al. (2001) (3,79 g/ dL).

A hipoproteinemia em répteis é comumente associada à má nutrição. No entanto, outras causas incluem má absorção, má digestão, enteropatias, grave perda de sangue e doença crônica hepática ou renal (CAMPBELL, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

A hiperproteinemia ocorre com desidratação ou hiperglobulinemia associada à doenças inflamatórias crônica. O globulinas alfa, beta e gama podem aumentar em doenças infecciosas (CAMPBELL, 1996, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006). Aumentos na concentração de proteínas também são observados em fêmeas de répteis

durante a fase folicular ativa, retornando ao normal após a ovulação (CAMPBELL, 2006).

A albumina, uma proteína globular solúvel em água, é a mais abundante das proteínas séricas, constituindo 35 a 50% do total das mesmas (ECKERSALL, 2007; LOPES et al, 2007). A fração globulina pode ser estimada se a proteína total e concentrações de albumina são conhecidas, sendo obtida pela diferença entre as concentrações de proteína total e de albumina (ECKERSALL, 2007).

Características bioquímicas e fisiopatológicas da albumina e das várias globulinas são utilizados para o diagnóstico de doenças (ECKERSALL, 2007). A secreção de albumina pode ser resultado de uma queda na pressão osmótica (EVANS, 2002), mas também pode ser afetada por alterações fisiopatológicas durante doenças infecciosas ou inflamatórias, quando sua secreção é reduzida (ECKERSALL, 2007).

As frações alfa, beta e gama globulinas podem aumentar em doenças infecciosas e, geralmente, a alfa globulina pode aumentar em necrose tecidual e diminuir em doenças hepáticas severas, má nutrição e má absorção (CAMPBELL, 1996).

O conhecimento da concentração de proteína total e das principais frações das proteínas séricas é de grande importância no estudo da fisiologia das serpentes, pois além de determinar valores de referência, podem ser utilizados como indicadores da saúde dos animais, auxiliando clínicos para diagnósticos e prognósticos mais acurados, e permitindo o acompanhamento da evolução de doenças em serpentes criadas em cativeiro (FONTEQUE, 2009).

1.5. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

1.5.1. Contenção, coleta de sangue e anticoagulantes

Em serpentes peçonhentas, diversos tipos de contenções físicas são utilizadas, como a técnica do laço de Lutz, o tubo de contenção e a caixa de contenção (GREGO et al., 2001). A técnica com o Laço de Lutz é uma das mais empregadas, sendo uma boa alternativa para examinar e tratar serpentes peçonhentas e agressivas, sem perigo para o

manipulador ou dano à serpente (GREGO et al., 2001, 2002). O uso de contenção química, com a utilização de analgésicos ou agentes sedativos, não é indicado por induzir alterações significativas nos parâmetros hematológicos (TROIANO, 1997; CUSTER & BUSH, 1980; TROIANO, 2001).

Durante o procedimento de coleta, as particularidades anatômicas e fisiológicas de cada espécie devem ser consideradas (CUBAS, 1997), fazendo com que a escolha do local de coleta e o volume de sangue a ser coletado devam ser determinados levando-se em consideração a espécie estudada, o tamanho do espécime, as condições físicas do mesmo e a preferência do profissional que faz as coletas (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Em répteis, uma lista de métodos para coleta de sangue tem sido descrita, no qual os principais locais para obtenção das amostras de sangue nas serpentes incluem a veia caudal ventral (coccígea ventral), a veia jugular (palatina-pterigóidea) e a cardiocentese (BUSH & SMELLER, 1978, ALMOSNY & SANTOS, 2001; THRALL, 2004; FUNK, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Em serpentes de grande e médio porte a veia caudal é usada, preferencialmente, para a coleta de sangue e o ponto para coleta encontra-se imediatamente caudal ao hemipênis nos machos, ou à cloaca nas fêmeas (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006). No entanto, quando é tentada a punção venosa, corre-se o risco de perfundir o hemipênis ou a glândula de cheiro (NAVARRE, 2006), como também ocorrer a contaminação por linfa, visto que os vasos linfáticos acompanham os vasos sanguíneos (THRALL, 2004). Essa contaminação resulta na diminuição da hematimetria, hemoglobinometria e volume globular (THRALL, 2004).

As veias palatina-pterigóideas podem ser utilizadas, certificando-se que os animais possuem a cavidade oral saudável (ALMOSNY & SANTOS, 2001; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006), no entanto, é difícil de usar e repleta de complicações (FUNK, 2006). No caso da cardiocentese, esta deve ser limitada as serpentes que pesam mais de 300 g (GREGO et al., 2002).

Considerando que o volume de sangue na maioria dos répteis varia de 5% a 8% da sua massa corporal, dessa quantidade, até 10% do volume total de sangue pode ser coletado em uma paciente saudável sem prejuízo à saúde do animal, ou seja, 0,5% a 0,8% do seu peso corporal pode ser coletado (LILLYWHITE & SMITS, 1984; WELLEHAN & GUNKEL, 2004; MADER & RUDLOFF, 2006; SYKES et al., 2008).

O ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), a heparina e o citrato de sódio são os anticoagulantes mais citados na literatura para conservação de amostras hematológicas em répteis (ALMOSNY & SANTOS, 2001; ALMOSNY & MONTEIRO 2006), sendo a heparina lítica a mais usada, uma vez que o EDTA resulta em hemólise das células vermelhas do sangue de quelônios (KNOTKOVÁ et al., 2002; CAMPBELL, 2006; MURO et al., 2008).

1.5.2. Considerações gerais sobre a composição e constituintes do sangue de répteis

O sangue é um tecido formado por um meio extracelular, o plasma, e por três tipos de células: os eritrócitos, os leucócitos e os trombócitos, sendo todas nucleadas nos répteis (COLES, 1986; ALLEMAN et al., 1999; FUNK, 2006).

O plasma compreende 60 a 80% do volume de sangue onde está suspensa uma variedade de eletrólitos inorgânicos e de compostos orgânicos. Este é um fluido incolor ou levemente amarelado e nas serpentes pítons (asiáticas) e nas jararacas (sul-americanas) pode assumir coloração verde-amarelada graças à presença conjunta de carotenóides e de riboflavinas (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994; JACOBSON, 2007).

A análise laboratorial de amostras de animais selvagens fornece informações vitais para o diagnóstico, prevenção e controle de doenças. Grandes variações podem ocorrer em testes realizados em laboratórios diferentes, devido às diferentes técnicas utilizadas, o tempo de amostragem, o manejo do animal, a idade, o esforço físico, os estados nutricional, fisiológico e mental, a estação do ano, o anestésico usado na contenção e as condições ambientais (DUGUY, 1970; ALMOSNY & SANTOS, 2001; CAMPBELL, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006). Portanto, a padronização regional dos métodos de amostragem e das técnicas de laboratório torna-se importante. Valores do hemograma e esfregaço sanguíneo fazem parte da avaliação dos pacientes reptilianos, onde através da examinação de eritrócitos, leucócitos e trombócitos do sangue periférico, é possível detectar condições como anemias, doenças inflamatórias, parasitemias, disordens hematopoéticas e alterações homeostáticas (CAMPBELL, 2004).

A avaliação hematológica de rotina dos répteis inclui a determinação do volume globular (VG), concentração de hemoglobina (Hb), contagem dos glóbulos vermelhos (CTE), índices hematimétricos, contagem total de leucócitos (CTL), contagem diferencial de leucócitos e avaliação de morfológica das células do sangue (STACY et al., 2011).

Alterações morfológicas nas células do sangue periférico podem indicar processos de doenças específicas, ajudar a estabelecer uma lista de diagnósticos diferenciais e ajudar a monitorar o estado de saúde de um paciente durante o curso da doença ou da resposta à terapia. Por causa de sua fisiologia única e comportamento, muitos estados de doenças crônicas em répteis não são detectados até mesmo em estágios avançados (STACY et al., 2011).

Existem poucos estudos sobre os padrões hematológicos de serpentes, principalmente as sul-americanas (TROIANO et al., 1997, GREGO et al., 2001). Esta informação torna-se essencial para reconhecer alterações sanguíneas em animais doentes, identificar células inflamatórias em tecidos lesados e entender o papel de vários tipos celulares durante o processo infeccioso (ALLEMAN et al., 1999).

Historicamente, há confusão na terminologia dos tipos de células do sangue e de tecidos hematopoiéticos de répteis. Os problemas inerentes à classificação das células de acordo com as habilidades de coloração e a função levam a divergências na nomenclatura das células entre diferentes pesquisadores (JACOBSON, 2007; SILVA et al., 2009).

Atualmente, leucócitos no sangue periférico de répteis podem ser classificados em granulócitos (heterófilos, eosinófilos e basófilos) e células mononucleares (linfócitos, monócitos e azurófilos) (DOTSON et al., 1995; SALAKIJ, 2002, ALMOSNY & MONTEIRO, 2006; STACY et al., 2011). Os heterófilos podem apresentar citoplasma claro (degranulado) ou conter grânulos eosinofílicos (ALMOSMY, in press).

Devido às diferenças interespecíficas, é importante caracterizar os tipos celulares das várias espécies de interesse. Em adição, o número relativo de vários leucócitos no sangue varia consideravelmente entre diferentes espécies de répteis. Assim, os azurófilos são leucócitos comumente observados em Squamata (serpentes e lagartos) e Crocodylia (jacarés, crocodilos e gaviais), mas são apenas ocasionalmente encontrados em Chelonia (tartarugas, cágados e jabutis). Por outro lado, os eosinófilos são

observados comumente em *Crocodylia* e *Chelonia*, porém a existência destes leucócitos no sangue de diferentes *Squamata*, particularmente serpentes, é controversa e não foi observada em vários estudos (ALLEMAN et al., 1999; FUNK, 2006; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007; SILVA et al., 2009).

Várias alterações hematológicas incluindo anemia, leucopenia ou leucocitose, heteropenia ou heterofilia, linfopenia ou linfocitose e monocitose são indicadores não específicos de resposta inflamatória crônica, sendo um exemplo de como doenças sistêmicas podem manifestar-se no hemograma de répteis (STACY et al., 2011).

1.5.3. Células sanguíneas

1.5.3.1. Eritrócitos

Este grupo de células é produzido na medula a partir de células da linhagem eritróide (eritroblastos), mas, diferentemente dos mamíferos, estas podem ser geradas a partir de sítios hematopoiéticos secundários como o fígado e o baço, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento (GOULART, 2004). A vida média de um eritrócito de réptil varia de 600-800 dias, maior do que em aves e mamíferos, devido a baixa taxa metabólica desses animais (CAMPBELL, 1996).

Os eritrócitos maduros são morfologicamente similares entre várias espécies de répteis, apresentando-se nucleados, elípticos e de bordas arredondadas, sendo maiores que os eritrócitos de mamíferos e aves (ALLEMANNN et al, 1999; CAMPBELL, 2006). O núcleo é posicionado centralmente, irregular ou elíptico e têm cromatina condensada profundamente basofílica, enquanto o citoplasma se cora uniformemente de alaranjado-róseo com corantes do tipo Romanowsky, como o corante Wrigth (CAMPBELL, 2004; STACY et al., 2011). À medida que este envelhece, seu núcleo aumenta de volume e torna-se hipocrômicos, perdendo o padrão de cromatina característico, podendo variar de muito basofílico a um padrão de cor mais claro (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994; DOTSON et al., 1995).

Eritrócitos imaturos são células arredondadas e irregulares, com grande núcleo arredondado e citoplasma basofílico e cromatina menos densa no núcleo. Estas são constituintes normais do sangue dos répteis, representando 1,5 a 2,5% da população de células vermelhas, podendo ser encontradas especialmente em animais jovens e que estão para fazer ecdise (CAMPBELL, 2004, 2006; SYKES, 2008).

É comum encontrar atividade mitótica em hemácias do sangue dos répteis. No entanto, a detecção de atividade morfológica nuclear anormal, como binucleação ou mitose, pode ser indicativo de animais com anemia regenerativa, má nutrição ou doença inflamatória importante (CAMPBELL, 2004; FUNK, 2006; MARTÍNEZ-SILVESTRE, et al., 2011).

A presença de formas anômalas de eritrócitos no sangue pode estar associada a doenças autoimunes ou infecções crônicas, enquanto a observação de inclusões intracitoplasmáticas mostra-se relacionada a infecções virais. Costuma ser frequente a visualização de uma grande variedade de parasitos, tanto intra-eritrocitários quanto extracelulares. Dentre os hemoprotozoários comuns, encontram-se principalmente as hemogregarinas, tripanossomos e *Plasmodium*, sendo menos encontrados *Leishmania*, *Saurocytozon*, *Hemoproteus* e piroplasmídeos (FRYE, 1991; GARCIA-NAVARRO & PACHALY 1994; SILVESTRE, 2003; CAMPBELL, 2006).

Em serpentes, a presença de hemoparasitos geralmente não está correlacionada com os sinais clínicos da doença, no entanto, em cativeiro essa parasitemia pode elevar-se consideravelmente (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

As anemias nos répteis são semelhantes às descritas para as aves e mamíferos. Estas podem ser classificadas em hemorrágicas (perda de sangue), hemolíticas (aumento na destruição das células vermelhas) e não regenerativas (diminuição na produção de eritrócitos). Anemias hemorrágicas são geralmente causadas por lesões traumáticas ou parasitas sugadores de sangue, no entanto, outras causas como coagulopatia ou lesão ulcerativa também devem ser consideradas. Por outro lado, anemia hemolítica pode resultar de parasitemia, septicemia ou toxemia enquanto as anemias não regenerativas são normalmente associadas a doenças inflamatórias crônicas, especialmente às associadas a agentes infecciosos. Outras causas podem ser associadas à anemia não regenerativa como doença crônica renal ou hepática, neoplasia, produtos químicos ou possivelmente hipotireoidismo (CAMPBELL, 2006).

1.5.3.2. Leucócitos

Nas primeiras décadas do século XX começaram a surgir alguns trabalhos sobre a morfologia dos leucócitos de répteis em geral, porém, as serpentes, desde essa época têm sido pouco investigadas (SANO-MARTINS, 1978).

Os leucócitos são células que desempenham suas funções nos processos inflamatórios e imunológicos, constituindo-se os chamados elementos celulares da inflamação (CAMPBELL, 1996).

Uma leucocitose, em geral, é resultante de processos infecciosos agudos, como o de origens bacterianas, mas também pode ocorrer após uma situação de estresse e/ ou traumatismo. No entanto, doenças inflamatórias superagudas costumam determinar leucopenias devido à rápida mobilização de heterófilos para os órgãos-alvo, podendo também estar associada a doenças virais e toxemias (GOULART, 2004; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

Em serpentes observa-se que antes da ecdise ocorre leucocitose, enquanto que durante e depois da muda observa-se leucopenia (SILVESTRE, 2003). Segundo Campbell (1996), em serpentes o número de leucócitos totais varia de 6 a 12×10^3 cel/ μ l.

1.5.3.3 Linfócitos

Os linfócitos de répteis têm morfologia e função semelhantes aos de mamíferos, aves e peixes, sendo os mais abundantes nos esfregaços de sangue dos reptilianos, pois, em termos gerais, representam 15 a 89% da contagem total de leucócitos (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994; ARIKAN et. al, 2009; STACY et al., 2011).

Os linfócitos maduros apresentam cromatina nuclear densamente agregada, com alta proporção núcleo:citoplasma e possuem um citoplasma ligeiramente basofílico (azul-claro). O citoplasma é escasso e ligeiramente basofílico (azul claro) e carece de vacúolos e grânulos. O núcleo é central ou ligeiramente excêntrico, redondo ou com discreta endentação, podendo apresentar tamanhos bastantes variáveis, de pequenos a grandes (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994; CAMPBELL, 2004).

Essas células são responsáveis por várias funções imunológicas, podendo ser influenciadas pelo ambiente, onde temperaturas baixas podem suprimir ou mesmo inibir a resposta imune dos répteis (CAMPBEEL, 2004).

Linfócitos reativos, normalmente, são uma indicação de estimulação antigênica. Esses linfócitos apresentam citoplasma intensamente basofílico, podendo apresentar certa quantidade de vacúolos puntiformes e cromatina nuclear menos condensada (STRIK, et al., 2007, CAMPBEEL, 2006).

1.5.3.4. Monócitos

Os monócitos de répteis são as células leucocitárias de maior tamanho nos répteis e têm morfologia e função semelhantes aos de mamíferos, aves e peixes (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011; STACY et al., 2011). Os monócitos de serpentes frequentemente têm um núcleo redondo a oval e contém grânulos azurofílicos em abundância. Embora os monócitos que possuem uma aparência azurofílica no citoplasma sejam frequentemente chamados de azurófilos na literatura, suas características citoquímicas e ultra-estruturais são similares aos monócitos de mamíferos e tem sido reportado tanto como monócitos quanto como um tipo celular separado (CAMPBELL, 2006).

Monócitos possuem capacidade de fagocitar, sendo observadas frequentes figuras de fagocitose bacteriana e de restos celulares. Estes participam da resposta inflamatória atuando na formação de granulomas e das células gigantes, especialmente, nas respostas granulomatosas a infecções bacterianas ou a ovos de trematódeos (CAMPBELL, 1996; RASKIN, 2000).

1.5.3.5. Azurófilos

Azurófilos são células exclusivas de répteis. Em serpentes, essas células são descritas como um mononuclear que possui um citoplasma característico com bordas

citoplasmáticas definidas e citoplasma com tom azul-cinza com vacúolos e contendo grânulos com aspecto “empoeirado” num tom rosa intenso. Os azurófilos comportam-se citoquimicamente como neutrófilos e funcionalmente semelhante à monócitos (THRALL, 2004; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006; STACY et al., 2011).

1.5.3.6. *Basófilos*

Em geral são células redondas pequenas, com grânulos citoplasmáticos metacromáticos basofílicos, muitas vezes sobrepostos ao núcleo, que quando visível, nota-se ligeiramente excêntrico e não lobado (CAMPBELL, 2004).

A função desta célula ainda não é bem conhecida, mas provavelmente, é similar aos basófilos dos mamíferos, parecendo atuar na resposta alérgica processando imunoglobulinas de superfície e liberando histamina devido à degranulação. Sugestivamente pode atuar no combate a alguns tipos de endo e ectoparasitas e possui pequena capacidade de fagocitar (SCOTT & STOCKHAM, 2000; CAMPBELL, 2006; MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011).

1.5.3.7. *Heterófilos*

Em geral, os heterófilos são equivalentes aos neutrófilos de mamíferos, envolvendo o mecanismo de destruição de microorganismos fagocitados não dependentes de oxigênio. Estes são células arredondadas, com um núcleo excêntrico, redondo ou oval, com denso aglomerado de cromatina nuclear (CAMPBELL, 2004; STACY et al., 2011), podendo se apresentar de duas formas: com citoplasma claro (ou degranulado) ou contendo grânulos eosinofílicos (ALMOSNY in press).

Nos heterofilos com grânulos eosinofílicos, embora o número e a forma dos grânulos variem com as espécies, geralmente os grânulos citoplasmáticos são fusiformes de coloração laranja -brilhante com coloração May-Grünwald Giemsa (MARTÍNEZ-SILVESTRE, et al. 2011).

Os heterófilos costumam representar 20 a 40 % da contagem total de leucócitos, podendo estar em maior proporção nos casos de infecções bacterianas e fúngicas, dano tecidual e estresse. Essas células possuem importante papel na defesa do organismo contra patógenos invasores, assumindo o papel fagocítico desempenhado pelos neutrófilos nos mamíferos, realizando processos de quimiotaxia, opsonização, ingestão e lise (HAWKEY & DENNETT, 1989; GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994).

1.5.3.8. Eosinófilos

Os eosinófilos possuem praticamente o mesmo tamanho e forma dos heterófilos, aparecendo como grandes células redondas, com grânulos citoplasmáticos eosinofílicos esféricos, variando de tamanho de acordo com a espécie. Essas células possuem núcleo central e forma variável, de alongada a lobada (CAMPBELL, 2004; SYKES et al., 2008). A presença de eosinófilos em serpentes é questionada (EGAMI & SASSO, 1988; FELDMAN et al., 2000).

1.5.3.9. Trombócitos

Os trombócitos desempenham um papel ativo na formação do trombo, na coagulação do sangue e na cicatrização de feridas, tendo capacidade de fagocitose, participando ativamente da defesa do organismo e da transformação em eritrócitos. Estes são análogos às plaquetas dos mamíferos (ALLEMAN, et al., 1999; GOULART, 2004, MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011).

A trombopoiese é semelhante em espécies de aves e répteis e os trombócitos originam-se na medula óssea a partir de uma célula mononuclear distinta. As etapas da trombopoiese incluem os tromboblastos, trombócitos imaturos e trombócitos maduros (RUSSELL, 2010). Trombócitos imaturos, quando presentes, indicam resposta regenerativa (CAMPBELL, 2004).

Os trombócitos são células pequenas, de elípticas a fusiformes, com núcleo centralizado que tende a acompanhar o formato da membrana celular. O núcleo possui

coloração profundamente basofílica e cromatina com padronização densa de coloração púrpura (DOSTSON et al., 1995; CAMPBELL, 2006).

O citoplasma é frequentemente incolor, fato importante para diferenciar dos pequenos linfócitos, no entanto, ocasionalmente pode apresentar uma coloração azul muito fraca e alguns grânulos azurofílicos (DOSTSON et al., 1995; CAMPBELL, 2004; MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011). As características morfológicas de trombócitos são semelhantes aos de linfócitos pequenos e sua diferenciação pode ser um desafio (ALLENAM et al., 1999; STACY et al., 2011).

Trombócitos ativado são comuns e surgem na forma de agregados de células, o citoplasma pode mostrar vacuolização e margens citoplasmáticas irregulares. Os trombócitos com núcleos polimórficos são considerados anormais e podem estar associados a doenças inflamatórias graves (CAMPBELL, 2004; ROVIRA, 2010).

A trombocitopenia em répteis, provavelmente, está relacionada com o consumo periférico excessivo ou a diminuição na produção dessas células. Às vezes podem aparecer trombócitos anômalos, com núcleo polimórfico, cuja presença está associada a doenças inflamatórias graves (CAMPBELL, 2006; MARTÍNEZ-SILVESTRE, et al. 2011).

1.5.3.10. Hematócrito, hematimetria e concentração de hemoglobina

O hematócrito, também chamado de volume globular, representa o percentual de células vermelhas em relação ao volume total de sangue (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006). Segundo Campbell (2004, 2006), o hematócrito normal na maioria dos répteis é de aproximadamente 30% (20 a 40%), portanto, um VG menor que 20% sugere anemia e valores superiores a 40% sugerem tanto hemoconcentração quanto eritrocitose (policitemia). Durante o processo de ecdise, há uma ligeira desidratação, a qual aumenta o valor do hematócrito (SILVESTRE, 2003).

O volume globular médio dos répteis é variável e parece haver uma relação inversamente proporcional ao número de hemácias e seu tamanho (DUGUY, 1970; CAMPBELL, 1996; CAMPBELL, 2006).

A contagem de eritrócitos, também chamada hematimetria, varia intraespecífica e interespecificamente nos répteis, mostrando alterações com a idade, sexo, estado nutricional e ocorrência de doenças (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994).

Da mesma forma, a hemoglobina e o hematócrito variam com diversos fatores, inclusive o ambiente (número de eritrócitos maior antes de hibernação e menor imediatamente após hibernação), estado nutricional e gênero (machos tendem a ter valores maiores de hemácias do que fêmeas). A concentração normal de hemoglobina em répteis varia de 6 a 12 g/dL e a contagem total de eritrócitos varia de 300.000 a 2.500.000 (CAMPBELL, 1996, 2006; MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011).

1.5.3.11. Índices hematimétricos

Os índices hematimétricos como o volume corpuscular médio (VCM), a concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) são índices que podem ser calculados, utilizando fórmulas padrões, depois de ter sido obtido o valor do hematócrito (ht), o número total de eritrócitos e a concentração de hemoglobina (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011).

O Volume Corpuscular Médio é a expressão do valor médio do volume de hemácias, a Hemoglobina Corpuscular Média expressa a quantidade média de hemoglobina nas hemácias e a Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média determina a proporção de hemoglobina na média de hemácias (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007) e sua avaliação irá ajudar a avaliar a resposta da medula em uma anemia (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011).

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

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações dos parâmetros biométricos, hematológicos e bioquímicos sanguíneos causados pelo agente etiológico da acromia cutânea em serpentes *Crotalus durissus cascavella* mantidas em cativeiro.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do agente da acromia cutânea no desenvolvimento das serpentes *C. d. cascavella* mantidas em cativeiro durante o período de estudo.
- Avaliar a progressão das áreas lesionadas nas serpentes *C. d. cascavella* durante o período de estudo.
- Identificar alterações hematológicas e bioquímicas nas serpentes *C. d. cascavella* que apresentam acromia cutânea bem como nas que não possuem alterações na pele.
- Avaliar a presença de fungos na pele das serpentes *C. d. cascavella* com e sem acromia cutânea, mantidas em cativeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SERPENTES

Foram utilizadas 24 serpentes da subespécie *Crotalus durissus cascavella*, procedentes dos estados de Pernambuco e da Bahia, mantidas em cativeiro no Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas (LAPT_x) – UFPE, sendo acompanhadas durante o período de outubro de 2010 a agosto de 2011.

Os animais foram divididos em 3 grupos: A) Grupo controle: 7 animais (4 machos e 3 fêmeas) adultos, clinicamente saudáveis de acordo com o exame físico realizado pelo veterinário, que foram recebidos no Serpentário 1, completamente isolado dos animais com acromia, no período de 2010 e 2011; B) Grupo assintomático: 8 animais (6 fêmeas e 2 machos) adultos sem manchas, que foram recebidos no Serpentário 2 (mesma sala dos animais com acromia), no período de 2003 a 2009; e C) Grupo sintomático: 9 animais (5 fêmeas e 4 machos) adultos com manchas acrômicas que foram recebidos no Serpentário 2 no período de 1997 a 2008 (Tabela 1).

3.2.SERPENTÁRIOS

A primeira área (17,55 m²), denominada Serpentário 1, é composta por uma ante-sala de segurança e uma sala onde são mantidas as serpentes que chegam ao laboratório. Esse serpentário comporta os animais do grupo controle das pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas. A segunda área, o Serpentário 2, possui entrada independente do Serpentário 1, tem 13,15 m² e abriga o plantel dos grupos assintomático e sintomático.

As duas áreas, onde são mantidas serpentes, possuem janelas visando à entrada de iluminação natural, pias de inox com bancada de procedimentos, estantes com caixas plásticas e de madeira para manutenção das serpentes, um ar condicionado (ligado

apenas nos períodos quentes para controlar a temperatura do ambiente), um timer para controle do ciclo de luz artificial de 12 horas e um termo-higrômetro (Winner) para aferir a temperatura e umidade de cada sala.

Tabela 1: Dados gerais das serpentes da subespécie *Crotalus durissus cascavella* mantidas no Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas – UFPE.

Serpentário	Registro	Procedência	Sexo	Data entrada Serpentário
Grupo Controle				
1	562	PE	Macho	2010
1	563	PE	Macho	2010
1	565	PE	Macho	2010
1	566	PE	Macho	2010
1	567	PE	Fêmea	2010
1	568	PE	Fêmea	2010
1	569	PE	Fêmea	2011
Grupo Assintomático				
2	244	PE	Fêmea	2003
2	470	BA	Fêmea	2006
2	478	PE	Fêmea	2006
2	507	PE	Macho	2007
2	530	PE	Fêmea	2008
2	534	PE	Fêmea	2008
2	535	PE	Macho	2009
2	538	PE	Fêmea	2009
Grupo Sintomático				
2	50	PE	Macho	1997
2	170	BA	Fêmea	2000
2	173	BA	Fêmea	2000
2	175	BA	Macho	2000
2	221	PE	Macho	2002
2	354	PE	Fêmea	2004
2	479	PE	Macho	2006
2	510	PE	Fêmea	2008
2	520	PE	Fêmea	2008

3.3.MANUTENÇÃO EM CATIVEIRO

Os animais foram acondicionados em caixas individuais de polipropileno transparente retangular (15 cm x 22 cm x 14,5 cm) ou de madeira (54 x 40 x 26 cm, 40 x 35 x 25 cm), com tampa frontal de vidro e forradas com papel. Os animais passaram por uma inspeção diária e, quando necessário, tanto a água disponível *ad libitum*, quanto à forração foram substituídos.

As serpentes foram submetidas a um fotoperíodo de 12 horas e mantidas em salas climatizadas, com temperatura e umidade média de $27,12^{\circ}\text{C} \pm 0,81^{\circ}\text{C}$ e $73,76\% \pm 6,92\%$ para o Serpentário 1 e de $26,72^{\circ}\text{C} \pm 0,88^{\circ}\text{C}$ e $70,93\% \pm 10,99\%$ para o Serpentário 2.

As cascavéis foram alimentadas, mensalmente, com camundongos Swiss (*Mus musculus albinus*) ou Ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), correspondendo a $15\% \pm 5\%$ do peso total das mesmas.

Antes do início do estudo, as serpentes foram vermifugadas com Ivermectina (Ivomec®) na dose de 0,2 mg/Kg por via subcutânea em duas doses, com intervalo de 15 dias. Posteriormente, os animais passaram por um período de quarentena de três meses.

Os animais foram contidos manualmente, com o auxílio do laço de Lutz (Figura 4) para a realização dos procedimentos de biometria e coleta de sangue, realizados em março e agosto de 2011.



Figura 4: Contenção física de *Crotalus durissus cascavella* com laço de Lutz.

BIOMETRIA E ESTUDO MACROSCÓPICO DA PELE

Foram realizadas as seguintes análises, utilizando paquímetro digital: I) Peso dos animais; II) Comprimento rostro-cloacal e caudal; III) Arco mediano do corpo e da cauda; IV) Número de lesões no segmento rostro-cloacal e caudal; V) Comprimento e largura de cada lesão.

Em todas as análises, as áreas lesionadas de pele foram identificadas, fotografadas com máquina fotográfica digital e mapeadas em desenho esquemático. Todos os dados obtidos foram registrados em ficha médica individual de coleta de dados biométricos e macroscópicos da pele para acompanhamento clínico dos animais em laboratório.

A partir dos parâmetros obtidos foram calculados, para cada animal, os seguintes parâmetros:

- O percentual do ganho ou perda de peso (kg) e o do crescimento (cm) dos animais em relação às duas coletas;
- as áreas das lesões através da multiplicação das medidas transversais e longitudinais das lesões;
- os percentuais das áreas lesionadas totais em relação à área corpórea total, através de regra de três simples;
- as áreas totais das regiões rostro-cloacal (ACR) e caudal (AC), utilizando as seguintes equações.

Onde:

$ARC = 2\pi.r.h$ (considerando que o corpo da serpente tem forma de um cilindro);

$AC = 0,5. 2\pi.r.g$ (considerando que a cauda da serpente tem forma de um cone);

$g = r + h$;

sendo: h: comprimento rostro-cloacal; $2\pi.r$: arco mediano; g: geratriz.

3.5 PROCEDIMENTOS MICOLÓGICOS DAS BIÓPSIAS DE PELE

O processamento para investigação de fungos foi realizado no Laboratório de Micologia Médica – UFPE. Foram coletados amostras dos animais dos grupos controle (RG 562, 563, 565, 566, 567 e 568), assintomático (RG 470, 478 e 538) e sintomático (RG 50, 170, 173, 175, 221, 354 e 510).

3.5.1. Coleta de escamas

As escamas foram coletadas através de escarificação de lesões com o auxílio de bisturi esterilizado, sendo a amostra acondicionada em placa de Petri previamente esterilizada; bem como através de fricção com Swab em 2 mL de água destilada esterilizada adicionada de 50 mg de cloranfenicol/L (LACAZ et al., 2002). Após coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco para realização de exame direto, cultura e identificação dos agentes etiológicos.

3.5.2. Exame direto das escamas

O exame direto das escamas foi realizado através da montagem da amostra clínica entre lâmina e lamínula com solução aquosa de hidróxido de potássio a 20% como clarificador. As amostras obtidas com Swab foram processadas a fresco, sem adição de clarificante ou corante, entre lâmina e lamínula. Em seguida, o material foi analisado em microscópio óptico onde foi analisada a presença de estruturas fúngicas (LACAZ et al., 2002).

3.5.3. Cultura fúngica das escamas

Este procedimento foi realizado concomitantemente ao processo para o exame direto. As escamas foram inoculadas em meio ágar Sabourand (SAB) adicionado de cloranfenicol 50 mg/L contidos em placa de Petri. As amostras obtidas por fricção foram semeadas por estrias na superfície do referido meio de cultura. Posteriormente, as culturas foram incubadas a 28°C e o crescimento acompanhado por um período de 10 a 15 dias. À medida que se desenvolviam colônias fúngicas, as mesmas foram purificadas (LACAZ et al., 2002).

3.5.4. Purificação e isolamento das culturas fúngicas

Fragmentos das colônias foram suspensos em 2 mL de água destilada esterilizada contendo 50 mg/L de cloranfenicol. De cada suspensão, foram semeados por estrias, 0,2 mL na superfície de ágar SAB adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol. Unidades formadoras de colônia surgidas isoladamente foram repicadas para meio específico, de acordo com o fungo, contidos em tubos de ensaio e incubados a 28°C para posterior identificação de acordo com bibliografia especializada.

3.5.5. Identificação micológica

A identificação das culturas de fungos foi realizada através da observação das características macromorfológicas, micromorfológicas e quando necessária observação das características fisiológicas. As características macromorfológicas analisadas foram a forma, topografia e a coloração das colônias, através do aspecto macroscópico das

culturas obtidas em ágar SAB e ágar Czapeck contidos em placas de Petri ou tubos de ensaio, incubadas a 28°C durante sete a 10 dias, enquanto que para as micromorfológicas foram retirados pequenos fragmentos das culturas, os quais foram montados entre lâmina e lamínula e corados com azul de Amann. Esses fragmentos foram observados ao microscópio luminoso, a fim de serem analisados quanto a presença de estruturas somática e reprodutivas. Quando necessário, foi preparada cultura em lâmina (DE HOOG et al., 2000; LACAZ et al., 2002; SAMSON et al., 2007).

3.6 COLETA SANGUÍNEA

A coleta de sangue foi realizada no mês de março de 2012, 30 dias após a alimentação, por punção da veia coccígea ventral segundo Almosny & Monteiro (2006) (Figura 5), sendo retirado o volume máximo de 1,5 mL de sangue (LILLYWHITE et al., 1983). O sangue foi coletado com anti-sepsia realizada no local com álcool iodado, utilizando seringa descartável de 3 mL, de acordo com o tamanho do animal.

No momento da coleta, foram confeccionados esfregaços sanguíneos, sendo o restante do material acondicionado em tubos plásticos de fundo cônico (Eppendorf®) previamente rinsados com heparina sódica 5.000UI/ ml (Liquemine[®]) e imediatamente mantidos sob refrigeração em isopor contendo gelo.



Figura 5: Coleta de sangue da veia caudal ventral em *Crotalus durissus cascavella*.

3.7. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As dosagens de alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), creatinoquinase (CK), fosfatase alcalina (FA), proteínas plasmáticas totais (PPT), albumina, glicose, colesterol, HDL, triglicerídeo, ácido úrico, creatinina, cálcio, ferro, amilase, sódio, potássio e cloreto foram realizadas a partir do plasma, utilizando testes colorimétricos específicos Labtest (Labtest Diagnóstica®), de acordo com as instruções do fabricante, e processados em aparelho automatizado Lab Max 240 (Labtest Diagnóstica®). O valor da globulina foi obtido a partir da subtração da PPT e albumina e também foi calculada a razão albumin/globulina.

3.8 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

3.8.1. Coloração dos esfregaços sanguíneos

Os esfregaços confeccionados foram secos ao ar livre e submetidos às técnicas de coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG) modificado (ROSENFELD, 1947) para posterior realização da contagem total dos tipos celulares, leucometria específica, hematoscopia e pesquisa de hemoparasitos.

3.8.2 Contagem total dos tipos celulares

Inicialmente, as contagens totais de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foram realizadas de acordo com Ramed-de-Albuquerque (2007), a partir de uma diluição do sangue total 1:100 em solução isotônica de Gower acrescido do corante Giemsa, na proporção de 6 gotas de Giemsa para cada 10 mL do líquido de Gower (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006). A solução diluída foi então colocada em câmara de Neubauer[®] e as células contadas em microscópio óptico em aumento de 400 vezes.

Os eritrócitos presentes foram contados em 5/25 células do retículo central. O número total de eritrócitos foi obtido pela fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de eritrócitos contados} \times 100 \times 10 \times 5 \text{ (expresso em células/mm}^3\text{)}$$

Os leucócitos e trombócitos foram contados, separadamente, nas células dos 16 quadrados simples localizados nos cantos da Câmara de Neubauer. O número de leucócitos e trombócitos totais foram obtidos pela fórmula:

N° de leucócitos ou trombócitos contados $\times 100 \times 10 \times 0,25$ (expresso em células/mm³)

Tendo em vista a dificuldade de diferenciação entre alguns trombócitos e linfócitos observados através da contagem na câmara de Neubauer e leucometria específica, a contagem total para trombócitos e leucócitos em câmara de Neubauer[®] foi somado e, posteriormente, foi realizada a contagem de 100 células (leucócitos e trombócitos) em esfregaço sanguíneo, aplicando uma regra de três simples para determinar a porcentagem de cada tipo celular.

3.8.3 Determinação do Volume Globular (VG)

Para a determinação do volume globular foi utilizada a técnica do microhematócrito (THRALL, 2004), que consiste no preenchimento de um tubo capilar com sangue total, vedado com fogo em uma das suas extremidades e centrifugado em microcentrífuga por 5 minutos a 10.000 rpm. O volume das células aglutinadas foi lido em cartão de hematócrito.

3.8.4 Hemoglobinometria

A hemoglobina foi dosada através de kit Labtest[®] (Labtest Diagnóstica), obtida através da leitura colorimétrica da cianometahemoglobina em comprimento de onda de 540nm, segundo Campbell (2006).

3.8.5 Determinação do VCM, CHCM e HCM

Os índices hematimétricos foram obtidos segundo Almosny e Monteiro (2006) e através das seguintes fórmulas:

VCM (Volume Corpuscular Médio) = $ht \times 10/he$ (expresso em fl)

HCM (Hemoglobina Corpuscular Média) = $hb \times 10/He$ (expressa em pg)

CHCM (Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média) = $hb \times 100/ht$ (expressa em %)

3.8.6 Leucometria específica

Para as contagens diferenciais dos leucócitos, os esfregaços foram lidos em microscopia óptica sob imersão em aumento de 1000 vezes, seguindo um padrão de leitura em guarda grega percorrendo toda a lâmina. Os diversos tipos de glóbulos brancos foram anotados com auxílio de contador digital múltiplo (Leucotron®). Por meio dessa contagem, foram avaliadas as seguintes células: heterófilos, basófilos, azurófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos segundo Almosny (in press).

3.8.7 Pesquisa de Hemoparasitos

A pesquisa de hemoparasitos foi realizada durante o período de realização da leucometria específica, nos mesmos esfregaços corados com MGG.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar diferenças nos valores médios dos parâmetros biométricos, bioquímicos e hematológicos entre os diferentes grupos foi realizado, primeiramente, o teste de Kolmorov-Smirnov para verificar a normalidade dos resíduos e o teste de Bartlett para homocedasticidade das variâncias. Na afirmativa destas normalidades foi realizada Análise de variância (ANOVA) de um fator para cada uma das variáveis utilizadas.

Quando houve diferenças significativas ($p < 0,05$) foi realizado o Teste de Duncan *a posteriori* para confirmar onde as diferenças estavam localizadas. Alguns dados, mesmo após a transformação dos mesmos em $\log_{10}$, não apresentaram normalidade de resíduos e homocedasticidade das variâncias. Diante disto foi realizada uma Análise de Variância de Kruskal-Wallis (ANOVA) para verificar a significância das diferenças entre os grupos e, em seguida, foram utilizadas comparações múltiplas *a posteriori* para verificar onde as diferenças estavam localizadas.

4. RESULTADOS

4.1. Biometria e estudo macroscópico da pele

Durante o período de março a agosto de 2011 ocorreu o óbito de um animal do grupo controle (RG 569). Os resultados mostraram que, nesse período, nos animais do grupo controle o ganho de peso foi menor (média de 4,23%) em relação aos animais dos grupos assintomático (17,16%) e sintomático (17,38%) (Tabela 2). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre o ganho de peso dos grupos assintomático e sintomático, bem como entre o crescimento observado nos três grupos de estudo (Tabela 2).

Os resultados revelaram a existência de lesões que continham escamas atrofiadas, acrômicas e hiperacrômicas nos animais do grupo sintomático. Essas alterações foram visualizadas na mesma lesão ou isoladamente. As maiores lesões continham regiões acrômicas e atrofiadas no centro e regiões de hiperacromia nas bordas (Figuras 6 e 7). Dois animais do grupo sintomático apresentaram ruptura da pele do dorso, sendo possível a visualização da derme (Figura 8).

As lesões acrômicas localizaram-se tanto na região entre escamas quanto na própria escama (Figura 6A e B). Por outro lado, a hiperacromia foi observada apenas na região das escamas e em áreas pontuais (Figura 6A).

A maioria das lesões foi encontrada no corpo e no dorso dos animais e poucas na região da cauda e da cabeça. As lesões acrômicas localizadas dorsalmente apresentavam aspecto opaco, enquanto que as encontradas ventralmente ou próximas ao ventre apresentavam aspecto leitoso (Figura 6 e 7).

Tabela 2: Parâmetros biométricos das cascaveis dos grupos controle, assintomático e sintomático em março (Col 1) e agosto (Col 2) de 2011

Grupos/Nº de Registro (RG)	Peso (Kg)		Ganho/Perda peso (%)	CT (cm)		Aumento CT (%)
	Col 1	Col 2		Col 1	Col 2	
Controle						
562	0,875	0,880	0,57	122,0	122,0	0,00
563	1,370	1,000	-1,82	137,5	138,0	0,36
565	0,145	0,175	17,14	71,2	83,0	14,22
566	0,575	0,485	-15,65	104,0	104,1	0,10
567	0,830	0,755	-9,04	115,5	115,6	0,09
568	0,125	0,190	34,21	66,5	73,0	8,90
569	1,220	†	-	127,4	-	-
Média	0,730	0,580	4,24	106,30	105,95	3,94
± desvio	± 0,49	± 0,35	± 18,37	± 27,60	± 22,34	± 5,60
Assintomático						
244	0,960	1,000	14,28	124,5	124,5	0
470	0,665	0,830	19,88	113	114	0,88
478	0,360	0,520	30,77	93,5	99,5	6,03
507	0,160	0,190	15,79	74,5	77	3,25
530	0,415	0,430	3,49	95	95,2	0,21
534	0,750	0,875	14,28	117,2	117,4	0,17
535	0,265	0,325	18,46	79,4	84,5	6,03
538	1,450	1,730	16,18	138,5	139	0,36
Média	0,620	0,730	*17,16	105,10	107,01	2,09
± desvio	± 0,40	± 0,45	± 8,61	± 22,04	± 20,51	± 2,50
Sintomático						
50	0,890	1,145	22,27	128	128	0
170	0,915	1,055	13,27	123	123	0
173	1,095	1,275	14,12	124,5	126,5	1,58
175	0,560	0,685	18,25	114,5	115	0,43
221	1,025	1	15,64	126	127	0,79
354	1,170	1,455	19,59	119	120	0,83
479	0,295	0,425	30,59	87,4	91	3,96
510	0,505	0,62	18,55	106,5	108,5	1,84
520	0,880	0,955	7,85	128	128	0
Média	0,880	1,03	*17,38	120,21	121,14	0,78
± desvio	± 0,26	± 0,30	± 3,20	± 7,55	± 7,22	± 0,72

Col: Coleta; Ganho Peso (%): Ganho de peso da coleta 2 em relação à coleta 1 (%); CT: Comprimento Total; Aumento CT (%): Aumento do Comprimento Total da coleta 2 em relação à coleta 1(%); * Diferença significativa do grupo controle em relação aos grupos assintomático (p=0,0152) e sintomático (p=0,0192).

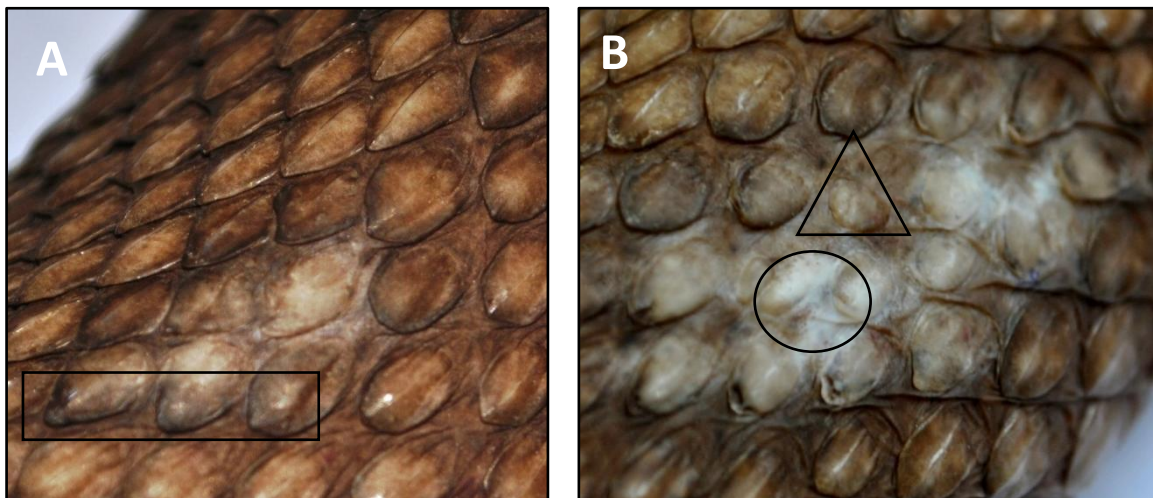


Figura 6: Diferentes tipos de lesões cutâneas de *C. d. cascavella*. A) Aspecto hipercrômico nas bordas (□). B) Aspecto acrômico nas escamas e entre escamas (○) e escamas consumidas (Δ).

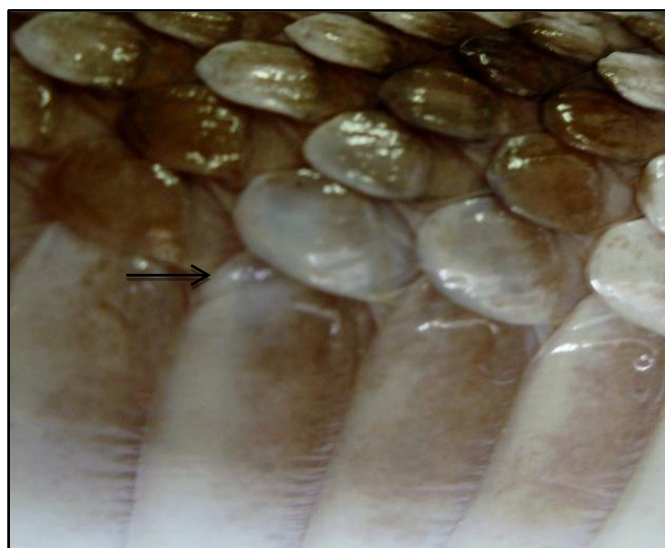


Figura 7: Lesão acrômica de aspecto leitoso da região ventral de *C. d. cascavella* (→).

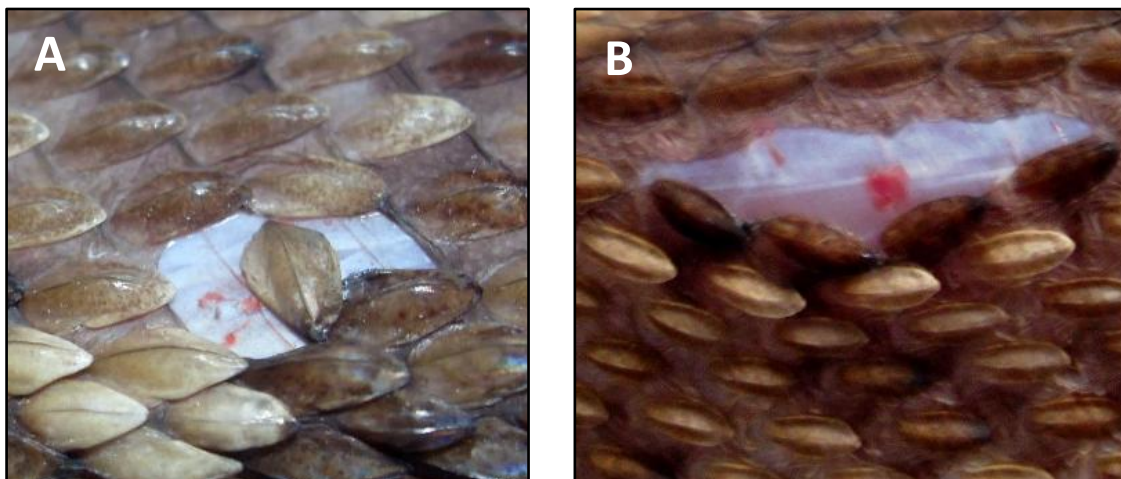


Figura 8: Ruptura da pele dos espécimes de RG 520 (A) e RG 479 (B) da subespécie *C. d. cascavella* do grupo sintomático.

Nos animais do grupo sintomático, com excessão dos RGs 479 e 520, que apresentavam apenas rupturas da pele, foi verificada grande variação no número de lesões por animal (1 a 19), na área total das lesões por animal (0,87 a 20,26 cm²) e na área lesionada em relação à área corpórea de cada indivíduo (0,04 % a 1,11%). Por outro lado, não foram observadas variações estatisticamente significantes entre a primeira e segunda coleta, em todos os parâmetros avaliados (Tabela 3).

Tabela 3: Biometria das áreas lesionadas da pele de *C. d. cascavella* do grupo sintomático em março (Col 1) e agosto (Col 2) de 2011

RG	Nº lesões		Área lesionada (cm ²)		Área total (cm ²)		Área lesionada (%)*	
	Col 1	Col 2	Col 1	Col 2	Col 1	Col 2	Col 1	Col 2
50	19	15	20,26	16,81	1821,99	1948,36	1,11	0,86
170	10	13	13,97	18,62	1606,14	1747,95	0,91	1,06
173	3	2	5,20	4,74	2126,74	2260,23	0,24	0,21
175	3	3	5,21	5,88	1479,45	1488,66	0,35	0,40
221	5	3	12,45	12,21	2127,19	2204,19	0,59	0,55
354	2	2	0,88	0,87	2261,66	2320,41	0,04	0,04
510	1	3	8,04	11,08	1264,27	1657,85	0,64	0,67
Média	6,14	5,85	9,43	10,03	1812,49	1946,8	0,55	0,54
± desvio	± 6,38	± 5,61	± 6,55	± 6,51	± 377,19	± 325,83	± 0,37	± 0,35

Col: coleta.

4.2. Estudo micológico da pele

Os resultados mostraram que dos seis animais do grupo controle, apenas três apresentaram estruturas fúngicas ao exame direto, com visualização de raros esporos e raros filamentos micelianos hialinos septados. Foi possível a identificação de esporos de *Curvularia sp.* para o animal de RG 568.

No grupo assintomático, dois dos três animais analisados apresentaram raros esporos no exame direto, contudo a cultura desse material não foi obtida com sucesso.

Para o grupo sintomático, cinco das oito cascaveis analisadas apresentaram estruturas fúngicas em parasitismo, com hifas hialinas, septadas, esporos, bem como células de leveduras.

As estruturas fúngicas constatadas em parasitismo no grupo sintomático diferem em desenvolvimento, quantidade e fixação às escamas quando comparadas aos resultados observados nos demais grupos, enfatizando a relevância destas estruturas no parasitismo. Os fungos isolados de escamas dos animais sintomático pertencem às leveduras e aos fungos filamentosos, entre estes *Aspergillus sp.* e outros gêneros.

4.3. Parâmetros bioquímicos

Os resultados dos parâmetros bioquímicos mostraram as concentrações de ALT, AST, CK, FA, glicose, colesterol, HDL, creatinina, ferro, amilase, sódio, potássio e cloreto não apresentaram diferenças significativas entre os animais dos grupos controle, assintomático e sintomático (Tabela 4).

Os níveis de albumina foram significativamente menores nos animais dos grupos assintomático e sintomático em relação aos controles. Os níveis de albumina dos animais do grupo sintomático também foram significativamente menores do que os apresentados pelo grupo assintomático. Por outro lado, a relação albumina/globulina foi significativamente maior tanto nos animais do grupo assintomático quanto sintomático em relação aos controles, sendo os valores dos animais do grupo sintomático significativamente menores do que o do grupo assintomático (Tabela 4).

Os níveis de proteínas totais e ácido úrico dos animais do grupo sintomático foram significativamente menores do que os identificados nos animais controles. Por outro lado, as concentrações de triglicerídeos e cálcio foram diferentes apenas entre os animais mantidos no serpentário 2, sendo ambas significativamente menores nos animais do grupo sintomático em relação aos do grupo assintomático (Tabela 4).

4.4. Parâmetros hematológicos

A contagem total de trombócitos (CTT) e de leucócitos (CTL) foram os únicos parâmetros hematológicos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados no presente estudo. Os animais do grupo controle apresentaram um maior número de leucócitos (CTL) e trombócitos (CTT) em relação aos grupos sintomáticos e assintomáticos. Além da diferença observada no grupo controle, a contagem total de leucócitos dos animais do grupo sintomático foi significativamente maior do que a contagem observada nas casvaveis do grupo assintomático. Os demais parâmetros hematológicos avaliados foram similares nos três grupos de estudo (Tabela 5).

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos do sangue de *Crotalus durissus cascavella* dos grupos controle, assintomático e sintomático

	Controle (n=7)	Assintomático (n=8)	Sintomático (n=9)
ALT (U/L)	4,29 ± 2,29 (7)	4,00 ± 2,00 (7)	3,78 ± 2,68 (9)
AST (U/L)	14,00 ± 12,60 (7)	22,43 ± 17,93 (7)	17,56 ± 14,77 (9)
CK (U/L)	153,29 ± 84,38 (7)	260,83 ± 222,08 (6)	208,22 ± 154,96 (9)
FA (U/L)	28,00 ± 12,50 (7)	18,13 ± 8,85 (8)	15,33 ± 11,41 (9)
Albumina (g/dL)	^a 1,09 ± 0,16 (5)	^{a,b} 0,65 ± 0,61 (4)	^b 0,83 ± 0,21 (8)
Globulina (g/dL)	^c 4,21 ± 0,16 (5)	3,79 ± 0,79 (4)	^c 3,22 ± 0,85 (8)
Albumina/ Globulina	^d 0,26 ± 0,03 (5)	^{d,e} 0,33 ± 0,03 (4)	^e 0,27 ± 0,03 (8)
PPT (g/dL)	^f 5,31 ± 1,11 (5)	4,69 ± 0,54 (5)	^f 3,97 ± 0,82 (9)
Glicose (mg/dL)	28,86 ± 8,32 (7)	28,63 ± 9,77 (8)	25,78 ± 8,39 (9)
Colesterol (mg/dL)	165,14 ± 108,70 (7)	189,57 ± 85,06 (7)	127,44 ± 58,25 (9)
HDL (mg/dL)	19,00 ± 9,87 (4)	18,83 ± 10,30 (6)	10,33 ± 2,88 (6)
Triglicerídeo (mg/dL)	25,60 ± 13,70 (5)	^g 38,25 ± 23,66 (8)	^g 17,78 ± 13,23 (8)
Ác. Úrico (mg/dL)	^h 2,82 ± 2,19 (7)	1,45 ± 0,53 (8)	^h 1,34 ± 1,05 (9)
Creatinina (mg/dL)	0,64 ± 0,24 (7)	0,62 ± 0,10 (8)	0,66 ± 0,40 (9)
Cálcio (mg/dL)	12,94 ± 1,50 (5)	ⁱ 14,29 ± 2,47 (5)	ⁱ 11,56 ± 1,77 (9)
Ferro (mg/dL)	59,20 ± 14,89 (5)	58,50 ± 18,72 (6)	49,11 ± 17,27 (9)
Amilase (U/L)	449,80 ± 59,72 (5)	426,17 ± 150,51 (6)	392,00 ± 122,68 (8)
Sódio (mEq/dL)	148,05 ± 7,42 (2)	157,91 ± 15,56 (8)	156,41 ± 20,82 (9)
Potássio (mEq/dL)	5,73 ± 0,68 (2)	5,92 ± 1,11 (8)	5,78 ± 1,21 (9)
Cloreto (mEq/dL)	107,25 ± 10,82 (2)	125,99 ± 16,20 (8)	137,26 ± 14,29 (9)

ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase ; CK: creatino quinase; FA: fosfatase alcalina; PPT: proteína plasmática total; HDL: lipoproteína de alta densidade; nd: não determinado por quantidade insuficiente de amostra. Os valores representam a média ± desvio padrão de cada grupo. Diferenças estatisticamente significantes: ^ap= 0,0466; ^bp= 0,0311; ^cp= 0,0169; ^dp= 0,0061; ^ep= 0,0149; ^fp= 0,0196; ^gp= 0,0335; ^hp= 0,0228; ⁱp= 0,0209

Tabela 5: Parâmetros hematológicos de *Crotalus durissus cascavella* dos grupos controle, assintomático e sintomático

Parâmetros Hematológicos	Controle (n=7)	Assintomático (n=8)	Sintomático (n=9)
CTE (10^3 cels/mm ³)	629,57 ± 94,52	459,25 ± 224,41	598,00 ± 234,82
CTL (10^3 cels/mm ³)	^{a,b} 14.435,36 ± 2.159,77	^{a,c} 6.804,06 ± 2004,39	^{b,c} 10677,22 ± 4672,92
HB (g/dL)	5,98 ± 1,34	6,83 ± 0,77	7,15 ± 2,89
Ht (%)	27,14 ± 2,85	25,75 ± 1,16	24,44 ± 3,21
VCM (fL)	439,10 ± 75,34	774,88 ± 551,36	491,77 ± 276,87
HCM (pg)	97,72 ± 27,51	203,94 ± 144,46	177,31 ± 227,04
CHCM (%)	22,13 ± 4,79	26,57 ± 3,11	29,78 ± 13,84
Linfócitos (%)	66,00 ± 16,40	76,13 ± 10,06	71,44 ± 15,26
Monócito (%)	0,29 ± 0,49	0,13 ± 0,35	0,11 ± 0,33
Azurófilos (%)	12,29 ± 5,31	10,88 ± 5,33	9,11 ± 3,44
Heterófilos (%)	20,00 ± 15,23	12,63 ± 12,14	18,89 ± 14,35
Eosinófilo (%)	0,00	0,00	0,00
Basófilos (%)	1,43 ± 0,98	0,38 ± 0,52	0,44 ± 0,73
CTT (10^3 cels/mm ³)	^{d,e} 16100,36 ± 3073,21	^d 7383,44 ± 3012,24	^e 9017,22 ± 5607,57

CTE: contagem total de eritrócitos; CTL: contagem total de leucócitos; HB: hemoglobina; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média; CTT: contagem total de trombócitos; Diferenças estatisticamente significantes: ^ap=0,0003; ^bp=0,0356; ^cp=0,0308; ^dp= 0,00009; ^ep= 0,0003

As diferenças morfológicas mais distintas entre as células dos animais dos três grupos estudados referem-se aos eritrócitos e trombócitos.

De uma forma geral, os eritrócitos maduros variaram pouco quanto ao seu formato, apresentando-se ovais e alongados. Para todos os grupos, foram observadas raras células com núcleo picnótico (Figura 9A), jovens (imaturos) (Figura 9B) e em divisão mitótica (Figura 9C).

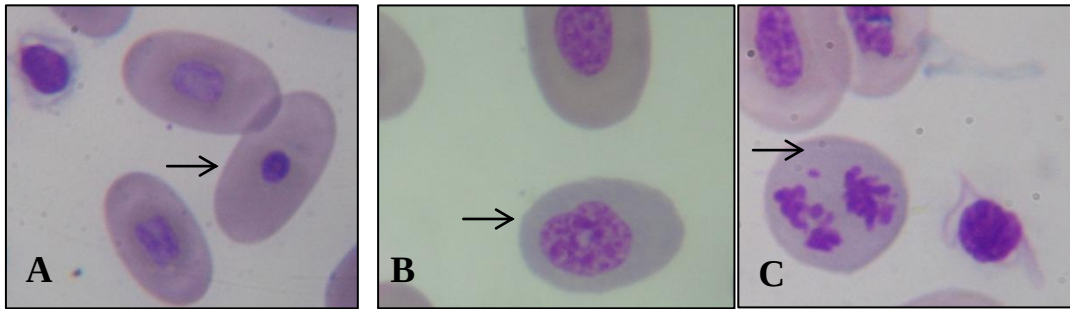


Figura 9: Fotomicrografias de células sangüíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). (A) Eritrócito com núcleo picnótico; (B) Eritrócito jovens; (C) Eritrócito com atividade mitótica.

Como característica marcante, foi observado pleomorfismo nuclear eritrocitário mais elevado no sangue dos animais do grupo sintomático, moderado nos assintomáticos e de moderado a leve nos controles. Dessa forma, os núcleos apresentavam-se de redondos a ovalados ao com formato ameboide (Figura 10).

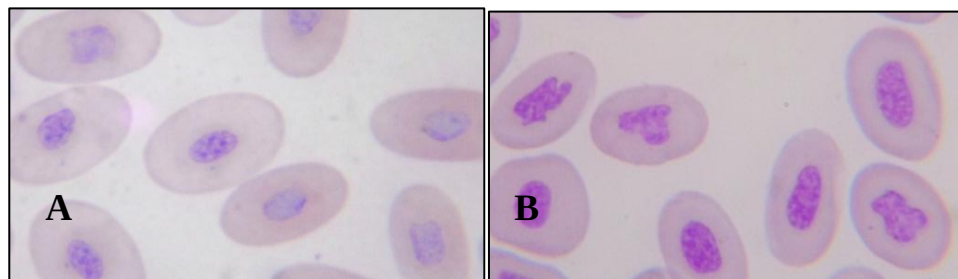


Figura 10: Fotomicrografias de células sangüíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). (A) Eritrócitos com núcleos ovalados; (B) Eritrócitos com núcleos ameboides.

Uma particularidade observada apenas em alguns animais do grupo assintomático foi a presença de “rouleaux” eritrocitário (Figura 11).

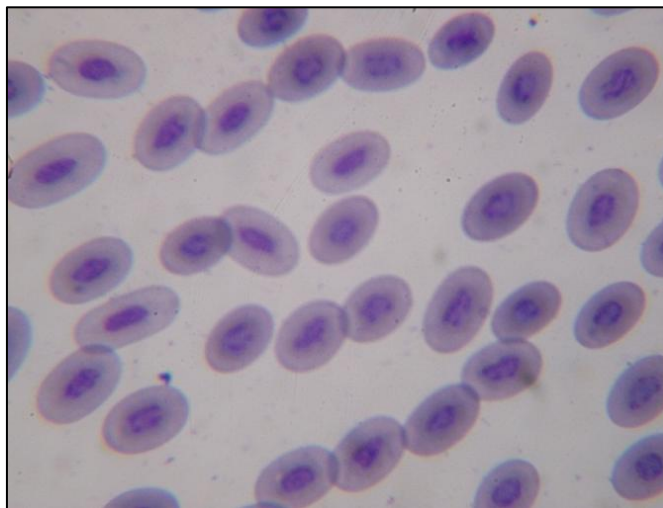


Figura 11: Fotomicrografias de células sangüíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). Eritrócitos em “rouleaux”.

Foi observada a presença de hematozoários intraeritrocíticos conhecidos como hemogregarinas em cinco cascaveis, sendo duas do grupo controle (RGs 568 e 562) e três do grupo sintomático (RGs 479, 510 e 520) (Figura 12). A identificação morfológica a nível de espécie sugere *Hepatozoon* sp. e/ou *Hemogregarina* sp para os achados observados, sendo necessário a confirmação através de biologia molecular.

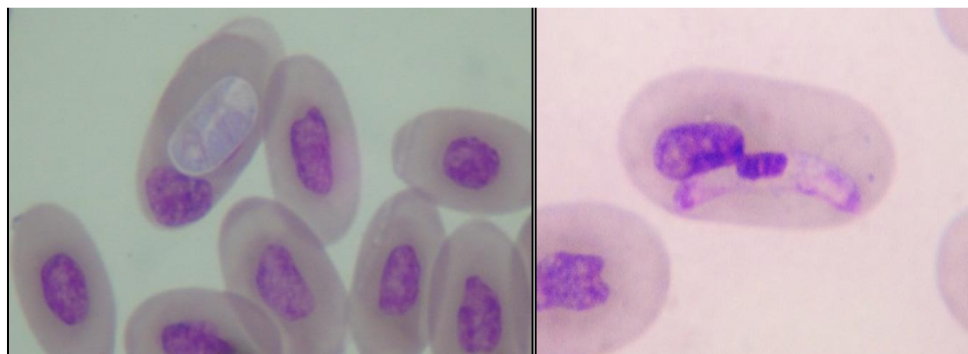


Figura 12: Fotomicrografias de células sangüíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). Eritrócitos parasitados por hemogregarinas.

Os trombócitos, em sua maioria, não se apresentaram íntegros e raramente possuíam formato elíptico. As formas morfológicas mais comuns foram a arredondada e a ameboide. Foram constatadas diversas alterações morfológicas com características de trombócitos ativados, como a presença de margens irregulares, perda do citoplasma e difícil visualização da membrana celular, citoplasma com material granular, polimorfia e agregados trombocitários (Figura 13). Tais alterações morfológicas foram mais marcantes no sangue dos animais do grupo sintomático, seguido dos assintomáticos e dos controles, de forma que os animais do grupo controle apresentaram trombócitos mais preservados, mesmo não apresentando normalidade morfológica.

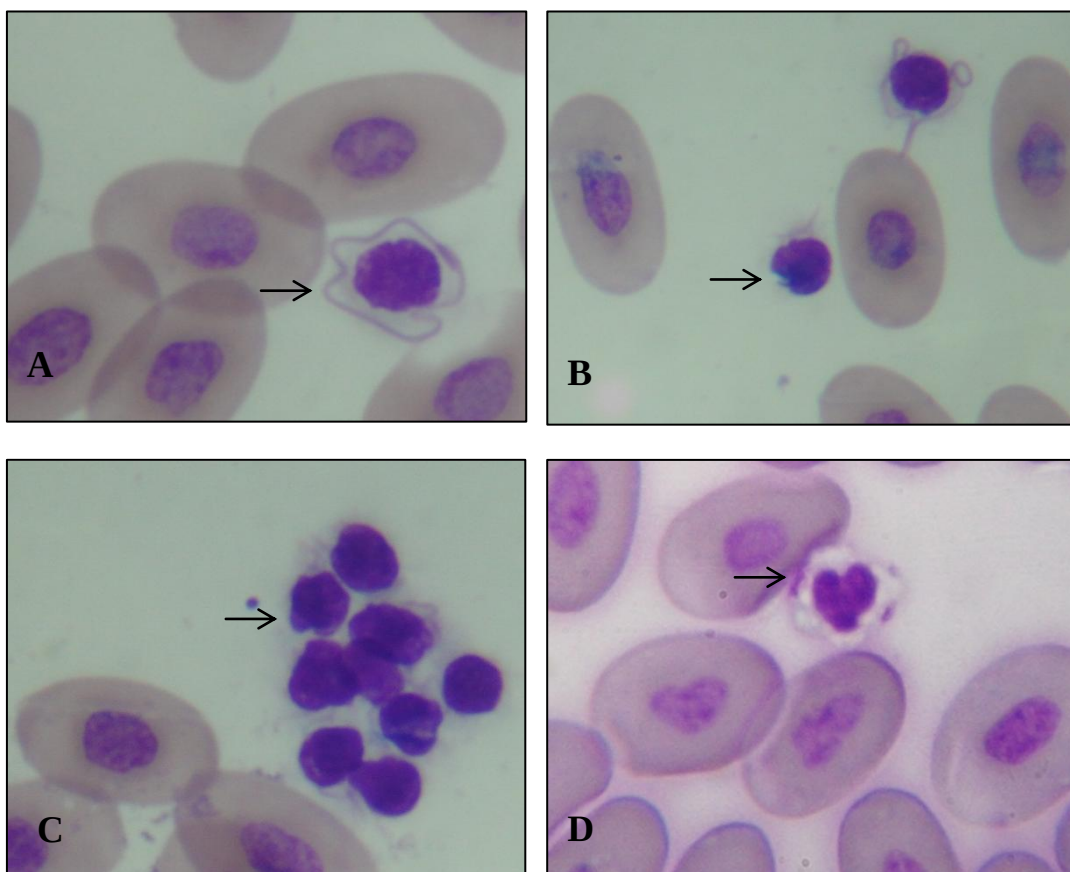


Figura 13: Fotomicrografias de células sangüíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). Trombócitos: (A) forma ameboide com citoplasma preservado; (B) margens irregulares e perda citoplasmática; (C) agregado trombocitário; (D) presença de material granular fino.

As células leucocitárias apresentaram alterações morfológicas semelhantes nos animais dos três grupos. De todas as células maduras da linhagem leucocitária, o eosinófilo foi a única que não foi observada no presente estudo e os basófilos e monócitos não apresentaram alterações morfológicas. Os azurófilos apenas variaram quanto a quantidade de vacúolos, mas tal variação se mostrou similar em todos os grupos (Figura 14).

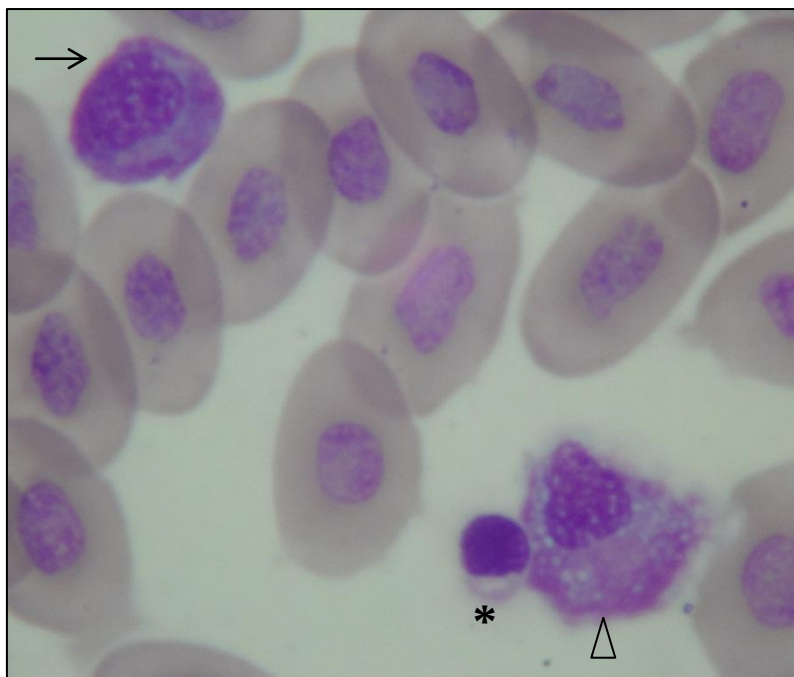


Figura 14: Fotomicrografias de células sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). (→) Azurófilos sem vacúolos, (Δ) Azurófilos com vacúolos, (*) Trombócito.

No sangue dos animais dos três grupos foram observados dois tipos heterófilos com morfologia normal: com citoplasma claro (ou degranulado) e contendo grânulos eosinofílicos (Figura 15).

De um modo geral, foi constatada a presença de heterófilos tóxicos nos animais de todos os grupos, apresentando grânulos anormais de coloração basofílica, heterófilos

fagocitando partículas, heterófilos degranulando e com lobulação do núcleo, sendo esta última alteração morfológica visível apenas no grupo sintomático (figura 16).

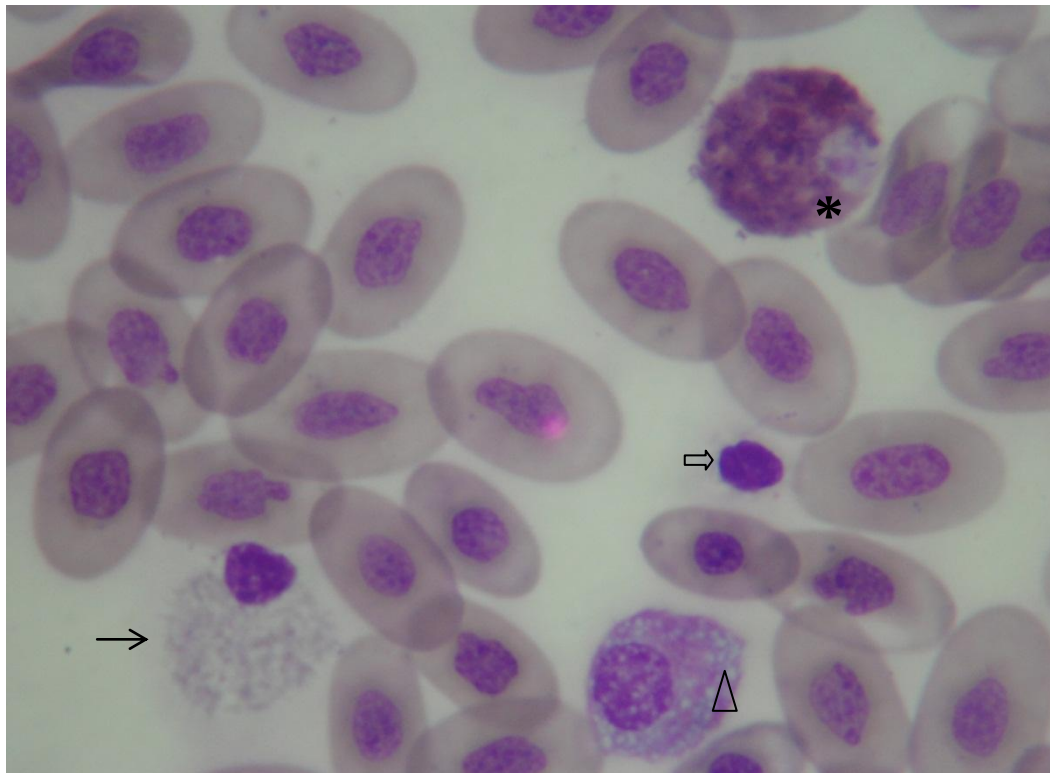


Figura 15: Fotomicrografias de células sangüíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). (→) Heterófilo com citoplasma claro; (*) Heterófilo com grânulos eosinofílicos; (Δ) Azurófilo com vacúolos; (⇨) Trombócito.

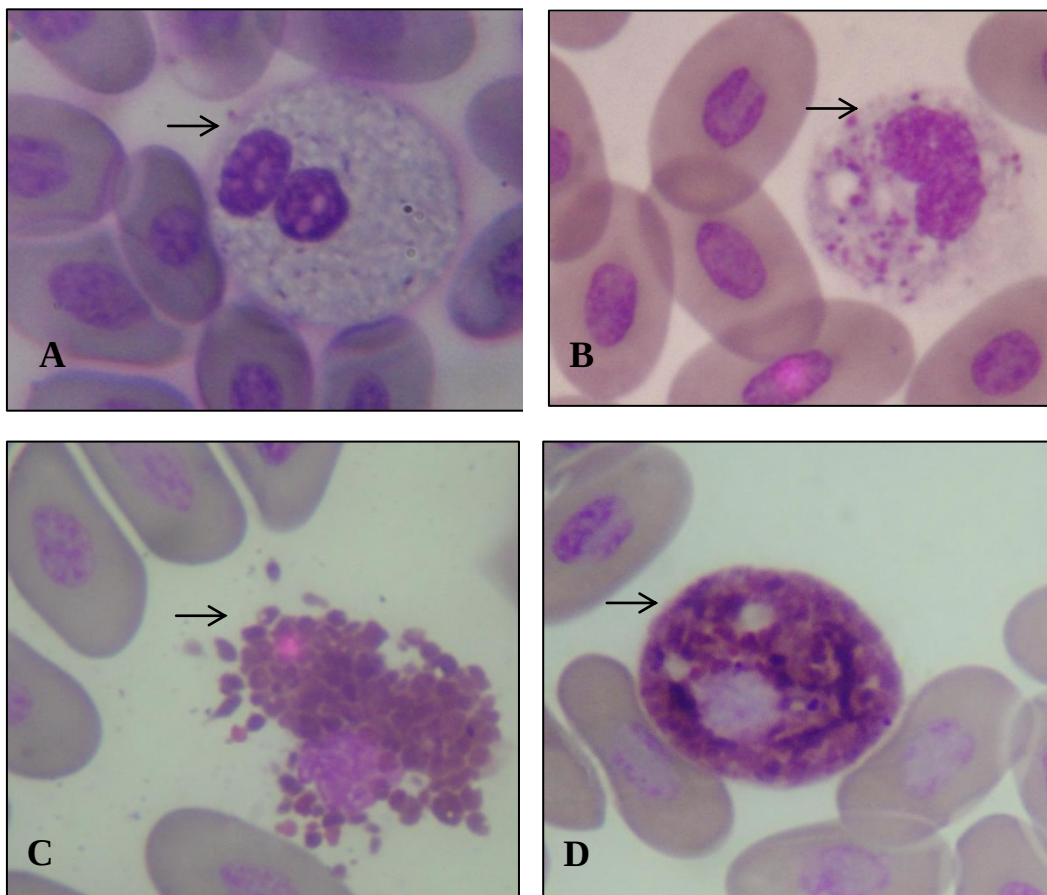


Figura 16: Fotomicrografias de células sangüíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). Heterófilo com citoplasma claro com núcleo lobulado; (B) Heterófilo fagocitando e com grânulos anormais basofílicos no citoplasma; (C) Heterófilo rompido evidenciando os tamanhos e formatos variados de seus grânulos; (D) heterófilo fagocitando.

Além da presença de linfócitos com estrutura morfollogicamente preservada, com forma arredondada, núcleo ocupando praticamente toda a célula e um citoplasma periférico, basófilo, em forma de meia lua; foi constatada a presença de linfócitos reativos no sangue dos animais dos três grupos. Estas células apresentaram alterações morfológicas como a presença de núcleo com cromatina menos densa, tanto em linfócitos pequenos e grandes, segmentação do núcleo e vacuolização citoplasmática. Os linfócitos apresentaram grande semelhança com os trombócitos devido à forma ameboide, a cromatina mais frouxa e a redução drástica do citoplasma apresentada por algumas células (Figura 17).

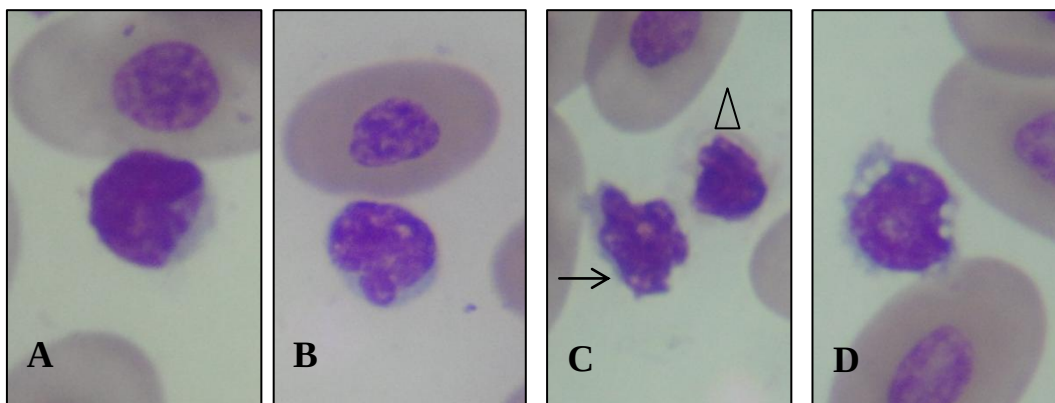


Figura 17: Fotomicrografias de células sangüíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947) (aumento 1000x). (A) Linfócito com estrutura morfológica preservada; (B) Linfócito com núcleo em segmentação (C) Semelhança entre linfócitos (→) e trombócitos (Δ) (D) linfócito com vacúolos.

5. DISCUSSÃO

Durante o tempo de estudo, o agente da acromia cutânea parece não ter interferido no crescimento e ganho de peso das cascavéis, de tal forma que os animais dos grupos sintomático e assintomático apresentaram desenvolvimento similar.

No entanto, foi observado que o grupo controle adquiriu uma porcentagem de peso significativamente menor quando comparada aos demais grupos. Tal constatação pode ser explicada pelo fato das cascavéis do grupo controle ainda não estarem adaptadas às condições do cativeiro, devido ao menor tempo no serpentário (tempo médio de 1,85 anos) em relação aos animais dos grupos assintomático (5 anos) e sintomático (9,2 anos). A síndrome de má adaptação ao cativeiro pode proporcionar inapetência, emagrecimento (mesmo com a alimentação normal da serpente), fragilidade dos tecidos e aumento da susceptibilidade à infecções por microorganismos, tanto patogênicos quanto os normalmente inócuos (BARBOSA, 2006).

Durante o período de quarentena houve perda de dois animais do plantel controle, que não foram incluídos neste estudo e o animal de RG 569 (controle) foi a óbito após a primeira coleta de dados, o que sugere que os esses animais estão sofrendo da síndrome de má adaptação ao cativeiro. Sabe-se que 80% dos animais com menos de dois anos de cativeiro vão a óbito devido às fragilidades apresentadas pelo estresse da má adaptação (BARBOSA, 2006).

O estudo macroscópico da pele de *C. d. cascavella* confirmou a presença de escamas acrômicas e hiperacrômicas, conforme descrito por Araújo em 2003 e 2006. Estudos histopatológicos da pele das cascaveis com acromia mostraram que as lesões apresentam destruição nuclear progressiva dos melanócitos com consequente diminuição ou ausência da produção de melanina, bem como o desaparecimento gradual da camada de cromatóforos (ARAÚJO, 2003).

O presente estudo mostrou dois novos padrões no desenvolvimento das lesões: escamas atrofiadas (consumidas) e epiderme com rupturas. Araújo (2003, 2006), ao analisar ultraestruturalmente as escamas acrômicas, observou que o agente etiológico provocou a destruição de todos os tipos celulares da epiderme e derme, inclusive as células do estrato germinativo. Estas células conservaram apenas as membranas plasmáticas, sem qualquer conteúdo citoplasmático, indicando que o prejuízo na pele das cascavéis não estava restrito somente a questão da coloração, mas atingiu também a

produção de todo seu complexo epidérmico. A progressão dessa condição patológica no período de 2006 a 2012, certamente, justifica as lesões observadas no presente estudo. A perda da integridade da membrana basal da camada epidérmica interna, com destruição parcial e total, antes observada apenas microscopicamente, pode explicar a presença de escamas atrofiadas e o rompimento da epiderme como evolução desse processo inicial de degradação celular. Essas lesões apresentaram cicatrização no período entre coletas (março e agosto), porém, a nova epiderme apresentava somente a epiderme fina, rica em alfa queratina e normalmente encontrada na região entre escamas (TONI & ALIBARDI, 2007). Essa região apresentou-se muito sensível, ocorrendo novamente a ruptura quando os manuseados.

Hipovitaminose C em boídeos (jibóias e pitons) causa sangramento gengival espontâneo e rompimento da membrana basal da derme e epiderme devido à deficiência na hidroxilação da prolina, envolvida na produção e função do colágeno (MEHLER & BENNETT, 2006; HERNANDEZ-DIVERS, 2006 apud PARANZINI, 2008). A hipovitaminose C pode não ser causada apenas pela dieta, uma vez que serpentes do gênero *Thamnophis* são capazes de produzir quantidades suficientes de vitamina C nos rins (MEHLER & BENNETT, 2006), levantando a suspeita que tal deficiência também pode estar associada a uma doença renal. Normalmente, níveis elevados de ácido úrico estão associados à presença de doença renal em répteis (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006).

A desnutrição também causa perturbação aguda das camadas epidérmica e dérmica da pele de jiboias e pitons, com ausência de sangramento gengival, (JACOBSON, 1991; FRYE, 1991 apud MEHLER & BENNETT, 2006; PATERSON, 2006).

O ganho de peso considerável, aliado aos baixos níveis de ácido úrico, a presença de lesões cutâneas e ausência de sangramentos tornam improváveis que a desnutrição, a hipovitaminose C ou doença renal sejam as possíveis causas da ruptura da pele das cascaveis analisadas nesse estudo.

Vale ressaltar que Araújo (2006) verificou a existência de inclusões intranucleares e intracitoplasmáticas de partículas indefinidas no interior dos queratinócitos, envolvidas por membranas semelhantes às capas protéicas que normalmente encapsulam colônias virais. Tendo em vista que os queratinócitos são as células mais numerosas da epiderme e as maiores responsáveis pela formação do

epitélio estratificado pavimentoso, sendo consideradas as células mais importantes para manter a integridade estrutural da epiderme (MONTAGNA & PARAKKAL, 1974 apud BOLLER, 2007), possivelmente, essas células estão sendo atingidas, o que pode estar provocando a atrofia das escamas e a ruptura da pele na região entre escamas.

O padrão preferencial de distribuição de lesões no corpo e no dorso dos animais também foi observado em estudos anteriores por Araújo (2003), mostrando que tal patologia ainda apresenta o mesmo padrão de distribuição. O fato das lesões estarem localizadas em várias regiões do corpo sugere que esta patologia seja sistêmica com disseminação por circulação sanguínea e/ou linfática (KAPLAN, 2002).

Foi possível constatar que, durante o período de estudo não houve aumento no número de serpentes acometidas pela acromia cutânea, em oposição à situação descrita por Araújo (2006), que observou uma duplicação no número de serpentes com acromia (7 para 14 animais), no período de julho 2003 a agosto de 2005. Na verdade, além de não ocorrer aumento do número de animais com acromia, as áreas totais lesionadas no corpo dos animais apresentaram-se menores quando comparadas aos estudos pioneiros de Araújo (2003, 2006).

Dessa forma, pode-se sugerir que desde o início do processo patológico, tal doença passou por uma fase exponencial de disseminação e progressão das lesões cutâneas acrômicas (fase aguda da doença) e agora se encontra na fase crônica.

Em 2006, Araújo analisou os animais de RG 50, 170, 173, 175, 221 e 354, que correspondem a 66,6% do plantel que compõe o grupo sintomático do presente estudo. Nesta época, os animais já estavam adaptados ao cativeiro há vários anos e apresentavam aumento exponencial das lesões cutâneas. A análise micológica da pele dessas cascaveis identificou *Aspergillus janus* somente quando as culturas da pele foram realizadas, porém, quando as amostras foram assepsiadas antes das coletas, as estruturas fúngicas não foram identificadas mesmo após a cultura, indicando que o fungo encontrado não estava no interior do tecido (ARAÚJO, 2006). Doenças fúngicas são patógenos secundários ou oportunistas comuns em répteis (ALLENDER et al., 2011).

Neste estudo foram identificadas estruturas fúngicas nos três grupos de estudo. Os animais do grupo sintomático mostraram um parasitismo mais desenvolvido do que os outros grupos, tanto no número de indivíduos que apresentaram estruturas fúngicas quanto na quantidade de estruturas identificadas. A presença de *Aspergillus* sp.,

Curvalaria sp. e leveduras já foi descrita para cascaveis e jiboias mantidas em cativeiro (COSTA et al., 2003; CAMPAGNER, 2011).

O excesso de umidade e temperatura pode promover a replicação e esporulação de fungos, de modo que a exposição a esporos fúngicos pode atingir uma magnitude que debilite o sistema imune do animal (PARÉ, 2006). Além da presença de patologias como a acromia cutânea, as próprias condições de manejo em cativeiro intensivo podem propiciar o aparecimento de fungos oportunistas (ALLENDER et al., 2011).

As médias da temperatura para os dois serpentários, onde as serpentes foram mantidas durante o período experimental, estiveram próximas às médias obtidas em estudos sobre a manutenção de *Crotalus durissus* em cativeiro (COSTA et al., 2006) (sempre acima de 20°C) e Campagner (2011) (entre 25 e 28°C). No entanto, as médias de umidade relativa para os serpentários da UFPE foram consideradas excessivas, apresentando-se superiores às recomendadas para espécie, isto é, em torno de 60% (COSTA et al., 2006). A alta umidade pode contribuir para o surgimento de infecções na pele, com a proliferação de fungos e bactérias (JACOBSON et al., 2000), situação constada nas serpentes dos dois recintos.

As análises bioquímicas fornecem informações importantes em relação ao estado clínico e metabólico do indivíduo, podendo ser utilizadas no auxílio ao diagnóstico, no acompanhamento clínico e no prognóstico de diversas moléstias que acometem os animais (GONZÁLEZ & SILVA, 2006; SILVA, 2010).

Os valores médios para glicose, colesterol, fosfatase alcalina, sódio, potássio e cloreto encontrados para os três grupos de estudo podem ser considerados normais em relação aos valores de referência para cascavéis das espécies *Crotalus atrox* (DESSAUER, 1970) e *Crotalus durissus* (TROIANO et al., 2001; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007; SILVA et al., 2010).

Embora não sejam descritos valores normais para concentração de ferro no sangue de cascavéis, todos os resultados obtidos nesse estudo apresentaram-se próximos ao limite inferior estimado para *Boiga irregularis* (LAMIRANDE et al., 1999). A concentração de amilase também é pouco estudada em cascavéis e só existem relatos que observaram grande variação e que não permitiram qualquer correlação com o estado de saúde dos animais (SILVA et al., 2010). Os valores de amilase encontrados nos três grupos analisados no presente estudo apresentaram-se dentro dos padrões quando comparados aos obtidos com anacondas (CALLE et al., 1994).

Os valores individuais de CK, ALT e AST dos animais dos três grupos avaliados foram compatíveis com os observados em cascavéis clinicamente saudáveis (TROIANO et al., 2001; KOLESNIKOVAS et al., 2001; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007; SILVA et al., 2010), mostrando que essas cascaveis parecem não apresentar disfunções relacionadas à lesões hepáticas e/ou musculares (ALMOSNY & MONTEIRO, 2007).

Os valores de albumina obtidos nos grupos analisados, de modo geral, encontram-se no intervalo dos valores esperados segundo Troiano et al. (2001), Rameh-de-Albuquerque (2007) e Silva et al. (2010).

Os níveis de proteínas plasmáticas totais e globulinas foram aumentados, acompanhados de uma baixa relação albumina/globulina em todos os grupos quando comparados aos valores normais disponíveis para cascaveis saudáveis (TROIANO et al., 2001; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007; SILVA et al., 2010).

Tendo em vista que a hiperproteinemia ocorre com desidratação, quadro excluído devido a valores normais do hematócrito, ou hiperglobulinemia associada a doenças inflamatórias crônicas (CAMPBELL, 1996; CAMPBELL, 2006; ALMOSNY & MONTEIRO, 2006); o quadro observado permite a constatação de que todas as cascaveis analisadas apresentam algum tipo de infecção e/ou inflamação, uma vez que a hiperglobulinemia é um achado comum em répteis com leucograma inflamatório (MITCHELL, 2006).

Os resultados da dosagem de albumina, globulina, relação entre ambas e proteína total mostraram diferenças significativas entre os grupos, que indicam que o grupo controle apresenta o quadro de infecção/inflamação mais relevante, provavelmente, devido ao estresse ao cativeiro.

A média dos valores de triglicerídeos do grupo assintomático apresentou um pouco elevada quando comparada com o grupo controle e com os valores de referência para cascaveis (SILVA, 2010). O aumento de triglicerídeos pode estar relacionado, fisiologicamente, a lipidose hepática (HERNANDEZ-DIVERS & COOPER, 2006), no entanto, tal patologia também induz elevação nos valores de AST, ALT e colesterol (SILVESTRE, 2003), parâmetros que foram consideradas normais nos animais do presente estudo, o que descarta essa possibilidade. Em répteis mantidos em cativeiro, a causa mais comum de valores elevados de triglicerídeos é um defeito metabólico no transporte dos lipídios ou na síntese de proteínas, resultando em obesidade causada por superalimentação (FRYE, 1981 apud SWIMMER, 2000), situação que também não

condiz com a apresentada, mostrando que a pequena elevação observada no presente estudo parece ser um parâmetro normal para estes animais.

Os níveis de cálcio, mesmo apresentando diferença significativas entre os dois grupos do serpentário 2, encontram-se próximos aos valores observados na literatura (KOLESNIKOVAS et al., 2001; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007; SILVA et al., 2010). Dessa forma, tanto as alterações dos níveis de triglicerídeos, bem como das concentrações plasmáticas de cálcio necessitam de maiores estudos e de um acompanhamento por indivíduo ao longo do tempo, a fim de esclarecer melhor essas alterações.

Os valores de ácido úrico dos animais do grupo controle apresentaram similaridade com os relatados para cascaveis saudáveis (RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007; SILVA et al., 2010). Os animais do grupo sintomático apresentam uma significativa redução dos níveis de ácido úrico em relação aos animais do grupo controle. Relatos de hipouricemia em répteis são quase inexistentes, no entanto, um estudo com anacondas de vida livre sugere que a diminuição de ácido úrico pode estar relacionada à hipofagia (CALLE, 1994). A redução de apetite e ingestão de alimento não justificam os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que os animais do grupo controle tiveram menor aumento de massa corpórea no período de estudo e média de ácido úrico superior aos demais grupos.

Por outro lado, a diminuição de ácido úrico também pode estar relacionada com infecções por microorganismos como *Aspergillus* sp. (LEGOUX et al., 1992; CHEVALET et al., 1993), através da produção da uricase. A uricase, também conhecida como urato oxidase, é uma enzima que possui ligações de cobre capazes de catalisar a oxidação do ácido úrico em alantoína, um produto altamente solúvel no túbulo renal (LEHNINGER et. al., 2000; CHU et al., 1996 apud PFRIMER, 2007). Alguns animais, como aves, répteis e peixes, conseguem realizar essa oxidação, produzindo alantoína que é 80 a 100 vezes mais solúvel que o ácido úrico, sendo facilmente excretada pelo rim, o que resulta em baixos níveis de ácido úrico no sangue (Busato, 2007; STRYER, 1992 apud PFRIMER, 2007). Uma vez que os animais dos grupos sintomático apresentaram maior infecção fúngica (com confirmação de *Aspergillus* sp.) do que os animais controles, a produção da uricase por esses microorganismos pode ter sido responsável pela diminuição de ácido úrico na concentração sanguínea desses animais.

Os exames hematológicos, tanto celulares quanto bioquímicos, são muito relevantes para conhecer as alterações patológicas dos animais, uma vez que as células sanguíneas são alteradas qualitativa ou quantitativamente devido a uma série de patologias (CAMPBELL, 2006).

Algumas serpentes dos grupos controle e sintomático apresentaram *Hepatozoon* sp. e/ou *Hemogregarina* sp. em suas hemácias, porém, diferentemente da elevada parasitemia observada em algumas serpentes em cativeiro (ALMOSNY & MONTEIRO, 2006), foram detectados poucos hemoparasitos por indivíduo. Dessa forma, tais protozoários, provavelmente, não estão interferindo na saúde das cascaveis analisadas no presente estudo.

Quanto à avaliação dos parâmetros relacionados às células da série vermelha (CTE, Hb, Ht, VCM, HCM e CHCM), foi observado que as cascaveis dos três grupos apresentaram valores compatíveis com os dados da literatura (RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, 2007; FREITA, 2003; NOGUEIRA, 2004; MOTTA, 2005). Por outro lado, os valores médios para a porcentagem das células leucocitárias nesses animais estão condizentes com os dados observados para *Crotalus durissus* saudáveis, com exceção dos heterófilos, que apresentaram contagens superiores aos descritos para cascavéis (RAMEH- DE- ALBUQUERQUE, 2007; FREITAS et al., 2003). Tais células são funcionalmente semelhantes aos neutrófilos de mamíferos e atuam na primeira linha de defesa dos organismos patogênicos (SMITH, 1994).

A heterofilia e a presença de heterófilos tóxicos nos três grupos de cascaveis analisadas indicam um processo inflamatório (TUCUNDUVA et al., 2001), que pode ser decorrente de infecção microbiana (SMITH, 1994; CAMPBELL, 2004, 2006; STACY et al., 2011), a qual também foi observada no presente estudo. A degranulação dos heterófilos pode estar relacionada às alterações tóxicas e a lobulação nuclear, encontrada em apenas um animal do grupo sintomático, pode ser considerada sugestiva de inflamação grave (CAMPBELL, 2006).

Além das alterações tóxicas observadas nos heterófilos, foram constatadas alterações morfológicas em diversas células sanguíneas que também corroboram com o diagnóstico de quadro infeccioso (SILVA, 2009). A presença de pleomorfismo nuclear eritrocitário, também verificado em doenças inflamatórias graves (CAMPBELL, 2006), de linfócitos reativos que aparecem frente a uma resposta antigênica (CAMPBELL, 2004; STRIK et al., 2007) e de trombócitos ativos, principalmente com núcleos

polimórficos, indicam um processo inflamatório e/ou infeccioso nos animais dos três grupos de cascaveis analisadas no presente estudo (HAWKEY & DENNETT, 1989 apud CAMPBEEL, 2006; STRIK et al., 2007).

No entanto, o pleomorfismo nuclear eritrocitário e o nível de ativação trombocitária apresentado pelo grupo sintomático foram significativamente maiores do que os identificados nos animais do grupo assintomático e ainda menores no grupo controle. Tais constatações podem sugerir um nível diferenciado de infecção nos três grupos, sendo o grupo sintomático mais afetado por apresentar lesões cutâneas, leucocitose, células morfológicamente mais ativas e maior nível de infecção fúngica, devido a uma maior depressão do sistema imune decorrente do desenvolvimento da patologia cutânea. Por outro lado, os animais do grupo assintomático, apesar de estarem bem adaptados ao cativeiro e não apresentarem qualquer sintomatologia cutânea, possuem alterações morfológicas das células sanguíneas e infecção por microorganismos de menor intensidade do que a identificada no sintomático, sugerindo que sejam portadores do agente da acromia cutânea e que apresente certo grau de imunodepressão que facilita a instalação de microorganismos.

As médias da contagem total de trombócitos (CTT) foram mais elevadas nos animais do grupo controle, apresentando valores um pouco acima dos encontrados na literatura (NOGUEIRA, 2004; MOTTA, 2005). No entanto, o número total de trombócitos varia muito entre os diversos estudos hematológicos com *Crotalus durissus* sp., tanto nas médias quanto nos desvios apresentados em cada trabalho. Dessa forma, como o valor de CTT observado nos animais do grupo controle encontra-se pouco elevado em relação à literatura, tal aumento pode ser considerado normal para essa subespécie. Por conseguinte, os valores inferiores apresentados pelos animais dos grupos assintomático e sintomático são sugestivos de trombocitopenia.

Em geral, condições patológicas com presença de endotoxinas podem causar lesões vasculares, que culminam com a alteração da homeostasia sanguínea. A interrupção do equilíbrio na produção de substâncias procoagulantes e anticoagulantes e a exposição do subendotélio, ativam os fatores tissulares da coagulação, fazendo com que se inicie a formação de coágulos com ativação trombocitária e do sistema fibrinolítico, o que aumenta a demanda trombocitária (Russell & Grindem, 2000). A trombocitopenia observada nos grupos assintomático e sintomático em relação aos animais do grupo controle pode ser decorrente da infecção microbianas em estágio mais

desenvolvido e da presença do agente da acromia cutânea causando elevado consumo trombocitário.

Portando, sugere-se que o agente da acromia cutânea induz a depressão do sistema imune dos animais dos dois grupos (assintomático e sintomático), possibilitando a instalação de microorganismos oportunistas. Especialmente nos animais que apresentam as lesões cutâneas, a imunodepressão possibilita um acentuado parasitismo fúngico, com consequente alteração bioquímica e das respostas celulares, especialmente morfológicas, compatíveis com um quadro infeccioso preponderantemente secundário.

6. CONCLUSÕES

- O agente da acromia cutânea não alterou o crescimento nem o ganho de peso das serpentes *C. d. cascavella* mantidas em cativeiro durante o período de estudo.
- O agente da acromia cutânea, no período avaliado, não induziu a progressão das áreas lesionadas, sugerindo que o mesmo encontra-se na fase crônica, porém causou lesões de ruptura da pele e consumo das escamas, descritas pela primeira vez nas serpentes *C. d. cascavella*.
- O agente da acromia cutânea leva a imunodepressão das serpentes *C. d. cascavella* mantidas em cativeiro, em maior intensidade nos animais sintomáticos do que nos assintomáticos, facilitando a infecção secundária por fungos oportunistas e sendo mais expressiva nos animais que apresentam lesões cutâneas.
- As serpentes *C. d. cascavella* portadoras do agente da acromia cutânea apresentam alterações bioquímicas e celulares, especialmente morfológicas, mais acentuadas nos animais sintomáticos do que nos assintomáticos, compatíveis com um quadro infeccioso decorrente do somatório da resposta primária ao agente da acromia e, principalmente, pela infecção secundária por microorganismos oportunistas.
- O estresse provocado pelo cativeiro (síndrome da má adaptação) foi o reponsável pelo pequeno ganho de peso dos animais que não tem contato com o agente etiológico da acromia cutânea, bem como pela baixa resistência a infecção por fungos.
- As serpentes *C. d. cascavella* não portadoras do agente da acromia cutânea apresentam alterações bioquímicas e celulares, especialmente morfológicas, decorrente do estresse ao cativeiro, menos acentuadas do que as identificadas nos animais portadores do agente da acromia e compatíveis com um quadro infeccioso devido à infecção por fungos oportunistas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDER, M.C.; DRESLIK, M; WYLIE, S.; PHILLIPS, C.; WYLIE, D.B.; MADDOX, C.; DELANEY, M.A.; KINSEL, M.J. *Chrysosporium* sp. Infection in Eastern Massasauga Rattlesnakes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 2383-2384, 2011.

ACKERMAN, L. **The Biology, Husbandry and Health Care of Reptiles**. Neptune City- USA: T.F.H. Publications, Inc. III. 2003.

ALLEMAN, A.R., JACOBSON, E.R., RASKIN, R.E. Morphologic, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). **Am. J. Vet. Res.**, v. 60, n. 4, p.507-514, 1999.

ALMOSNY, N.R.P. & MONTEIRO, A.M. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. S.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006. p. 939-966.

ALMOSNY, N.R.P. Patologia Clínica Invertebrados Ectotérmicos. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L (Eds). **Medicina Veterinária de Animais Selvagens**, São Paulo: Roca, in press.

ALMOSNY, N.R.P. & SANTOS, L. C. Laboratory in wild animals. In: FOWLER, M. **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. Editora Iowa State University, 2000. p. 500-505.

AQUINO, W.K. **Epidemiologia e clínica dos acidentes ofídicos no estado de Pernambuco**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1999.

ARAÚJO, L.S.A. **Acromia cutânea em serpentes *Crotalus durissus cascavella* mantidas em cativeiro**. Recife:Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

ARAÚJO, L.S.A. **Estudo macroscópico e histopatológico cutâneo de *Crotalus durissus cascavella* (Serpentes, Viperidae, Cascavel) mantidas em cativeiro**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

ARIKAN, H., GÖÇMEN, B., ATATÜR, M.K., KUMLUTAŞ, Y., ÇİÇEK, K. Morphology of peripheral blood cells from various Turkish snakes. *North-Western Journal of Zoology*, v. 5, n. 1, p. 61-73, 2009.

AZOFEIFA-CORDERO, G.; ARCE-ESTRADA, V.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A. Immunization with cDNA of a novel P-III type metalloproteinase from the rattlesnake *Crotalus durissus durissus* elicits antibodies which neutralize 69% of the hemorrhage induced by the whole venom. **Toxicon**, v.52, n. 2, p.302-308, 2008

BARNARD, S. M. **Reptile Keeper's Handbook**. Florida: Krieger Publishing Company, 1996.

BEGHINI, D. G.; DAMICO,D. C. S.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DELATORRE, M. C.;HYSLOP, S.; MARANGONI, S. Ability of rabbit antiserum against crotapotin to neutralize the neurotoxic, myotoxic and phospholipase A2 activities of crotoxin from *Crotalus durissus cascavella* snake venom. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 22, n. 1, p. 240-248, 2008.

BÉRNILS, R. S. & H. C. COSTA (org.). 2011. **Brazilian reptiles – List of species**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2012.

BONGAERTS, G. P. A. & VOGELS, G. D. Uric acid degradation by *Bacillus fastidiosus* strains. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 2, p. 689-697, 1976.

BOUNOUS, D.I.; DOTSON, T. K.; BROOKS JR., R. L.; RAMSAY, E. C. Cytochemical staining and ultrastructural characteristics of peripheral blood leucocytes from the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). **Comparative Haematology International**, v. 6, n. 2, p. 86-91, 1996.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica**. Boletim eletrônico epidemiológico, 2010.

BRAUN, J.P. & LEFEBVRE, H.P. Kidney Function and Damage. Clinical biochemistry of domestic animals. In: KANEKO, J.J.; HAENEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008. Cap. 16, p 485-527.

BOLLER, S. Atividade antiinflamatória tópica do extrato e compostos isolados da *Baccharis illinita* DC, (Asteraceae) em camundongos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007. 110 p.

BUSATO, O. 2007. **Ácido úrico. ABC Saúde.** Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?7>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

BUSH, M. & SMELLER, J. Blood collection and injection techniques in snakes. **Vet. Med/Small Anim. Pract.**, v. 73, p. 211-214, 1978.

CALLE, P. P.; RIVAS, J. R.; MUÑOZ, M.; THORBJARNARSON, J.; DIERENFELD, E. S.; HOLMSTROM, W.; BRASELTON, E.; KARESH, W. B. Health assessment of free-ranging anacondas (*Eunectes murinus*) in Venezuela. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 25, n. 1, p. 53-62, 1994.

CAMPAGNER, M.V. Manejo de serpentes em cativeiro: manejo clínico-sanitário e avaliação da microbiota. Botucatu: UNESP, 2011. 196 p.

CAMPBELL, J.A. & W.W. LAMAR. **The Venomous Reptiles of Latin America.** Comstock, Ithaca & London, 1989.

CAMPBELL, T. W. Clinical pathology of reptiles. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery.** 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. cap. 28, p. 453-470.

CAMPBELL, T.W. Hematology of reptile. In: THRALL, M.A; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.B.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. (Eds). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.** Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2004. p.259-276.

CARLSON, G.P. Fluid, electrolyte, and acid-base balance. In: KANEKO, J.J.; HAENEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. London: Academic, 2008. p.529-559.

CHEATWOOD, J.L. **An outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a wild population of pigmy rattlesnake, *Sistrurus miliarius barbouri* in Florida: description, factors, cyclicity, and prevention**. Florida: University of Florida, 2000

CHEVALET, L.; TIRABY, G.; CABANE, B.; LOISON, G. Genetic improvements of an industrial strain of *Aspergillus flavus* for urate oxidase production. **Journal of Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 239-247, 1993.

COBORN, J. **The Atlas of Snakes of the World**. Neptune City: T.F.H. Publications, Inc, 1991.

COLES, E. H. **Veterinary Clinical Pathology**. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. 486 p.

COSTA, A. C. B. P., TEODORO, G. R., OLIVEIRA, F. E., PEREIRA, C. A., & CROSARIOL, S. K. Levantamento de fungos filamentosos presentes em escamas de *Crotallus durissus terrificus* criadas em cativeiro. **Anais...X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação - Universidade do Vale do Paraiba**, p. 2249-2252, 2003.

COOPER, J.E. Dermatology. In: MADER, D.R.; SAUNDERS, W.B. (Eds). **Reptile Medicine and Surgery**, Second edition. Philadelphia: Saunders, 2006, cap 15, p. 196-216.

CORNSNAKE. Disponível <<http://www.cornsnakes.com/forums/...php?t=5470>>
Acesso em 24 nov. 2005

CUBAS, Z. S. Cuidados veterinários com Répteis em Cativeiro. In FRANCISCO, L. R. **Répteis do Brasil, manutenção em cativeiro**. 1. Ed.: Gráfica e Editora Amaro Ltda, 1997. p. 49 – 65.

CUSTER, R. & BUSH, M. Physiologic and acid base measures of gopher snake during ketamine or halothan-nitrous oxide anesthesia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.177, p.870-874, 1980.

DAL BELO, C.A.; COLARES, A.V.; LEITE, G.B.; TICLI, F.K.; SAMPAIO, S.V.; CINTRA, A.C.O.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; DOS SANTOS, M.G. Antineurotoxic activity of *Galactia glaucescens* against *Crotalus durissus terrificus* venom. **Fitoterapia**, v. 79, n. 5, p. 378-380, 2008.

DE HOOG, G.S. et al. **Atlas of clinical fungi**. Utrech: Central bureau voor schimmelcultures, 2000. 1126p

DESSAUER, H.C. Blood Chemistry of Reptiles: Physiological and Evolutionary Aspects. In: GANS, C. (Ed). **Biology of Reptilia – Morphology**. New York: Academic Press, 1970. p. 1-72.

DIAZ-FIGUEROA, O & MITCHELL, M.A. Gastrointestinal Anatomy and Physiology. In: MADER, D.R.; SAUNDERS, W.B. (Eds). **Reptile Medicine and Surgery**, Second edition. Philadelphia: Saunders, 2006. Cap. 12, p. 145-162.

DOS-SANTOS, M.C., ARROYO, C., SOLANO, S., HERRERA, M., VILLALTA, M., SEGURA, A., ESTRADA, R., GUTIÉRREZ, J.M., LEÓN, G. Comparison of the effect of *Crotalus simus* and *Crotalus durissus ruruima* venoms on the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom: Implications for the production of polyspecific snake antivenoms. **Toxicon**, v. 57, n. 2, p. 237-43, 2011.

DOTSON, T. K.; RAMSAY, E. C.; BOUNOUS, D. I. A color atlas of blood cells of the yellow rat snake. **The Compendium on Continuing Education Practice Veterinary**, v. 17, n. 8, p. 1013-1016, 1995.

DUGUY, R. Number of blood cells and their variation. In: GANS, C.; PARSONS, T. S. **Biology of Reptilia**. London: Academic Press, 1970. v. 3, p. 93-109.

EGAMI, M. & SASSO, W S. Cytochemical observations of blood cells of *Bothrops jararaca* (Reptilia, Squamata). **Rev. Bral BioI.**, v. 48, n. 2, p. 155-159, 1988.

FELDMAN, B. E; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

FILHO, G.B.; PITELLA, J.E.H.; PEREIRA, F.E.L.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, A.J.A. BOGLIOLO. **Patologia**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1994.

FITZGERALD, K.T. & VERA R. Dysecdysis. In: MADER, D.R.; SAUNDERS, W.B. (Eds). **Reptile Medicine and Surgery**, Second edition. Philadelphia: Saunders, 2006. Cap. 52, p. 778-786.

FONTEQUE, J. H., KOHAYAGAWA, A., TAKAHIRA, R. K., BIANCHI, E. H., CHERUBINI, A. L., PICCININ, A., BRUDER, E. M., ET AL. Perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 457-460, 2009.

FRANCISCO, L.R., GREGO, K.F., MAS, M. Biology and keeping south american snakes in captivity. In: FOWLER, M.E.; CUBA, Z.S. (Editors). **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. Philadelphia; Saunders Co.; 2001. p.40-50.

FRANCO, F.L. Origem e Diversidade das Serpentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, M.S.; HADDAD Jr. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica**. 2ed. São Paulo: Sarvier, 2009. p.22-41.

FREITAS, G.; GREGO, K.F.; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L.C.; ZACARIOTTI, R.L. Hematological reference intervals of recently-caught free-ranging South American rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*, LAURENTI, 1768). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 60, p. 188, 2003..

GARCIA-NAVARRO, K. C. E. & PACHALY, J. R. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo: Varela, 1994.

GOULART, C. E. S. **Herpetologia, herpecultura e medicina de répteis**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2004.

GREGO, K.F.; ALBUQUERQUE, L.C.R.; BETKOWSKY, S.E.; SANT'ANNA, S.S.; FERNANDES, W.; STERMAN, FA. Relato de caso: luxação em cascavel (*Crotalus*

durissus terrificus) por contenção inadequada. In: IV REUNIÃO CIENTÍFICA ANUAL DO INSTITUTO BUTANTAN, 2002, São Paulo. **Anais...**São Paulo: Instituto Butantan, 2002. p. 188.

GREGO, K. F.; ALVES, J. A. S.; RAMEH, A. L. C.; FERNANDES, W. Referências hematológicas para jararaca de rabo branco (*Bothrops leucurus*) recém-capturadas da natureza. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v. 58, n.6, p. 1249, 2006.

GREGO, K.F.; FRANCISCO, L.R.; MARGARITA, M.A.S. Class Reptilia, Order Squamata (Ophidia): Snakes. In: MURRAY, E. FOWLER; Z.; CUBAS, S. (Org.). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. 1 ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. cap. 1, p. 40-50.

GRIEGER, T.A. & KLUGER, M.J. Fever and survival: the role of serum iron. **J. Physiol.**, v. 279, p. 187–196, 1978.

GUARNIERI, M.C. Comunicação pessoal. 2012

HARVEY, J.W. Iron Metabolism and Its Disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds). **Biochemistry of domestic animals**, 6a Edition, London: Elsevier Academic Press, 2008. Cap.9.

HAWKEY, C.M., DENNETT, T.B. Hematology of Reptiles. In: **Comparative Veterinary Haematology**. London: Wolfe Publishing Limited, 1989. p. 259 – 275

HERNANDEZ-DIVERS, S.J. & COOPER, J.E: Hepatic lipidosis. In: MADER, D.R.; SAUNDERS, W.B. (Eds). **Reptile Medicine and Surgery**, Second edition. Philadelphia: Saunders, 2006, cap 56, p. 805-813.

HICKMAN, C. P. JR.; ROBERTS, L.S.; LARSON, L. **Princípios integrados de Zoologia**. Rio de Janeiro: Guanabara. 2001.

HOFFMANN, W.E. & SOLTER, P.F. Diagnostic Enzymology of Domestic Animals In: KANEKO, J.J.; HAENEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.th ed, San Diego: Academic Press, 2008. Cap 12, p. 351-378.

HOGUE, A. R.; ROMANO-HOGES, S. A. R. W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Mem. Ins. Butantan**, v.42/43, p.373-496, 1978/79.

HOLZ, P. Renal Anatomy and Physiology. In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. 2006. chapter 11, p 134-144.

HUCHZERMEYER, F. W. Disease of farmed crocodiles and ostriches. **Ver.sci.trch.Off.int.Epiz**, v. 21, n. 2, p. 265 – 276, 2002.

IHLE, R. N.; SCHUETT, G. W.; HUGHES, K. A. Salmon: A New Autosomal Mutation demonstrating Incomplete Dominance in the Boinae Snake *Boa constrictor*. Brief Communication. **The Journal of Heredity**, v.. 91, n. 3, p. 254 – 256, 2000.

JACOBSON, E.R. Biology and Diseases of Reptiles. In.: FOX, J.G.; COHEN, B.J.; LOEW, F.M. (Ed.). **Laboratory Animal Medicine**. New York: Academic Press Inc, 1984. p. 449-476.

JACOBSON, E.R; CHEATWOOD, J. L.; MAXWELL, L. K. Mycotic diseases of reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, p.94–101, 2000.

JACOBSON, E.R. Disease of the integumentary system of reptiles. In: NESBITT, G.H & ACKERMAN, L.L (Eds). **Dermatology for Small Animal Practitioner**. Trenton, NJ: Veterinary Learning Systems Co. Inc., 1991. p. 225–239.

JACOBSON, E.R.; FERRIS, W.; BAGNARA, J. T.; IVERSON W.O.; Chromatophoromas in a Pine Snake. **Pigment Cell Research**, v..2, p. 26 – 33, 1989

JACOBSON, E. R. Implications of Infectious Disease for Captive Propagation and Introduction Programs of Threatened/Endangered Reptiles. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, n. 4, p. 245 - 255, 1993.

JACOBSON, E.R. **Infectious Diseases of Reptiles**. 2004. Disponível <<http://iacuc.ufl.edu/OLD%20Web%20Site/infectiousdis.htm> > Acesso em 21. Fev. 2005.

JACOBSON, E. R. Overview of reptile biology, anatomy and histology. In: JACOBSON, E.R. (Ed). **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles**. CRC Press. 2007. p. 1-130.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994.
 medicine and surgery. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. cap. 28, p. 453-470.

KAPLAN, M. **Reptile Skin Basis. Herp Care Collection**, 2003. Disponível <
<http://www.wingsnake.com/snakegettrs/dermo/vet/links.html-10K>>. em 07. Ago. 2011

KIK, M.J.L & MITCHELL, M.A. Reptile Cardiology: A Review of Anatomy and Physiology, Diagnostic Approaches, and Clinical Disease. **Topics in Medicine and Surgery: Seminars in avian and exotic pet medicine**, v. 14, n.1, p. 52–60, 2005.

KNOTKOVÁ, Z; DOUBEK, J; KNOTEK, Z; HAJKOVÁ, P. Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agronomys horsfieldi*). **Acta Vet. Brno**. v. 71, n. 2, p. 191-192, 2002;

KOLESNIKOVAS, C. K. M.; DIAS, J. L. C.; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L. C.; GREGO, K. F. Biochemical blood profile of Brazilian Viperidae snakes kept in captivity. **Memórias do Instituto Butantan**, v.59, p. 141-142. 2001.

KONNO, K.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; BRIGATTE, P.; ZAMBELLI, V.O.; CAMARGO, A.C.; CURY, Y.. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p.1293-1304, 2008.

LACAZ, C.S. et al. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p

LAMIRANDE, E. W.; BRATTHAUER, A. D.; FISCHER, D. C.; NICHOLS, D. K. Reference hematologic and plasma chemistry values of brown tree snakes (*Boiga irregularis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 4, p. 516-520, 1999.

LEGOUX, R.; DELPECH, B.; DUMONT, X.; GUILLEMOT, J. C.; RAMOND, P.; SHIRE, D.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; LOISON, G. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *Aspergillus flavus* urate oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 12, p. 8565-8570, 1992.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000.

LILLYWHITE, H. B., ACKERMAN, R. A.; PALACIOS, L.. Cardiorespiratory responses of snakes to experimental hemorrhage. **Journal of Comparative Physiology**, v.152, p.59-65, 1983.

LILLYWHITE, H. B. & SMITS, A. W. Viability of blood volume in snakes and its relation to activity and hypertension. **Journal of Experimental Biology**, v. 110, p. 267-274, 1984.

LIRA-DA-SILVA, R. M., MISE, Y. F., CASAIS-E-SILVA, L. L., ULLOA, J., HAMDAN, B., & BRAZIL, T. K. Serpentes de Importância Médica do Nordeste do Brasil. **Gaz. méd. Bahia**, v. 79, n. 1, p. 7-20, 2009.

LOPES, S. T. A., BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**, 3rd ed. Santa Maria: UFMS/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107 p.

MADER, D.R. & RUDLOFF, E. Emergency and critical care. In: MADER, D.R. (Ed), **Reptile Medicine and Surgery**, Second Edition. St. Louis, Missouri: W.B. Saunders Company, 2006. chapter 31, p. 533-548.

MARQUES, O.A.V. & SAZIMA, I. História Natural das Serpentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, M.S.; HADDAD Jr. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica**. 1ed. São Paulo: Sarvier, 2009.

MARQUES, O.A.V. A fauna de répteis na região de Paranapiacaba. In: Lopes, M.I.M.S.; Kirizawa, K.; Melo, M.M.R.F (Org). **Patrimônio da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba – a antiga Estação Biológica do Alto da Serra**, São Paulo: Editora Neotropica, 2009. p.607-620.

MARTÍNEZ-SILVESTRE, C.; LAVÍN, S.; CUENCA, R. Hematología y citología sanguínea en reptiles. **Clin. Vet. Peq. Anim**, v. 31, n. 3, p. 131-141, 2011.

MEHLER, S.J. & BENNETT, M.A. Neurology. In: MADER, D.R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. cap. 17, p. 238- 250

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes..** 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 42-70.

MITCHELL, M.A. Therapeutics. In: MADER, D.R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. cap. 36, p. 631-664.

MOTTA, R. O. C. **Perfil hematológico de serpentes *Crotalus durissus Linnaeus*, 1758 (Viperidae) e parasitismo por Hepatozoon (Apicomplexa, Hepatozoide) no Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte:UFMG, 2005.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações. Enzimas**, 2003. p. 90-120.

MURRAY, M.J Cardiopulmonary anatomy and physiology. In: MADER, D.R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. cap 10, p. 123-134

NAVARRE, B.J. Common Procedures in Reptiles and Amphibians. **Vet Clin North Am Exot Anim Pract.**, v.9, n. 2, p. 237-67, 2006..

NOGUEIRA, M. F. **Estudo de Paramyxovirus, Mycoplasma e de Bacilos Gram-Negativos no Trato Respiratório de Serpentes *Crotalus durissus terrificus*.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2004.

NUDEL, B.C.; PERDOMÉNICO, C.; IÁCONO, R.; CASCON, O. Optimization by factorial analysis of caprylic acid precipitation of non-immunoglobulins from hyperimmune equine plasma for antivenom preparation. **Toxicon**, v. 59, n 1, p. 68-73, 2012.

OLIVEIRA R.C., WEM, F.A., SIFUENTES, D. N.; In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. (Eds.). **Animais**

Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 6-21.

OLIVEIRA, M.M.V. Serpentes Venenosas. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, n. 28, 1999.

ORIGGI, F.O. Reptile Immunology. In: JACOBSON, E.R. (Ed) **Infection diseases and pathology of reptiles**, CRC Press, 2007. Ch 2, p. 131-166.

ORR, T.R. **Biologia dos Vertebrados**. 5.ed. São Paulo: Editora Roca., 1986. 508p.

PARÉ, J.A; SIGLER, L.; ROSENTHAL, K.L.; MADER, D.R. Microbiology: fungal and bacterial diseases of reptiles In: MADER, D. R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. ch 16.

PATERSON, S. Skin Diseases and Treatment of Snakes. In: PATERSON, S. (Ed). **Skin Diseases of Exotic Pets**, Blackwell Science Ltda, 2006. Ch 8.

PFRIMER, P. **Expressão de uricase de *Bacillus subtilis* em *Escherichia coli***. Brasília: Universidade de Brasília, 2007.

PINHO, M.S.S.P. **Levantamento dos Acidentes Ofídicos Ocorridos em Recife (PE) e das Serpentes Encontradas nas Indústrias da Br-101**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

POUGH, F.H. **A Vida dos Vertebrados**. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L. C. **Aspectos hematológicos, bioquímicos, morfológicos e citoquímicos de células sangüíneas em Viperídeos neotropicais dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* mantidos em cativeiro**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007.

RASKIN, R.E. Reptilian Complete Blood Count. In: FUDGE, A.M. (ed.), **Laboratory Medicine – Avian and Exotic Pets**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. p.193-204.

RODOVALHO, M.C.; CASTRO, C., SANTANA-NETO, P.L., GUARNIERI, M. C. Geographic Expansion of Rattlesnakes and Crotalic Accidents at the Forest Zone in Pernambuco State, Brazil. In: XVI WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY/X CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXINOLOGIA, 2009, Recife. **Anais...** v.1. p.212-1, 2009.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 315-328, 1947.

ROVIRA, A.R.I Hematology of Reptiles. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J..(Eds) **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th edition, Blackwell Publishing Ltd., 2010. Ch 127, p. 1002-10012.

RUSSELL, K.E. & GRINDEM, C.B. Secondary thrombocytopenia. In: FELDMAN B.F., ZINKL J.G. & JAIN N.C. (Eds). **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott:Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000. p.487- 495.

RUSSEL, K.E. Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. In: WEISS DJ, WARDROP, K.J. (Eds). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th edition, Blackwell Publishing Ltd., 2010. p. 576-585.

SALAKIJ, C.; SALAKIJ, J.; CHANHOM, L Comparative hematology, morphology, and ultrastructure of blood cells in monocellate cobra (*Naja kaouthia*), Siamese Spitting Cobra (*Naja siamensis*) and Golden Spitting Cobra (*Naja sumatrana*). **Kasetsart J (Nat Sci)**, v. 36, p. 291-30, 2002.

SAMSON, R.A., VARGA, J., WITIAK, S.M., GEISER, D.M. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. **Stud. Mycol.**, v. 59, p. 71 – 73, 2007.

SANDRIN, M.F.N.; PUORTO, G.; NARDI, R. Serpentes e Acidentes Ofídicos: Um Estudo sobre erros Conceituais em Livros Didáticos. **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 10, n. 3, p. 281-298, 2005.

SANO MARTINS, I. S. **Hematologia comparada de serpentes *Bothrops jararaca* e *Waglerophis merremii***. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1978. 131 f.

SCHMIDT, E. M. S., LOCATELLI-DITTRICH, R., SANTINI, E., & PAULILLO, A. C. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p; 9-20, 2007.

SCOTT, M.A.; STOCKHAM, S.L. Basophils and Mast Cells. In: FELDMAN, B.F. (Ed). **Schalm's Veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 309-317.

SILVA, W. B., MACHADO, C., GOLDBERG, D. W., MOREIRA, S. B., SILVA, L. C. C. P., FREIRE, I. M. A., MACIEL, P. O., et al. Avaliação da resposta inflamatória hematológica em cascavéis (*Crotalus durissus Linnaeus*), 1758 inoculadas com BCG. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, 985-992, 2009.

SILVA, W. B., SOARES, R. M., MACHADO, C., FREIRE, I. M. A., SILVA, L. C. C. P., BAHADIAN, S., MOREIRA, S. B., ET AL. Bioquímica plasmática de cascavéis (*Caudisona durissa LINNAEUS* , 1758) em cativeiro. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 40, n. 12, p. 2510-2514, 2010.

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

SILVA, M. M. S. 2000. **Identificação de serpentes coletadas no Estado de Pernambuco**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 63p.

SMITH, J. A. Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword. **J. Leukoc. Biol.**, v. 56, p. 672-686, 1994.

STACY, N.I.; ALLEMAN, R.; SAYLER, K.A. Diagnostic hematology of reptiles. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 87-108, 2011.

STAUBER, E.; GOGOLEWSKI, R. Poxvirus dermatitis in a tegu lizard (*Tupinambis teguixin*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 21, p. 228 – 230, 1990.

STOKER, K.F. Composition of snakes venoms. In: STOKER, K.F (Ed). **Medical use of snakes venoms proteins**, Boca Raton: Ed. CRC Press, 1990. p. 33-57.

STRIK, N.I, ALLEMAN, R.; HARR, K. Circulating inflammatory cells in infectious. In: JACOBSON, R. (Ed). **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles**. CRC Press. 2007.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 881 p.

SWIMMER, J.Y. Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle. **J. Wildl. Dis.**, v. 36, n. 1, p. 102-110, 2000.

SYKES, J. M., & KLAPHAKE, E. Reptile Hematology. **Vet. Clin. Exot. Anim.**, v.11, p. 481-500, 2008.

TONI, M., & ALIBARDI, L. Alpha- and beta-keratins of the snake epidermis. *Zoology*, v. 110, p. 41-47, 2007.

THRALL, M.A., BAKER, D. C., CAMPBELL, T.W., DENICOLA, D., FETTAMAN, M. J., LASSEN, E. D., REBAR, A., WEISER, G. Hematology of Reptiles. In: Lippincott Williams, L. & Wilkins, A. (Eds). **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Battimore: 2004. p.259-276.

TROIANO, J. C.; GOULD, E. G.; ALTHAUS, R.; MALINSKAS, G.; GOULD, J. A.; HEKER, J.; VIDAL, J. C.; AMANTINI, E.; SIMONCINI, C. Blood biochemical profile of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in captivity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 2, p. 183-189, 2001.

TROIANO, J.C.; VIDAL, J.C.; GOULD, J. AND GOULD, E. Haematological reference intervals of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurent, 1768) in Captivity. **Comparative Haematological International**, v.1, p.109-112. 1997.

TUCUNDUVA M., BORELLI, P. & SILVA, J.R.M.C. Experimental Study of induced inflammation in the Brazilian boa (*Boa constrictor constrictor*). **J. Comp. Pathol.**, v. 125, n. 2-3, p. 174-181, 2001.

UETZ, P. & HOŠEK, J. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

VANZOLINI, P. E.; HEYER, W. R. The American herpetofauna and the interchange. In: STEHLI, F. G.; WEBB, S. D. **The Great American Biotic Interchange**. 1 ed., Plenum Press., 1985. p. 475-487.

VARGAS, Disproteinemias. In: **Patología clínica veterinária**. Segunda edición, 2007.

VENENONEMIA. Disponível <www.venenonemia.org/.../img_anatomia7.jpg> Acesso em: 01 dez. 2011.

WELLEHAN, J. F. X.; GUNKEL, C. I. Emergent diseases in reptiles. **Seminars in Avian and Exotic Medicine**, Gainesville, v. 13, n. 3, p. 160-174, 2004.

WELLEHAN, J.F.X.; JOHNSON, A.J. Reptile virology. (Extended abstract). **Vet. Clin. Exot. Anim.**, v. 8, p. 27–52, 2005.

WITHERS, P. C. **Comparative animal physiology**. Orlando: Saunders College, 1992. 949 p.