

Rafael Otávio Cançado Motta

T636.089

M921 P

2005



PERFIL HEMATOLÓGICO DE SERPENTES *Crotalus durissus* Linnaeus, 1758 (VIPERIDAE) E PARASITISMO POR *Hepatozoon* (APICOMPLEXA, HEPATIZOZOIDAE) NO ESTADO DE MINAS GERAIS.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Paulo Roberto de Oliveira

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2005

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

01/09/05

1536605-06

374900

M921p Motta, Rafael Otávio Cançado, 1974-

Perfil hematológico de serpentes *Crotalus durissus* Linnaeus, 1978 (Viperidae) e parasitismo por *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) no Estado de Minas Gerais / Rafael Otávio Cançado Motta. – 2005. 38 p. :il.

Orientador: Paulo Roberto de Oliveira
Dissertação (mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1. Cobra – Teses. 2. Hematologia veterinária – Teses. I. Oliveira, Paulo Roberto de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 615


Dissertação defendida e aprovada em 13 de junho de 2005, pela comissão examinadora constituída por:



Prof. Dr. Paulo Roberto de Oliveira
(Orientador)



Prof. Dr. Alan Lane de Melo



Prof.^a. Dr.^a. Marília Martins Melo



Dr.^a. Consuelo Latorre Fortes-Dias

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Timoshenko e Vera pelo amor incondicional, confiança e apoio.

Aos meus irmãos e amigos, pela companhia e bons momentos.

À Imilla pelo amor, carinho, paciência e companheirismo durante todo esse percurso.

Ao professor Paulo Roberto de Oliveira pela confiança e apoio.

Aos biólogos Ricardo Maciel, Gisele Cotta e à farmacêutica Raquel Joane, por abrirem as portas da FUNED e confiarem na minha proposta.

Aos funcionários da FUNED Isaltino Carvalho e Rômulo, às estagiárias Manon e Jane pela ajuda indispensável à realização do trabalho.

Aos professores Alan Melo, Marília Melo, Ida Sigueko-Sano pelos conhecimentos preciosos, paciência e amor pela pesquisa e ensino.

Aos veterinários da FZB-BH Marcelo Malta, Elvira Costa, Marcela Luppi, e ao diretor Carlyle Mendes, pela compreensão, apoio e amizade.

À Deus e aos animais que movem minha cabeça e meu coração.

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Descrição da espécie <i>Crotalus durissus</i> Linnaeus, 1758.....	12
2.2. Hematologia.....	13
2.2.1. Eritrócitos.....	13
2.2.2. Anomalias dos eritrócitos.....	14
2.2.3. Trombócitos.....	14
2.2.4. Leucócitos.....	15
2.3. Coleta de sangue em serpente.....	15
2.4. Hemogregarinas de serpentes.....	16
2.4.1. Hospedeiros.....	16
2.4.2. Ciclo de vida.....	16
2.4.3. Alterações hematológicas e clínicas em serpentes parasitadas por <i>Hepatozoon</i> sp.....	18
2.4.4. Características morfológicas dos Gamontes de <i>Hepatozoon</i> sp. em serpentes.....	19
2.4.5. Diagnóstico.....	19
2.4.6. Tratamento.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Distribuição dos animais por grupos experimentais.....	19
3.1.1. Animais de cativeiro.....	20
3.1.2. Animais recém-capturados.....	20
3.2. Contenção física.....	20
3.3. Coleta de sangue.....	21
3.4. Biometria.....	21
3.5. Confeção e avaliação dos esfregaços sanguíneos.....	21
3.6. Processamento das amostras de sangue total.....	21
3.7. Avaliação de proteína plasmática total.....	21
3.8. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Primeiro relato da prevalência de parasitismo por <i>Hepatozoon</i> sp. em <i>C. durissus</i> no estado de Minas Gerais.....	22
4.2. Valores hematológicos normais de <i>C. durissus</i>	22
4.3. Comparações das médias de parasitemia, eritrograma, policromatófilos, trombócitos, leucócitos e proteína plasmática total entre serpentes parasitadas por <i>Hepatozoon</i> sp. e serpentes não parasitadas.....	24
4.4. Correlações e comparação das médias de peso, comprimento (rostro-anal) e Relação peso/comprimento (rostro-anal) entre animais parasitados por <i>Hepatozoon</i> sp. e animais livres da infecção.....	26
5. CONCLUSÕES.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das serpentes <i>C. durissus</i> por grupo experimental	19
Tabela 2 – Prevalência de infecção por <i>Hepatozoon</i> sp. em machos de cativeiro (GI-M), fêmeas de cativeiro (GI-F), machos recém-capturados (GII-M) e fêmeas recém-capturadas (GII-F)	22
Tabela 3 – Valores hematológicos normais de <i>C. durissus</i>	23
Tabela 4 – Comparação das médias de parasitemia e hemograma entre machos e fêmeas de <i>C. durissus</i> parasitados e não parasitados por <i>Hepatozoon</i> sp. ...	25
Tabela 5 – Comparação das médias de peso, comprimento e relação peso comprimento entre <i>C. durissus</i> parasitadas e não parasitadas por <i>Hepatozoon</i> sp.	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Avaliação microscópica de lâminas de esfregaço sangüíneo de serpentes <i>C. durissus</i> parasitadas por <i>Hepatozoon</i> sp. a,b) Infecção dupla, dois gamontes do parasito no interior de um eritrócito; c,d) Vermículos de <i>Hepatozoon</i> sp. livres no plasma; e) Formação de cápsula ao redor do gamonte de <i>Hepatozoon</i> sp. Coloração segundo Rosenfeld (1947). Aumento de 1000X	27
Figura 2 – Manipulação de serpentes <i>C. durissus</i> . a) Contenção física com utilização de gancho e tubo plástico transparente; b) Animal contido no interior do tubo na posição ventro-dorsal; c,d) Punção de veia coccígea ventral; e) Biometria - distância rostro-anal	29

Figura 3 – Avaliação microscópica de lâminas de esfregaço sanguíneo de serpentes *C. durissus* parasitadas por *Hepatozoon* sp.

- a, b) Gamontes de *Hepatozoon* sp. no interior de eritrócitos;
- c, d) Eritrócitos apresentando rarefação de hemoglobina induzida pelo parasito;
- e) Presença de policromatófilos e hemácia em mitose.

Coloração segundo Rosenfeld (1947). Aumento de 1000X 31

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estabelecer o perfil hematológico de serpentes *Crotalus durissus* no estado de Minas Gerais e contribuir para um melhor conhecimento das hemoparasitoses que acometem estas serpentes. Foram analisadas 83 amostras de sangue obtidas de espécimes de *C. durissus* capturadas no estado de Minas Gerais distribuídas entre 30 fêmeas e 30 machos recém-capturados, 12 fêmeas e 11 machos de cativeiro. As amostras de sangue foram utilizadas para realização da contagem total de eritrócitos, leucócitos, trombócitos, determinação do volume globular (VG) e dosagem de Hemoglobina (Hb). Os esfregaços sangüíneos foram utilizados para diagnóstico de *Hepatozoon* sp., cálculo de percentagem de parasitemia e policromatófilos (eritrócitos imaturos). A partir das amostras de plasma obteve-se os valores de proteína plasmática total. Os resultados obtidos dos animais recém-capturados parasitados e não parasitados foram comparados entre si e com os valores obtidos dos animais de cativeiro. Foram estabelecidos intervalos hematológicos de referência para *C. durissus* do estado de Minas Gerais. Foi relatada uma prevalência de 38,3% de infecção por *Hepatozoon* sp. nas serpentes recém-capturadas. Não foram encontrados animais positivos entre os animais de cativeiro. Serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp. demonstraram aumento estatisticamente significativo na percentagem de policromatófilos. Serpentes livres da infecção por *Hepatozoon* sp. apresentaram médias de peso, comprimento (rosto-anal) e relação peso/comprimento superiores aos animais parasitados, sugerindo uma influência negativa de *Hepatozoon* sp. na longevidade de *C. durissus*.

Palavras-Chave: *Crotalus durissus*, *Hepatozoon* sp., hematologia, serpentes.

ABSTRACT

This work had as its aims to establish the haematological values of *Crotalus durissus* snakes in the state of Minas Gerais and to contribute to a better knowledge of the effects of haematozoan infections on that species. Eighty three blood samples were taken and analysed from *C. durissus* specimens, captured in the state of Minas Gerais. Among those animals, there were 30 wild caught males and 30 wild caught females, 11 male and 12 female from captivity. The blood samples were used for the red blood cells count, the white blood cells count, the thrombocytes count, the hematocrit value and the haemoglobin concentration. The blood films were used to diagnose *Hepatozoon* sp. and to calculate the percentage of parasite loads and immature red cells. The values for the total plasmatic protein were obtained from the plasma samples. The results obtained from the wild caught animals with and without parasites were compared between them and with the values which were found from the captivity animals. The haematological reference intervals for the *C. durissus* in the state of Minas Gerais were established. A prevalence of 38,3% of *Hepatozoon* infection in the wild caught snakes was reported. No *Hepatozoon* infection was found in the captivity animals. An increase of immature red cells was registered in *Hepatozoon* infected snakes. The snakes which were not infected by the *Hepatozoon* sp. presented average weight, length and weight-length ratio superior to those of the infected animals, what suggested a negative influence of the *Hepatozoon* sp. presence in the longevity of the *C. durissus*.

Key words: *Crotalus durissus*, *Hepatozoon* sp., hematology, snakes.

1. INTRODUÇÃO

As serpentes da espécie *Crotalus durissus* Linnaeus, 1758, popularmente conhecidas como cascavéis, são crotalíneos terrestres e robustos, apresentando ampla distribuição geográfica pelo Brasil (Campbell e Lamar, 1989).

No Brasil são notificados cerca de 20.000 casos de acidentes ofídicos humanos por ano, dos quais aproximadamente oito por cento são causados por serpentes da espécie *Crotalus durissus* (Brasil, 1998). Em 2004, o Hospital João XXIII em Belo Horizonte (MG), registrou 50% dos acidentes ofídicos em acidentes crotalícos¹. O envenenamento crotalíco é caracterizado por manifestações de neurotoxicidade, miotoxicidade e distúrbios de coagulação sanguínea. Esse tipo de acidente pode levar à morte, principalmente por insuficiência renal aguda (IRA) (Cardoso et al., 2003).

O único tratamento específico para o envenenamento crotalíco é a administração do soro anticrotalíco, obtido a partir da imunização de eqüinos com a peçonha produzida por *Crotalus durissus*. Por esse motivo, serpentes dessa espécie são mantidas em cativeiro para a realização de coletas regulares de veneno. Além disso, o veneno de *Crotalus durissus* possui importância na indústria farmacêutica, sendo utilizado em pesquisas de medicamentos de emprego terapêutico e cirúrgico.

A produtividade e a qualidade do veneno obtido das serpentes, entre outros fatores, dependem do estado de saúde no qual o animal se encontra, cuja verificação pode ser dificultada pela falta de valores hematológicos de referência (Troiano et al., 2000). Caracterizações dos padrões hematológicos de espécimes aparentemente sadios e dos desvios hematológicos causados por hemoparasitos

de serpentes podem ser úteis na indicação do estado geral de saúde e no monitoramento do tratamento de animais doentes.

O presente trabalho estabelece valores hematológicos para serpentes *Crotalus durissus* do estado de Minas Gerais e vem contribuir para maior conhecimento das enfermidades parasitárias que acometem tais animais, buscando demonstrar a importância do reconhecimento de hemoparasitos do gênero *Hepatozoon* como determinante de enfermidades que acarretam a redução da sobrevivência de serpentes em vida livre e em cativeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descrição da espécie *Crotalus durissus* Linnaeus, 1758

Crotalus durissus é uma serpente peçonhenta, terrestre, robusta e pouco ágil. Sua característica mais marcante é a presença de chocalho ou guizo, no extremo caudal de seu corpo (Cardoso et al., 2003). Alcança geralmente 1,0 metro de comprimento rostro-anal, mas, em algumas populações, os maiores machos podem atingir até 1,8 m. O padrão de coloração apresenta variações entre marrom-acinzentado, marrom, marrom-avermelhado, cinza-amarelado, cinza-azulado, cinza-esverdeado, oliva-amarelado, amarelo-palha, alaranjado ou preto. Possui de 18 a 35 manchas dorsais, em forma de losango ou de diamante, delineadas por escamas mais claras. Na porção anterior do corpo, as manchas existentes possuem coloração marrom-avermelhada, marrom-escura ou preta, e o centro dessas manchas apresenta tom mais claro, de marrom-claro a marrom-acinzentado. Já as manchas posteriores tendem a ser mais curtas, mais largas e mais escuras, freqüentemente se fundindo com as manchas laterais, localizadas abaixo da série de manchas dorsais (Campbell e Lamar, 1989).

Dentre as serpentes do gênero *Crotalus*, *Crotalus durissus* é a espécie mais

¹ Melo, M. M. Comunicação pessoal. 2005. (Escola de Veterinária da UFMG, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

amplamente distribuída. É encontrada desde o México, onde apresenta uma distribuição descontínua, até a Argentina. No Brasil, distribui-se em todo o território, com exceção dos estados do Acre, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Na região Norte, ocorrem populações isoladas no Amazonas, em Roraima, no Amapá e na Ilha de Marajó. A espécie é distribuída mais ou menos continuamente do Ceará ao Rio Grande do Norte; ao Sul, até o Rio Grande do Sul; a Oeste, até o Piauí e Goiás, com extensões no interior do Mato Grosso e Rondônia, não ocorrendo nas montanhas da costa do Atlântico (Campbell e Lamar, 1989).

Crotalus durissus é encontrada geralmente em altitudes menores que 700 metros, em regiões áridas e semi-áridas, incluindo o cerrado e a caatinga. Raramente a espécie é encontrada em florestas densas (Campbell e Lamar, 1989). Existe um relato de sua ocorrência na mata atlântica da serra do Mar, onde é considerada uma espécie invasora, em virtude, principalmente do desmatamento (Marques et al., 2001).

No Brasil, é conhecida a ocorrência de cinco subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella*, *C. durissus colillineatus*, *C. durissus marajoensis*, *C. durissus ruruima*. No estado de Minas Gerais, são encontradas as subespécies *C. d. colillineatus* e *C. d. terrificus* (Hoge e Romano-Hoge, 1981).

2.2. Hematologia

2.2.1. Eritrócitos

Os eritrócitos são morfologicamente similares entre as várias espécies de répteis (Alleman et al., 1999). São células nucleadas tipicamente grandes, alongadas e elípticas. Em corte transversal, apresentam-se achatadas com convexidade central relativa à forma e à posição do núcleo (Pienaar, 1962). Os eritrócitos maduros são relativamente homogêneos em tamanho, forma e cor e possuem razão núcleo/citoplasma alta. Apresentam citoplasma homogêneo, translúcente, de coloração rosa-claro-alaranjado, em virtude da presença de hemoglobina;

ocasionalmente, pode-se observar um pequeno vacúolo adjacente ao núcleo (Dotson et al., 1995).

O eritrócito possui núcleo centralizado, com seu eixo maior paralelo ao eixo da célula, de forma achatada, oval a pleomórfica, apresenta coloração basofílica roxo-azulada com faixas de cromatina grosseira e grandes blocos angulares de cromatina, entremeados por um espaço quase imperceptível de paracromatina acidofílica (Pienaar, 1962; Dotson et al., 1995).

Os eritroblastos (eritrócitos imaturos) são células menores e mais arredondadas que os eritrócitos, possuem citoplasma mais basofílico, núcleo maior de forma arredondada e coloração roxo-escura, apresentando cromatina agrupada (Dotson et al., 1995; Alleman et al., 1999). No estudo de Dotson et al. (1995), que utilizou *Crotalus adamanteus*, os eritrócitos jovens, chamados policromatófilos, contaram menos que 1% dos eritrócitos de serpentes saudáveis.

A vida útil do eritrócito de um réptil pode chegar a três anos (Brace e Altland, 1955; Rodman et al., 1957; Altland e Brace, 1962); essa longevidade parece estar intimamente ligada à temperatura ambiente (Cline e Waldmann, 1962).

O eritrócito senescente aumenta de tamanho e apresenta uma coloração menos intensa, sendo que, em determinado ponto de degeneração, o citoplasma se torna praticamente invisível. O núcleo é geralmente centralizado e de maior volume, ocasionalmente esférico ou oval; na maioria das vezes, porém, tem forma irregular. A cromatina nuclear demonstra coloração lilás-pálida (Pienaar, 1962). Em estados avançados de degeneração, a membrana nuclear e a eritrocítica rompem-se e a célula é, então, fagocitada por um monócito ou por outra célula que assume a função de fagócito (linfócitos, heterófilos, azurófilos, trombócitos); o eritrócito degenerado pode também se dispersar pelo plasma circundante (Frye, 1991).

Segundo Frye (1991), os répteis possuem cinco vias de produção de eritrócitos, quais sejam:

- 1) Medular: via maturação do pro-eritroblasto até o eritrócito maduro.
- 2) Via ativação de sítios eritropoéticos extra-medulares, na maioria das vezes rins, baço e fígado, comuns em casos de estresse e/ou perda sangüínea crônica.
- 3) Eritrócitos maduros, ricos em hemoglobina, podem passar por divisão mitótica.
- 4) Eritrócitos maduros, ricos em hemoglobina podem, por meio da fissão, dar origem a duas ou mais células-filhas.
- 5) Trombócitos, aparentemente, possuem capacidade de se transformar em eritrócitos morfológica e fisiologicamente normais, mediante a divisão mitótica ou fissão.

Um ou mais dos processos descritos podem ser ativados após um episódio de perda sangüínea aguda ou crônica ou na deficiência de ferro.

Em répteis saudáveis a contagem de eritrócitos varia entre 500.000 a 2.500.000 células/mm³ de sangue (Mader, 2000).

2.2.2. Anomalias dos eritrócitos

Eventualmente, podem ser visualizadas hematogônias, núcleos cercados por uma fina borda de citoplasma, aparentemente formados com base na extrusão do núcleo de um eritrócito, que são células de importância clínica questionável (Frye, 1991). Células vermelhas anucleadas, chamadas eritoplastídeos, são raramente vistas e possuem forma cônica ou aparência de fragmentos de grandes células nucleadas; é possível que representem artefato de técnica. Os típicos corpúsculos vermelhos anucleados são muito raros; nos estudos de Pienaar (1962) com répteis sul-

africanos, representavam uma a duas células na contagem de mil eritrócitos.

Os corpúsculos de Howell-Jolly, resquícios nucleares no citoplasma dos eritrócitos, podem ser observados com alguma frequência. Acantócitos, eritrócitos em forma de foice, piriformes e esféricos são eventualmente visualizados, e, em alguns casos, o fato pode decorrer de artefato de técnica, mas, em alguns indivíduos com alta incidência, essas anomalias celulares podem sugerir eritrogênese atípica (Frye, 1991).

Esféricitos são eritrócitos de menor tamanho e forma, que possuem significância clínica em doenças auto-imunes; são visualizados com frequência em casos de Lupus eritematoso sistêmico e de artrite reumatóide, em que são os principais achados patognomônicos. Micrócitos e macrócitos também podem ser vistos ocasionalmente (Frye, 1991).

Diferentes parasitos intra e extra-eritocitários podem ser visualizados com frequência na análise de esfregaços sangüíneos, e sua importância deve ser observada à luz dos sintomas clínicos apresentados pelo animal (Frye, 1991; Dotson et al., 1995).

2.2.3. Trombócitos

Os trombócitos de serpentes são nucleados e geralmente assumem duas formas: uma elíptica, com bordas suaves (semelhante a um eritrócito), com o eixo longitudinal nuclear paralelo ao da célula; outra, geralmente redonda, apesar de algumas vezes disforme, com bordas irregulares. Em ambas as formas, o núcleo é centralizado e tende a acompanhar o formato da membrana celular. O núcleo possui coloração profundamente basofílica e cromatina com padronização densa (Dotson et al., 1995).

O citoplasma é levemente basofílico e incolor, muitas vezes apresentando característica de clareamento ou vacuolização perinuclear (Alleman et al.,

1999). São células pequenas, que medem aproximadamente de um terço à metade de um eritrócito, e possuem razão núcleo/citoplasma moderadamente alta (Salakij et al., 2002).

Ocasionalmente, podem-se observar trombócitos falciformes ou que apresentam citoplasma com aspecto espumoso (Dotson et al., 1995). Pseudópodes citoplasmáticos podem ser visualizados por vezes, sendo possível, distinguir-se conteúdo finamente granular no seu interior, por meio da microscopia eletrônica (Frye, 1991; Alleman et al., 1999).

Em animais dentro dos padrões normais de saúde, espera-se encontrar valores entre 10.500 e 19.500 trombócitos por milímetro cúbico de sangue (Pienaar, 1962; Frye, 1991).

Nos répteis, os trombócitos originam-se normalmente de células multinucleadas, semelhantes aos megacariócitos dos mamíferos, localizados na medula óssea ou em focos de hematopoese extramedular. Constituem parte integral do mecanismo de coagulação e desempenham função de fagócito ativo, podendo fagocitar bactérias, eritrócitos defeituosos e debris celulares. Possuem, ainda, a capacidade de se transformar em eritrócito, e, como o eritrócito, podem passar por divisão mitótica ou fissão, após terem atingido sua forma madura. Em experimentos de indução de anemia em répteis, animais monitorados quanto ao hemograma e à morfologia das células sanguíneas demonstraram que, em alguns dias, trombócitos normais apresentavam aumento de volume, presença de um ou mais nucléolos proeminentes e progressivo aumento de hemoglobina citoplasmática (Frye, 1991).

Os trombócitos têm tendência a aderir entre si durante a coleta da amostra, formando agregados que são geralmente mais comuns nas bordas dos esfregaços sanguíneos (Frye, 1991; Dotson et al., 1995). Sendo assim, a contagem diferencial dessas células fica amplamente dependente da magnitude dos agrupamentos encontrados (Alleman et al., 1999).

Segundo Salakij (2002), os trombócitos encontrados em agrupamentos são menores que os vistos individualmente.

2.2.4. Leucócitos

Existe uma grande discussão acerca da hematologia de répteis, principalmente no que diz respeito à terminologia, à morfologia e à ocorrência de certos elementos celulares da série branca desses animais. Alguns autores como Pienaar (1962), Sypek e Borysenko (1988) e Hawkey e Dennett (1989) propuseram a padronização da nomenclatura dos leucócitos de répteis; parece existir, porém uma grande variação, não só na contagem como também na ocorrência de algumas células brancas entre animais da mesma família e até do mesmo gênero (Frye, 1991; Dotson et al., 1995).

Segundo Mader (2000), a contagem total de células brancas em serpentes varia de 5.000 a 10.000 por milímetro cúbico de sangue. Na contagem diferencial de leucócitos considera-se a existência dos seguintes elementos celulares: linfócitos, plasmócitos, azurófilos, monócitos, heterófilos, eosinófilos e basófilos (Frye, 1991; Dotson et al., 1995; Alleman et al., 1999; Troiano et al., 2000; Salakij et al., 2002):

2.3. Coleta de sangue em serpente

Vários métodos de coleta de sangue já foram descritos em serpentes: punção das veias palatinas (Olson et al., 1975; Roskopf et al., 1982; Frye, 1991; Willette-Frahm, 1995), cardiocentese (Olson et al., 1975; Frye, 1991; Willette-Frahm, 1995), punção periorbital (Olson et al., 1975; Frye, 1991), punção das veias coccígeas (Bush e Smeller, 1978; Samour et al., 1984; Frye, 1991; Willette-Frahm, 1995), punção de aorta e cava (Rosskopf et al., 1982) e, até mesmo, corte de ponta de cauda (Olson et al., 1975). Todas as metodologias apresentam vantagens e desvantagens, que estão intimamente relacionadas ao porte do animal, à quantidade de sangue a ser coletada, à segurança do técnico e ao risco à saúde do animal.

▼ O volume total de sangue em répteis varia entre cinco a oito por cento de seu peso corpóreo (Jacobson, 1993). Dessa quantidade, o máximo de 10% do volume total de sangue pode ser coletado de uma só vez sem prejuízo à saúde do animal (Mader, 2000). Como as veias das serpentes parecem colabar-se com grande facilidade, é necessário escolher agulhas e seringas de dimensões apropriadas ao porte do animal e à parte do corpo onde será feita a coleta (Willette-Frahm, 1995).

2.4. Hemogregarinas de serpentes

Três famílias de hemogregarinas, que parasitam répteis, são comumente observadas: Hemogregarinadae, Hepatozoidae e Karyolysidae (Barta, 1989). Todos os parasitos dessas famílias possuem ciclo de vida heteroxeno, e envolvem um hospedeiro vertebrado intermediário e um hospedeiro invertebrado hematófago definitivo (Smith, 1996).

As hemogregarinas do gênero *Hepatozoon* (Hepatozoidae) são os mais prevalentes e característicos hemoparasitos de serpentes, tendo sido relatadas em todas as famílias desses animais, exceto nas que vivem em habitats estritamente fossoriais (Telford, 1984). Apesar de a maioria das descrições ter sido originalmente classificada como espécies do gênero *Haemogregarina*, estudos sobre o ciclo de vida do parasito demonstraram que, na verdade, trata-se de espécies do gênero *Hepatozoon* (Robin, 1936; Mackerras, 1962; Lewis e Wagner, 1964; Stehbens e Jonhston, 1967, 1968; Allison e Desser, 1981; Bashtar et al., 1987; Smith, 1996). Segundo Frye (1991), répteis terrestres são parasitados por hemogregarinas do gênero *Hepatozoon*. Tal afirmação vem sendo confirmada por estudos recentes (Moço et al., 2002; O'Dwyer et al., 2004; Ujvari et al., 2004; Telford et al., 2004; Paperna e Lainson, 2004; Madsen et al., 2005).

2.4.1. Hospedeiros

Hemogregarinas de serpentes, incluindo 121 espécies descritas e os numerosos relatos nos quais foram feitas apenas

descrições de gênero, foram encontradas em mais de 200 espécies de serpentes de regiões temperadas a tropicais (Levine, 1982; Smith et al., 1996). O primeiro relato de hemogregarinas em serpentes foi feito por Pfeiffer, em 1890 (Smith, 1996). No Brasil, em 1901, foi assinalada a existência de hemogregarinas nas seguintes espécies de serpentes brasileiras: *Eunectes murinus*, *Boa constrictor*, *Drymobius bifossatus*, *Coluber corais*, *Spilotes pullatus*, *Xenodon newwiedi*, *Philodryas olfersi*, *Heterodryas carinatus* e em várias espécies e variedades dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* (Lutz, 1901, citado por Pessoa, 1967a). Em serpentes brasileiras, várias espécies de *Hepatozoon* (hemogregarinas) foram relatadas: *H. juxtannuclearis*, *H. fusifex* e *H. terzii* parasitos de *Boa constrictor* (Carini, 1947; Ball et al., 1969); *H. romani* e *H. capsulata* parasitos de *Crotalus durissus terrificus* (Phisalix, 1931); *H. philodryasi* parasito de *Philodryas patagonensis* (Carini, 1910), *H. mingonei* e *H. cyclagrasi* parasitos de *Hydrodynastes gigas* (Arantes, 1934; Schouten, 1934; Pessoa et al., 1970).

Mosquitos (Culicidae) dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* são os principais vetores de hemogregarinas para sapos e serpentes (Ball et al., 1967, 1969; Pessoa e De Biasi, 1973; Lowichick et al., 1993; Smith et al., 1994) e servem também como hospedeiros definitivos para espécies de *Hepatozoon* que parasitam algumas espécies de lagartos (Mackerras, 1962; Bashtar et al.; Smith, 1996). Flebotomíneos da espécie *Phlebotomus vexator*, contendo oocistos de *Hepatozoon* em sua hemocele, foram relatados em um local onde serpentes apresentavam infecção por hemogregarinas (Ayala, 1970). Outros grupos de artrópodes hematófagos, entre eles, barbeiros, ácaros e carrapatos podem manter a fase esporogônica de hemogregarinas, porém, poucos foram comprovados como vetores naturais do parasito (Wozniak e Telford, 1991).

2.4.2. Ciclo de vida

Estudos detalhados sobre hemogregarinas de serpentes em várias espécies de mosquitos (*Aedes sierrensis*, *Aedes togoi*,

Anopheles albimanus, *Culex pipiens*, *Culex tarsalis*, e *Culex territans*) revelaram que a fase esporogônica do parasito que ocorre no hospedeiro invertebrado inicia-se com a ingestão de microgamontes e macrogamontes presentes nos hospedeiros vertebrados infectados (Ball et al., 1967; Ball et al., 1969; Smith et al., 1994). Os gamontes migram através da parede intestinal do mosquito, associando-se em sizígia antes de ocorrer a gametogênese nas células da hemocele. O zigoto, formado após a fertilização do macrogameta pelo microgameta, cresce rapidamente e forma um grande oocisto polisporocístico que contém muitos esporozoítos que permanecem na hemocele do inseto. Esporozoítos infectantes são transmitidos ao hospedeiro vertebrado, quando mosquitos que contêm oocistos são ingeridos (Smith, 1996).

Espécies de *Hepatozoon* obtidos de serpentes foram inoculados com sucesso em serpentes livres da infecção através da ingestão forçada de invertebrados infectados. Ball et al., em 1967, conseguiram, experimentalmente, a infecção de uma serpente da espécie *Boa constrictor*, alimentando-a com uma das três espécies diferentes de mosquitos infectados com oocistos polisporocísticos de *H. rarefaciens*, que surgiram em suas hemoceles 16 a 29 dias após terem se alimentado sobre uma serpente *Drymarchon corais* naturalmente infectada. Gamontes de *H. rarefaciens* foram encontrados no interior dos eritrócitos da serpente 47 dias após a infecção. A hemogregarina em questão havia sido descrita como *Haemogregarina rarefaciens* por Sambon e Seligman (1907); porém, os estágios sexuais observados por Ball et al. no hospedeiro invertebrado demonstraram que o parasito pertencia ao gênero *Hepatozoon*, sendo assim redescrita a espécie como *Hepatozoon rarefaciens* (Sambon e Seligman, 1907) Ball et al., 1967. Hemogregarinas de serpentes *Boa constrictor* desenvolveram oocistos no interior da hemocele de mosquitos *Culex tarsalis* e de carrapatos *Amblyomma dissimile* após se alimentarem sobre serpentes infectadas. A transmissão do parasito às serpentes livres da infecção foi

conseguida com sucesso através de inóculo forçado dos invertebrados infectados (Ball et al., 1969).

No entanto, Wozniak e Telford (1991) comprovaram que, apesar de carrapatos *Ornithodoros turicata americana* parasitarem naturalmente serpentes na Flórida, esse artrópode é incapaz de servir como vetor de parasitos do gênero *Hepatozoon* para algumas espécies de serpentes. O exame histológico dos carrapatos potencialmente infectados demonstrou a presença de células, semelhantes a gametócitos, presas no lúmen intestinal deles, sugerindo a existência de uma barreira à infecção no próprio intestino desses artrópodes, e impedindo que os gametócitos migrem do intestino para a hemocele para completarem o desenvolvimento esporogônico.

Considerando-se que os invertebrados não fazem parte da alimentação normal de uma serpente, a transmissão direta parece improvável na natureza. A necessidade de um hospedeiro vertebrado intermediário para as espécies de *Hepatozoon* foi postulada, primeiramente, quando Langmann (1899), citado por Smith (1996), sugeriu que as serpentes são infectadas por hemogregarinas, quando da ingestão de sapos infectados por esse microorganismo. Sua hipótese foi testada por Landau et al. (1972) que alimentaram lagartos insetívoros das espécies *Oplurus sebae* e *Lacerta muralis* com mosquitos que continham oocistos de *H. domerguei*. Cistos que continham dois cistozoítos originados pela divisão de esporozoítos foram encontrados, principalmente, no fígado dos lagartos. Serpentes tornaram-se infectadas após a ingestão desses lagartos, completando, assim, um plausível ciclo de vida de três hospedeiros para essas espécies (Smith, 1996).

Experimentos realizados demonstraram a possibilidade de infecções cruzadas de hemogregarinas entre anfíbios, serpentes e lagartos, através da ingestão de tecidos que continham cistos dizóicos, sugerindo que a predação e/ou o canibalismo podem ser uma das rotas de transmissão de *Hepatozoon* (Smith et al., 1994; Smith,

1996; Wozniak et al., 1998). Smith et al. (1994) conseguiram a transmissão experimental de cistos de *Hepatozoon* encontrados no fígado de quatro espécies de sapos para três espécies diferentes de serpentes, ao usar os anfíbios como alimento. Quarenta e cinco dias após a ingestão experimental, notou-se o aparecimento de gamontes no interior dos eritrócitos dessas serpentes.

Os resultados obtidos mediante estudos experimentais demonstraram que as espécies de *Hepatozoon* encontrados em répteis apresentam um baixo grau de especificidade, tanto para os hospedeiros vertebrados quanto para os hospedeiros invertebrados (Telford, 1984).

O desenvolvimento merogônico de *Hepatozoon* pode ocorrer em hospedeiros intermediários ou em serpentes que tenham ingerido esporozoítos através de mosquitos infectados, ou, ainda, em serpentes inoculadas com cistozoítos de hospedeiros intermediários. Ambos os estágios citados dão origem a merontes esféricos ou ovóides, normalmente contendo centenas de merozoítos, que são encontrados, dependendo da espécie, no fígado, no pulmão, no coração, no cérebro ou em outros órgãos viscerais (Smith, 1996).

O primeiro tipo de meronte, que é chamado de macromeronte ou meronte Y, forma-se prematuramente e contém grandes macromerozoítos que alcançam a corrente sanguínea; porém, não invadem os eritrócitos. Esses macromerontes ocupam as células de alguns órgãos internos e dão origem posteriormente a outros ciclos merogônicos. O segundo tipo de meronte, chamado de micromeronte ou meronte X, forma-se posteriormente e produz pequenos micromerozoítos. Os micromerozoítos, após serem lançados na corrente sanguínea, circulam por um curto período de tempo, antes de penetrar nos eritrócitos e de se transformar em gamontes (Smith, 1996). O desenvolvimento merogônico é completado num período de 4-7 semanas após a infecção (Ball et al., 1967).

Outra rota de infecção possível é a transmissão congênita. Lowichik e Yaeger (1987) relataram que uma serpente *Nerodia fasciata confluens*, com elevada parasitemia por hemogregarinas, deu à luz uma ninhada de 12 indivíduos, todos infectados com o protozoário.

Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a ecologia de cada espécie de serpente, principalmente no que diz respeito a seu habitat e aos seus hábitos alimentares. Tais fatores podem representar maior suscetibilidade à infecção por *Hepatozoon*, como é o caso de serpentes que se alimentam de anfíbios, lagartos e outras serpentes.

Em Ontário (Canadá), a prevalência de *Hepatozoon* em serpentes terrestres *Thamnophis sirtalis sirtalis* foi de 13%, enquanto serpentes aquáticas *Nerodia sipedon sipedon* apresentaram uma prevalência de 62% para a mesma infecção. Com base nesses dados e sabendo-se que os sapos, que são hospedeiros dos estágios císticos de *Hepatozoon*, constituem o principal item na dieta das serpentes aquáticas, infere-se que essas teriam maior propensão a ingerir um anfíbio que contém cistos e, conseqüentemente, a desenvolver a infecção por *Hepatozoon* (Smith et al., 1994).

2.4.3. Alterações hematológicas e clínicas em serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp.

As hemogregarinas de répteis são, aparentemente, parasitos bem adaptados que causam poucas alterações patológicas em seus hospedeiros naturais – ou, mesmo, nenhuma alteração (Wozniak et al., 1994a). Alguns autores citam a anemia macrocítica hipocrômica como o distúrbio mais comumente encontrado tanto em serpentes altamente parasitadas por *Hepatozoon* quanto nas que apresentam cargas parasitárias mais leves. Ocorre, também, um notável aumento na contagem total de leucócitos (Al-Badry et al., 1991).

Alterações na morfologia dos eritrócitos parasitados por gamontes são relatados

com frequência (Ball et al., 1967, 1969; Lowichik e Yaeger, 1987; Pessoa, 1967a; Al-Badry et al., 1991). Em alguns casos, pode ocorrer trombocitopenia e até mesmo púrpura, induzida pelo grande número de trombócitos recrutados para serem transformados em eritrócitos (Frye, 1991). Um relato de caso descreve a ocorrência de hepatite granulomatosa associada a merontes de *Hepatozoon* em uma serpente não cativa (Wozniak et al., 1988). Estudos demonstram que tais infecções podem gerar problemas, como a diminuição do metabolismo corporal, traduzidos pela redução no consumo de oxigênio quando em descanso e menor velocidade de locomoção (Oppliger et al., 1996).

2.4.4. Características morfológicas dos Gamontes de *Hepatozoon* sp. em serpentes

Os gamontes de *Hepatozoon* são, na maioria das vezes, encontrados no interior dos eritrócitos das serpentes hospedeiras. Em baixas parasitemias, menores que 4%, geralmente é encontrado apenas um gamonte por eritrócito, porém em infestações altas é comum observar-se dois ou mais gamontes parasitando um único eritrócito (Smith, 1996) (Figura 1/a;b). O tamanho do gamonte pode variar de acordo com a espécie do parasito, estágio de maturação e dimorfismo sexual (Hull e Camin, 1960; Clark e Bradford, 1969)

Podem ser encontradas, na circulação, formas livres que se movem de um eritrócito para outro, são chamados de vermículos (Figura 1/b;c) e acredita-se que sejam na verdade micromerozoítos (Pienaar, 1962).

Na maioria das descrições os gamontes intra-eritrocitários possuem forma delgada, por vezes recurvado, com seu eixo longitudinal paralelo ao do eritrócito e extremidades abauladas. Podem ser pequenos, ocupando 3/4 de um eritrócito ou atingirem dimensões superiores ao próprio eritrócito resultando, nestes casos, em distorção da célula parasitada. Algumas vezes pode ser notado um clareamento no citoplasma do eritrócito do hospedeiro assim

como deslocamento do núcleo do eritrócito (Hull e Camin, 1960; Ball et al., 1967, 1969)

Quando corados por corantes do tipo Romanowski, os gamontes de *Hepatozoon* apresentam citoplasma de coloração azul-claro a roxo-claro com ou sem granulações e vacuolizações. Possuem o núcleo mais ou menos centralizado de padrão denso a difuso que se cora de roxo-avermelhado (Pienaar, 1962; Smith et al., 1994).

Algumas vezes é possível visualizar-se uma cápsula formada pelo citoplasma da célula parasitada (Figura 1/e), que envolve o parasito (Pienaar, 1962).

2.4.5. Diagnóstico

O diagnóstico clássico da hepatozoonose em serpentes é feito pela visualização de gamontes intra-eritrocitários no esfregaço sangüíneo, corado pelo Giemsa. Pode ser feito o exame histológico de fragmentos hepáticos para pesquisa de cistos (Frye, 1991). Estudos vêm sendo realizados com diagnóstico pela PCR (Wozniak et al., 1994a; Ujvari et al., 2004; Telford et al., 2004; Paperna e Lainson, 2004).

2.4.6. Tratamento

Não é conhecido nenhum tipo de tratamento efetivo para a hepatozoonose em serpentes. Medidas de manejo sanitário, como o controle de vetores (mosquitos e carrapatos), alimentação de qualidade garantida e desinfecção de recintos, são preconizadas como ferramentas para diminuir o risco de infecção em animais de cativeiro (Wozniak et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Distribuição dos animais por grupos experimentais

As serpentes utilizadas foram separadas em dois grupos experimentais (GI e GII), e cada um desses grupos foi subdividido em dois subgrupos (M e F) conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das serpentes *C. durissus* por grupo experimental.

Grupo	Procedência	Subgrupos	Sexo	n
GI	Cativoiro	M	Macho	11
		F	Fêmea	12
GII	Recém-capturados	M	Macho	30
		F	Fêmea	30

3.1.1. Animais de cativoiro

Foram utilizadas vinte e três serpentes adultas *Crotalus durissus*, (11 machos e 12 fêmeas), capturadas no Estado de Minas Gerais, e mantidas no serpentário da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Todos os espécimes passaram por quarentena, período em que foram realizados exames de fezes e tratamentos para endoparasitos. Todos os animais preencheram os seguintes requisitos de sanidade:

- 1) Ausência de sinais clínicos de doença, ferimentos, abscessos ou ectoparasitos.
- 2) Estado nutricional adequado sem presença de sinais clínicos de desidratação.
- 3) Dieta regular nos últimos seis meses.
- 4) Exame parasitológico de fezes negativo.

Os animais encontravam-se alojados, individualmente, em caixas sob condições controladas de temperatura (28-29°C), umidade (60-70%) e fotoperíodo (12 h luz/12 h escuro). Todos estavam alimentando-se de presas vivas, camundongos (*Mus musculus*) provenientes do biotério da FUNED, com intervalo de quatro semanas entre alimentações e recebendo água filtrada *ad libitum* trocada diariamente. A limpeza das caixas era realizada três vezes por semana, com o uso de solução à base de cloreto de alquil dimetil benzil amônio a 30% diluído em uma parte para 2000 partes de água.

3.1.2. Animais recém-capturados

Foram utilizadas 60 serpentes adultas *Crotalus durissus*, 30 machos e 30 fêmeas, recém capturadas no Estado de Minas Gerais, entregues à FUNED no período de dezembro de 2004 a março de 2005. Todos os animais foram acomodados em caixas, separados de acordo com sua procedência e data de chegada, e receberam água filtrada *ad libitum*. O período de permanência entre a data de chegada dos animais e a data de coleta de sangue foi de no máximo três dias.

Foi realizado exame clínico para verificação de:

- 1) Sinais clínicos de doença, ferimentos, abscessos e ectoparasitas.
- 2) Estado nutricional e sinais clínicos de desidratação.

Não foram utilizados animais que apresentavam sinais clínicos de desidratação, ferimentos e presença de ectoparasitos.

3.2. Contenção física

Os animais foram contidos fisicamente utilizando-se ganchos de contenção e tubos plásticos transparentes (Figura 2/a;b), seguindo a metodologia descrita por Murphy (1971). O uso de anestésicos para contenção das serpentes foi evitado, uma vez que isso induz a alterações hematológicas significativas (Custer e Bush, 1980; Troiano et al., 2000).

3.3. Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada utilizando-se agulhas (25x7), acopladas a seringas de três mililitros, seguindo a metodologia de punção da veia coccígea caudal (Figura 2c;d) descrita por Samour et al. (1984).

A quantidade de sangue coletada foi de 1,0 ml. O sangue coletado foi imediatamente transferido para tubos estéreis, contendo 24mg/ml de solução de ácido etilenodiamino tetra acético potássico (EDTA-K₃). As amostras foram refrigeradas a 4°C logo após a coleta.

3.4. Biometria

Todas as serpentes foram pesadas em balança digital de precisão e mensuradas tomando como referência a abertura das narinas e a abertura da cloaca (Figura 2/e).

3.5. Confeção e avaliação dos esfregaços sangüíneos

Foram confeccionados três esfregaços sangüíneos por animal, imediatamente após a coleta do sangue (sem adição de anticoagulante), seguindo a metodologia descrita por Willette-Frahm (1995). Os esfregaços foram fixados e corados pela técnica de Rosenfeld (1947), uma mistura dos corantes May Grünwald e Giemsa em álcool metílico.

Os esfregaços foram utilizados para o diagnóstico de *Hepatozoon* sp., observando a morfologia dos gamontes no interior dos eritrócitos; a estimativa de parasitemia foi baseada no número de eritrócitos infectados por *Hepatozoon* sp., em 1000 eritrócitos analisados, por espécime (Lowhick e Yaeger, 1987). A parasitemia foi considerada leve quando menor ou igual a três por cento e grave, quando maior que quatro por cento (Al-Badry et al., 1991). Animais que apresentaram presença de outros hemoparasitos (*Plasmodium* sp., *Trypanosoma* sp.) foram descartados da amostragem.

A taxa de produção de eritrócitos foi estimada pelo percentual de eritrócitos imaturos (policromatófilos) em 1000 eritrócitos (Oppliger et al., 1996).

Todas as análises citadas foram realizadas com auxílio de microscopia óptica, no Laboratório de Patologia Clínica da Fundação Zôo-botânica de Belo Horizonte.

3.6. Processamento das amostras de sangue total

O sangue total, armazenado e refrigerado a 4°C nos tubos de coleta, foi utilizado para a contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, determinação de hemoglobina e volume globular. Todos os exames foram realizados dentro de um período máximo de 5 horas após a coleta, sendo o sangue homogeneizado antes do processamento das análises.

A contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foi realizada manualmente em câmara de Neubauer segundo metodologia descrita por Natt e Herrick (1952). As contagens foram realizadas em duplicata e feita a média dos valores obtidos considerados dentro de uma concordância de 10% (Salakij et al., 2002). A determinação de hemoglobina foi feita pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se a solução de Drakbin, realizando leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda 540 nm, seguindo a técnica descrita por Campbell (1991). O hematócrito ou volume globular foi realizado segundo técnica descrita por Campbell (1991).

3.7. Avaliação de proteína plasmática total

Após o processamento das amostras de sangue, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, durante 5 minutos, para separação do plasma o qual foi armazenado em tubos de microcentrifuga a -20°C. O plasma foi utilizado para avaliação bioquímica da proteína plasmática total (PPT), pela metodologia do biureto, utilizando kits comerciais e leitura em

espectrofotômetro, com comprimento de onda de 545nm.

3.8. Análise estatística

Para comparação entre as médias foi utilizado o teste-*t*, para amostras independentes, com nível de significância menor que 5%. Foi utilizado o método de Pearson para correlação de variáveis quantitativas, conforme Sampaio (1998).

Tabela 2 – Prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp. em machos de cativeiro (GI-M), fêmeas de cativeiro (GI-F), machos recém-capturados (GII-M) e fêmeas recém-capturadas (GII-F).

Grupo e subgrupo	n	Negativos para <i>Hepatozoon</i> sp.	Positivos para <i>Hepatozoon</i> sp.	Prevalência (%)
GI-M	11	11	0	0
GI-F	12	12	0	0
GII-M	30	19	11	36,7
GII-F	30	18	12	40,0
Sub total GI	23	23	0	0
Sub total GII	60	37	23	38,3

A prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp. em *C. durissus* encontrada para animais do GII (recém-capturados) foi muito superior aos 11% encontrado por Pessoa et al. (1974a).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a prevalência encontrada em machos recém-capturados (GII-M) e fêmeas recém capturadas (GII-F), o mesmo foi observado por Oppliger et al. (1996), Salakij et al. (2002) e Madsen et al. (2005), sugerindo que o parasitismo por *Hepatozoon* sp. não tem relação com o sexo do animal.

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp.: ela é nula entre os animais de cativeiro (GI) que, por seu lado apresentam uma prevalência de infecção inferior ao dos animais recém-capturados (GII). Este fato pode estar relacionado à rigidez sanitária relativa ao controle de vetores, hospedeiros intermediários e alimentação a que estão submetidos os animais de cativeiro, como preconizado por Wozniak (1998) para evitar a transmissão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Primeiro relato da prevalência de parasitismo por *Hepatozoon* sp. em *C. durissus* no estado de Minas Gerais

A Tabela 2 mostra a prevalência de parasitismo por *Hepatozoon* sp. nos animais utilizados neste experimento.

de *Hepatozoon* sp. aos animais livres da infecção.

Por outro lado, todos os animais de cativeiro (GI) são adultos, apresentam idade avançada e foram capturados na natureza; logo, tiveram a possibilidade de entrar contato com vetores e hospedeiros intermediários e, por conseguinte, serem infectados por *Hepatozoon* sp. Segundo Lowichick e Yaeger (1987), DeBiasi et al. (1989), Sorci (1995), Madsen et al. (2005), serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp. mantêm a infecção e níveis de parasitemia por longos períodos. A ausência de animais cativos parasitados pode estar relacionada à influência negativa do parasitismo por *Hepatozoon* sp. na longevidade das serpentes como relatado por Madsen (2005), ou seja, aqueles animais possivelmente infectados na natureza não sobreviveram no cativeiro até a idade média da amostra considerada.

4.2. Valores hematológicos normais de *C. durissus*

A hematologia é uma das ferramentas utilizadas na avaliação do estado de saúde

de répteis (Dawson e Bortolotti, 1997; Canfield, 1998). Nestes animais a contagem de células brancas e vermelhas é influenciada por fatores tais como espécie, idade, sexo, estado nutricional, condições ambientais e parasitismo (Carmichael e Petcher, 1945; Pienaar, 1962; Al-Badry e Nuzhy, 1982; Frye, 1991; Salakij et al., 2002).

Devido a falta de valores hematológicos de *C. durissus* no Brasil, foi preciso gerar esses

dados para possibilitar as comparações entre os grupos estudados. Os intervalos considerados normais foram obtidos a partir dos valores médios dos hemogramas de machos de cativeiro (GI-M) e fêmeas de cativeiro (GI-F).

A Tabela 3 mostra o eritrograma, porcentagem de policromatófilos, contagem total de trombócitos, contagem total de leucócitos e valores de proteína plasmática total dos animais de cativeiro (GI).

Tabela 3 – Valores hematológicos normais de *C. durissus*.

Grupo	Eritr.	VG	Hb	VGM	HGM	CHGM	Policr.	Tromb.	Leucóc.	PTP
GI-M	0,62	28,59	8,75	466,25	142,89	30,72	0,20	13,15	12,94	4,35
	\pm 0,08	\pm 2,88	\pm 0,91	\pm 50,05	\pm 16,53	\pm 2,73	\pm 0,16	\pm 2,81	\pm 4,07	\pm 0,80
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
GI-F	0,64	30,13	9,06	478,65	142,61	30,04	0,26	13,90	15,98	5,43
	\pm 0,09	\pm 2,91	\pm 1,24	\pm 61,25	\pm 9,51	\pm 2,55	\pm 0,32	\pm 3,75	\pm 3,38	\pm 1,37
	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a

Média e desvio padrão dos valores de Eritrócitos (Eritr - $10^6/\text{mm}^3$), Volume Globular (VG - %), Hemoglobina (Hb - g/dl), Volume Globular Médio (VGM - fl), Hemoglobina Globular Média (HGM - pg), Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM - %), Policromatófilos (Policr. - %), Trombócitos (Tromb - $10^3/\text{mm}^3$), Leucócitos (Leucó - $10^3/\text{mm}^3$) e Proteína Plasmática Total (PPT - g/dl) em machos de cativeiro (GI-M) e fêmeas de cativeiro (GI-F).

Comparação das médias dos valores hematológicos entre diferentes sexos: valores com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os valores de eritrócitos, VG, Hb, VGM, HGM e CHGM estão dentro dos intervalos hematológicos de referência para *Crotalus atrox* (Parker e McCoy, 1977) e *Crotalus cerastes* (MacMahon e Hamer, 1975) e se assemelham aos valores encontrados para *Ophiophagus hannah* (Salakij et al., 2002). Os valores de Eritrócitos e Hb são também semelhantes aos de outras serpentes do gênero *Bothrops* (Troiano et al., 2000).

Os valores de leucócitos estão dentro dos intervalos de referência para crotalíneos das espécies *C. cerastes* (MacMahon e Hamer, 1975), *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi* (Troiano et al., 2000), para elapídeos *Ophiophagus hannah* (Salakij et al., 2002) e para os bóideos *Python regius* (Jhonson e Benson, 1996) e *Boa constrictor* (Roskopf et al., 1982).

Os valores de proteína plasmática total estão dentro dos valores de referência

obtidos para colubrídeos *Malpolon monspessulanus*, *Coranella girondica*, *Elaphe hippocrepis* e *Macroprodonton cuculatus* (Palacios et al., 1972), para os elapídeos *Notechis scutatus* (Board et al., 1977) e *Ophiophagus hannah* (Salakij et al., 2002) e para os bóideos *Python regius* (Jhonson e Benson, 1996) e *Boa constrictor* (Roskopf et al., 1982).

As médias das porcentagens de policromatófilos são semelhantes às encontradas por Alleman (1999) em *Crotalus adamanteus*, e aos valores encontrados por Pienaar (1962) para *Causus rhombeatus* e *Ablabophis rufulus*.

A contagem de trombócitos está dentro dos valores de referência obtidos por Pienaar (1962) em *Naja nigricollis* e *Crotaphopeltis hotamboia*.

As médias encontradas para leucócitos diferem de maneira estatisticamente significativas entre machos e fêmeas, apresentando-se mais elevadas no último grupo. Variações ligadas ao sexo já foram discutidas por autores como Pieenar (1962) e Frye (1991). Entretanto, as médias de ambos os grupos experimentais apresentam-se dentro do esperado para serpentes saudáveis.

4.3. Comparações das médias de parasitemia, eritrograma, policromatófilos, trombócitos, leucócitos e proteína plasmática total entre serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp. e serpentes não parasitadas.

A Tabela 4 mostra as comparações das médias de parasitemia, eritrograma, policromatófilos, contagem total de trombócitos, contagem total de leucócitos e valores de proteína plasmática total entre serpentes de cativeiro, serpentes recém-capturadas não parasitadas e serpentes recém-capturadas parasitadas por *Hepatozoon* sp.

Os grupos de serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp. (GII-Mp e GII-Fp) (Figura 3a;b) quando comparados com os grupos de animais negativos de seus respectivos sexos (GI-M, GII-Mn e GI-F e GII-Fn) apresentaram um aumento estatisticamente significativo na porcentagem média de policromatófilos. Como esperado, foi encontrada uma correlação positiva entre parasitemia e porcentagem de policromatófilos ($r = 0,55$, $P < 0,01$, $N = 83$); o mesmo foi observado por Oppliger et al. (1996) em lagartos parasitados por hemogregarinas. Tal aumento de policromatófilos pode estar ligado à necessidade do organismo em compensar a diminuição da oxigenação, relacionada à perda de hemoglobina causada pela destruição de eritrócitos, induzida pelo parasito (Wozniak et al., 1996) ou pelo consumo de hemoglobina pelos gamontes intra-eritrocitários (Figura 3c; d) como descrito por Salakij et al. (2002) e Madsen et al. (2005).

A elevação da taxa de produção de hemácias, traduzida pelo aumento da

porcentagem de policromatófilos (Figura 3e) na circulação, justifica as discretas elevações observadas nas médias de Eritrócitos, VG e Hb de machos e fêmeas parasitados (GII-Mp e GII-Fp) quando comparadas com as médias dos animais recém-capturados de seus respectivos sexos, não parasitados (GII-Mn e GII-Fn), corroborando as observações feitas por Dawson e Bortolotti (1997) e por Salakij et al. (2002), e demonstrando a capacidade do organismo dessas serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp. de se sobrepor a um possível quadro de anemia.

O parasitismo por *Hepatozoon* sp. não resultou em um quadro de anemia nos animais pesquisados, como foi demonstrado por Al-Badry et al. (1991) em seu experimento. Alterações drásticas no perfil hematológico e no estado clínico de serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp. têm sido relatadas, na maioria das vezes, quando estas são infectadas experimentalmente por espécies exóticas desse parasito (Pessoa et al., 1974b; Wozniak et al., 1994a; Wozniak et al., 1994b). As discretas alterações no perfil hematológico das serpentes (GII-Mp e GII-Fp) parasitadas por *Hepatozoon* sp., observadas neste experimento, sugerem que os parasitos encontrados sejam espécies que infectam naturalmente *C. durissus* e que, por isto, conseguem estabelecer um equilíbrio com o hospedeiro e manter a infecção de forma crônica e sub-clínica. O mesmo foi observado por alguns pesquisadores em outras espécies de serpentes (Wozniak e Telford, 1991; Wozniak et al., 1994a; Nadler e Miller, 1984). Possivelmente, a baixa parasitemia média verificada nos grupos parasitados (GII-Mp e GII-Fp), não foi suficiente para causar desvios pronunciados em seus perfis hematológicos.

Foi demonstrada diferença estatisticamente significativa na porcentagem média de policromatófilos entre machos e fêmeas parasitados. A média mais elevada no grupo dos machos pode ser justificada pela porcentagem média de parasitemia também superior neste grupo se comparado com o grupo das fêmeas parasitadas, conforme descrito anteriormente.

Tabela 4 – Comparação das médias de parasitemia e hemograma entre machos e fêmeas de *C. durissus* parasitados e não parasitados por *Hepatozoon* sp.

Grupos	Parasit. (%)	Eritr. ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	VG (%)	Hb (g/dl)	VGM (fl)	HGM (pg)	CHGM (%)	Politr. (%)	Trombócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	PPT (g/dl)
GI-M	0a	0,62±0,08a	28,59±2,88a	8,75±0,91a	466,25±50,05a	142,89±16,53a	30,72±2,73a	0,20±0,16a	13,15±2,81a	12,94±4,07a	4,35±0,80a
GII-Mn	0a	0,58±0,15a	27,84±6,07a	7,87±1,53a	487,26±59,75a	138,63±17,95a	28,59±3,05a	0,28±0,39a	17,4±5,75b	16,62±4,24b	4,57±1,0a
GII-Mp	1,25±1,0b	0,61±0,15a	28,18±5,7a	8,59±1,8a	474,41±71,54a	143,81±16,55a	30,56±3,08a	1,98±1,36b	13,46±5,55ab	15,21±4,53b	4,69±0,89a
GI-F	0a	0,64±0,09a	30,13±2,91a	9,06±1,24a	478,65±61,25a	142,61±9,51a	30,04±2,55a	0,26±0,32a	16,00±6,48ab	18,12±6,16b	5,03±1,58a
GII-Fn	0a	0,56±0,13a	26,44±6,91a	7,55±1,45a	479,59±131,85a	136,58±21,67a	29,34±4,85a	0,17±0,26a	15,09±4,09ab	17,67±6,11b	5,05±0,97a
GII-Fp	0,73±0,55 _c	0,58±0,07a	26,38±3,02a	8,20±1,14a	452,52±36,80a	140,66±15,99a	31,17±3,59a	0,73±0,92c	13,90±3,75a	15,98±3,38b	5,43±1,37a

Parasitemia (Parasit - %), Eritrócitos (Eritr - $10^9/\text{mm}^3$), Volume Globular (VG - %), Hemoglobina (Hb - g/dl), Volume Globular Médio (VGM - fl), Hemoglobina Globular Média (HGM - pg), Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM - %), Policromatófilos (Politr. - %), trombócitos ($10^3/\text{mm}^3$), Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$) e Proteína Total Plasmática (PTP - g/dl) entre machos de cativo (GI-M), machos recém-capturados não parasitados (GII-Mn) e machos recém-capturados parasitados por *Hepatozoon* sp. (GII-Mp); e entre fêmeas de cativo (GI-F), fêmeas recém-capturadas não parasitadas (GII-Fn) e fêmeas recém-capturadas parasitadas por *Hepatozoon* sp. (GII-Fp). Valores com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de proteína plasmática total entre os grupos de serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp. e os grupos não parasitados.

A diferença estatisticamente significativa encontrada na contagem de leucócitos entre animais recém capturados e animais de cativeiro pode estar relacionada ao sexo, às variações ambientais e à exposição aos diferentes estímulos antigênicos sofridos por esses animais na natureza. Salakij et al. (2002), relataram este mesmo tipo de

alteração, em seu estudo com *Ophiophagus hannah*.

4.4. Correlações e comparação das médias de peso, comprimento (rostro-anal) e Relação peso/comprimento (rostro-anal) entre animais parasitados por *Hepatozoon* sp. e animais livres da infecção.

A Tabela 5 mostra as comparações entre as médias de peso, comprimento e relações peso/comprimento entre os animais parasitados e os animais não parasitados. A relação peso/comprimento foi utilizada como medida de escore corporal.

Tabela 5 – Comparação das médias de peso, comprimento e relação peso comprimento entre *C. durissus* parasitadas e não parasitadas por *Hepatozoon* sp.

Infecção por <i>Hepatozoon</i> sp.	Sexo	n	Peso (g.)	Comprimento (cm.)	Peso/Comprimento (g./cm.)
Negativo	Macho	30	979,50 ± 456,76 a	109,46 ± 13,59 a	8,62 ± 3,05 a
Positivo	Macho	11	732,73 ± 274,99 b	102,12 ± 9,31 a	7,02 ± 2,04 a
Negativo	Fêmea	30	1071,93 ± 690,41 a	105,97 ± 15,14 a	9,50 ± 4,97 a
Positivo	Fêmea	12	566,23 ± 133,13 b	100,72 ± 4,41 a	5,62 ± 1,27 b

Valores com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o peso médio das serpentes parasitadas por *Hepatozoon* sp. e o das serpentes não parasitadas, em ambos os sexos. As serpentes parasitadas apresentaram médias de peso mais baixas quando comparadas com as médias de animais não parasitados. Na comparação entre fêmeas parasitadas e fêmeas não parasitadas ocorreu uma diferença estatisticamente significativa na relação peso/comprimento. Apesar de não apresentarem significância estatística, as médias de comprimento e relação peso/comprimento foram inferiores em animais parasitados por *Hepatozoon* sp., em ambos os sexos.

As observações são reforçadas pela existência de correlação negativa entre parasitemia e peso ($r = -0,26$, $P < 0,05$, $N =$

83); entre parasitemia e comprimento ($r = -0,22$, $P < 0,05$, $N = 83$); e entre parasitemia e relação peso/comprimento ($r = -0,26$, $P < 0,05$, $N = 83$).

Levando-se em conta que em serpentes o tamanho e o peso são fortes indicativos de sua idade (Madsen e Shine, 2000) e que a média de parasitemia por *Hepatozoon* sp. mantém-se por longo período de tempo (Lowichick e Yaeger, 1987; DeBiasi et al., 1989; Sorci, 1995; Madsen et al., 2005), pode-se inferir que os dados relativos a parasitemia, peso e comprimento, indicam que serpentes maiores e mais velhas possuem cargas parasitárias inferiores às menores e mais jovens, sugerindo que somente serpentes com baixas cargas parasitárias são capazes de sobreviverem até idades avançadas (Madsen et al., 2005).

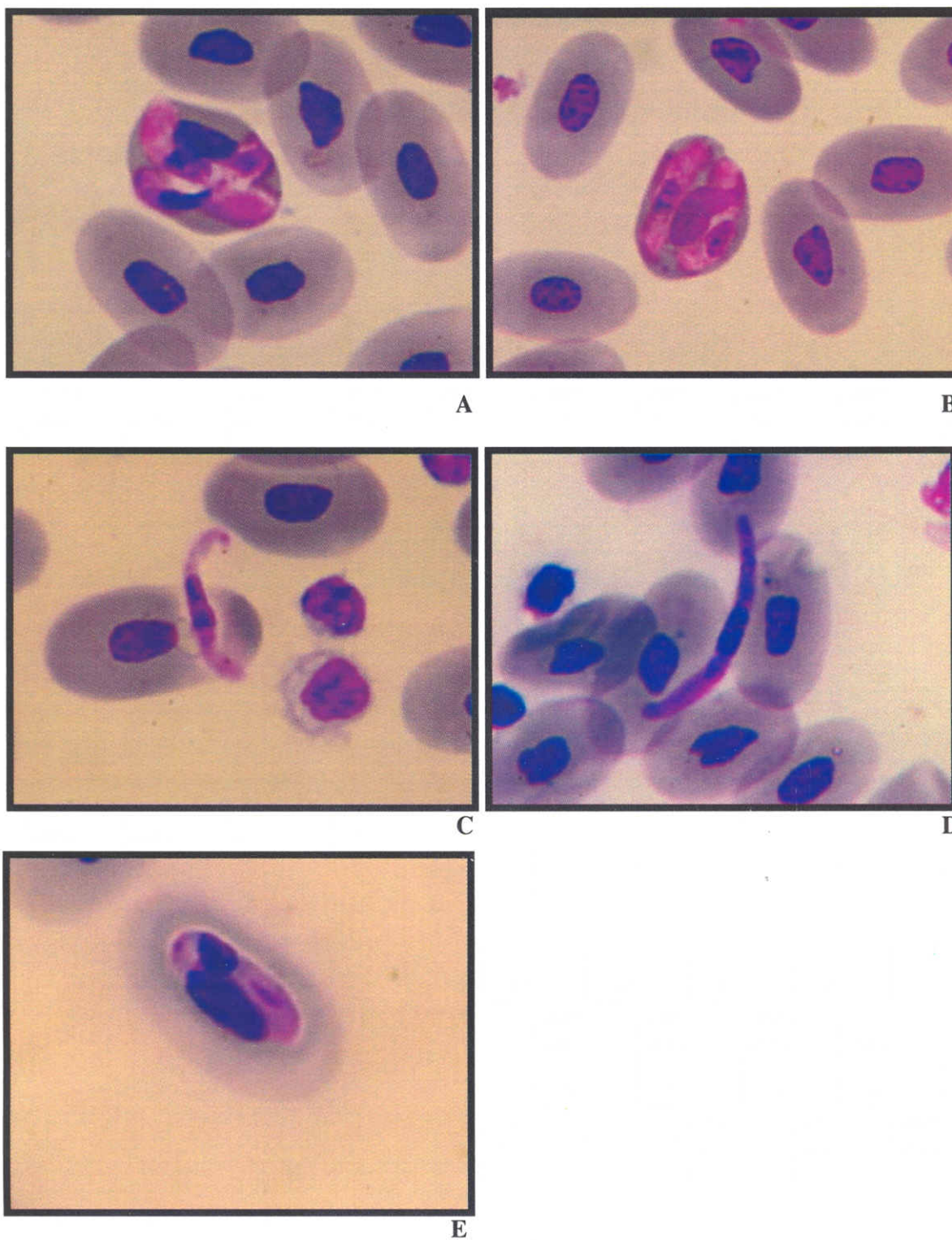


Figura 1 – Avaliação microscópica de lâminas de esfregaço sanguíneo de serpentes *C. durissus* parasitadas por *Hepatozoon* sp.

- a,b) Infecção dupla, dois gamontes do parasito no interior de um eritrócito;
 - c,d) Vermículos de *Hepatozoon* sp. livres no plasma;
 - e) Formação de cápsula ao redor do gamonte de *Hepatozoon* sp.
- Coloração segundo Rosenfeld (1947). Aumento de 1000X.



A



B



C



D



E

Figura 2 – Manipulação de serpentes *C. durissus*.
a) Contenção física com utilização de gancho e tubo plástico transparente;
b) Animal contido no interior do tubo na posição ventro-dorsal;
c,d) Punção de veia coccígea ventral;
e) Biometria - distância rostro-anal.

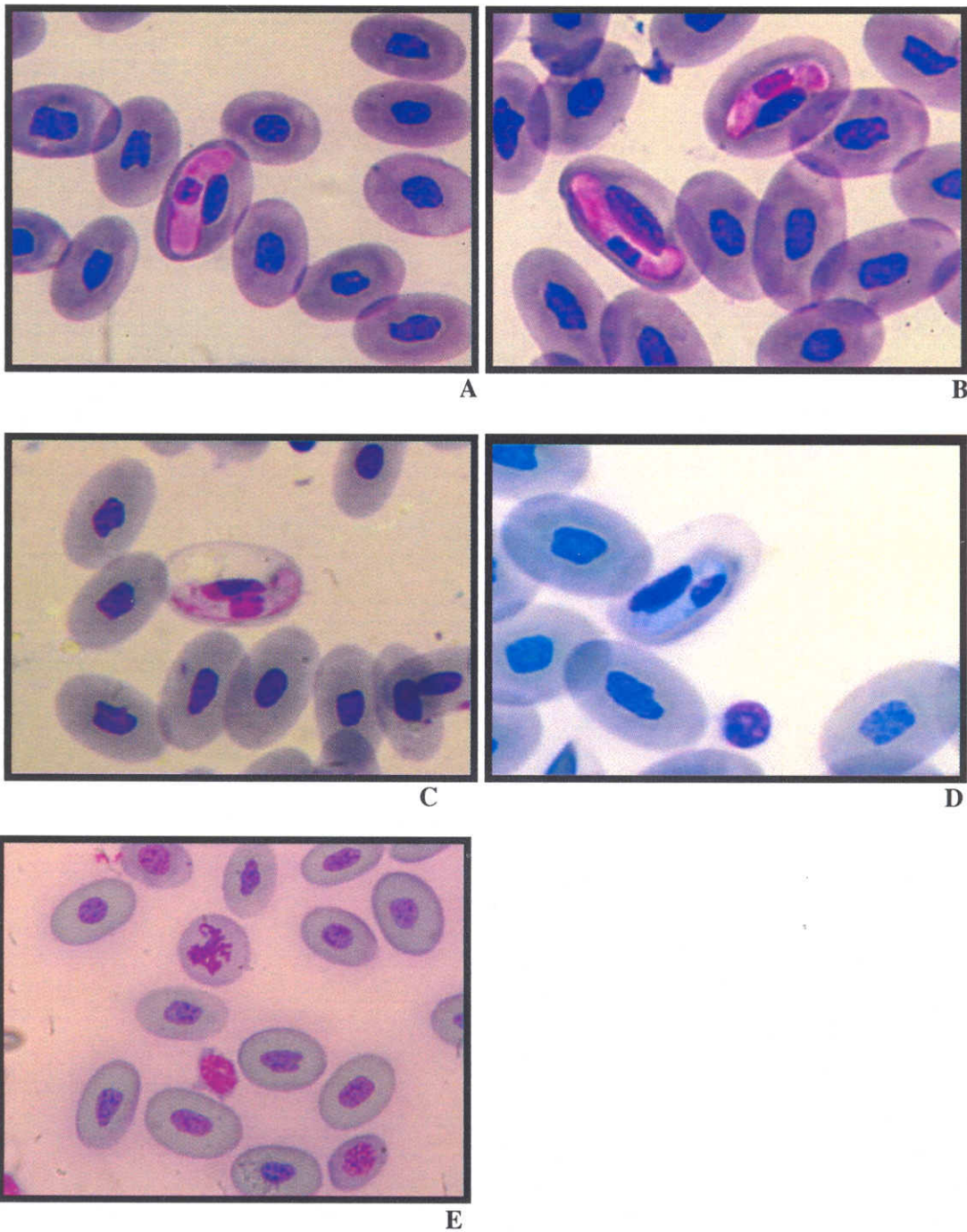


Figura 3 – Avaliação microscópica de lâminas de esfregaço sanguíneo de serpentes *C. durissus* parasitadas por *Hepatozoon* sp.

a, b) Gamontes de *Hepatozoon* sp. no interior de eritrócitos;

c, d) Eritrócitos apresentando rarefação de hemoglobina induzida pelo parasito;

e) Presença de policromatófilos e hemácia em mitose.

Coloração segundo Rosenfeld (1947). Aumento de 1000X

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, nas circunstâncias metodológicas em que foi realizado, permitem as seguintes conclusões:

- Não há diferença na prevalência de *Hepatozoon* sp. entre machos e fêmeas de *C. durissus* recém-capturadas;
- Fêmeas de *C. durissus* de cativeiro apresentam média de Leucócitos superior aos machos de cativeiro.
- Machos e Fêmeas de *C. durissus* parasitados por *Hepatozoon* sp. apresentaram aumento de policromatófilos em relação aos animais não parasitados;
- A média de parasitemia é superior em machos de *C. durissus* quando comparado com as fêmeas da mesma espécie;
- Há diferença entre o peso médio de *C. durissus* parasitadas por *Hepatozoon* sp. e não parasitadas;
- Constatadas correlações negativas entre peso, comprimento, relação/peso comprimento e porcentagem parasitemia;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BADRY, K. S.; NUZHI, S. Hematological and biochemical parameters in active and hibernating sand vipers. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 74A, n. 1, p. 137-141, 1983.
- AL-BADRY, K. S.; TAHA, H. M.; BASHTAR, A-R; ABDEL-GHAFFAR, O. Physiological changes associated with ophidian hepatozoonosis I. Hematological parameters. *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.*, v. 5, p. 333-350, 1991.
- ALLEMAN, A. R.; JACOBSON, E. R.; RASKIN, R. E. Morphologic, cytochemical, staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Am. J. Vet. Res.*, v. 60, n. 4, p. 507-514, 1999.
- ALLISON, B.; DESSER, S. S. Developmental stages of *Hepatozoon lygosomarum* (Doré, 1919) comb. n. (Protozoa: Haemogregarinidae), a parasite of a New Zealand skink, *Leiopisma nigriplantare*. *J. Parasitol.*, v. 67, p. 852-858, 1981.
- ALTLAND, P. D.; BRACE, K. C. Red cell life span in the turtle and toad. *Am. J. Physiol.*, v. 203, p. 1188-1190, 1962.
- ARANTES, J. V. *Haemogregarina cyclagrasii* n. sp. parasita da serpente *Cyclagrasia gigas* (Duméril; Bribon, 1854). *Rev. Biol. Hyg. S. Paulo*, v. 5, p. 9, 1934.
- AYALA, S. C. Hemogregarine from sandfly infecting both lizards and snakes. *J. Parasitol.*, v. 56, n. 2, p. 387-388, 1970.
- BALL, G. H.; CHAO J.; TELFORD JUNIOR, S. R. The life history of *Hepatozoon rarefaciens* (Sambon and Seligmann, 1907) from *Drymarchon corais* (Colubridae), and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae). *J. Parasitol.*, v. 14, n. 5, p. 198-210, 1967.
- BALL, G. H.; CHAO J.; TELFORD JUNIOR, S. R. *Hepatozoon fusifex* sp. n., a hemogregarine from *boa constrictor* producing marked morphological changes in infected erythrocytes. *J. Parasitol.*, v. 55, n. 4, p. 800-813, 1969.
- BARTA, J. R. Phylogenetic analysis of the class Sporozoa (Phylum Apicomplexa, Levine, 1970): evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. *J. Parasitol.*, v. 75, p. 195-206, 1989.

BASHTAR, A. R.; ABDEL-GHAFFAR, F. A.; SHAZLY, M. A. Developmental stages of *Hepatozoon gracilis* (Wenyon, 1909) comb. nov. A parasite of the egyptian skink, *Mabuya quinquetaeniata*. *Parasitol. Res.*, v. 73, p. 507-514, 1987.

BOARD, P.; ROBERTS, J.; SHINE, R. Studies on blood of Australian elapid snakes – I Morphology and composition. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 56B, p. 353-356, 1977.

BRACE, K. C.; ALTLAND, P. D. Red cell survival in the turtle. *Am. J. Physiol.*, v. 183, p. 91-94, 1955.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos*. Brasília, 1998. 131p.

BUSH, M.; SMELLER, J. Blood collection e injection techniques in snakes. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v. 73, p. 211-21, 1978.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. *The venomous reptiles of Latin America*. New York: Cornell University Press, 1989. p. 338-344.

CAMPBELL, T. W. Hematology of exotic animals. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v. 13, n. 6, p. 950-956, 1991.

CANFIELD, P. J. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Aust. Vet. J.*, v. 12, n. 12, p. 793-800, 1998.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. de S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2003. 468p.

CARINI, A. Sobre um hemogregarina de *Philodryas schottii* (Schlegel). *Rev. Med. S. Paulo*, v. 23, p. 339-340, 1910.

CARINI, A. Contribuição ao estudo das hemogregarinas de serpentes da família boídeos. *Arq. Biol.*, v. 31, p. 61-63, 1947.

CARMICHAEL, E. B.; PETCHER, P. W. Constituents of the blood of the hibernating and normal rattlesnake, *Crotalus horridus*. *J. Biol. Chem.*, v. 161, p. 693-696, 1945.

CLARK, G. W.; BRADFORD, J. Blood parasites of some reptiles of the Pacific northwest. *J. Protozool.*, v. 16, p.578-581, 1969.

CLINE, M. J.; WALDMANN, T. A. Effect of temperature on red blood cell survival in the alligator. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, v. 111, p. 716-718, 1962.

CUSTER, R. S.; BUSH, M. Physiological and acid-base measures of Gopher Snakes during ketamine or halothane-nitrous oxide anesthesia. *J. Vet. Med. Assoc.*, v. 177, n. 9, 1980.

DAWSON, R. D.; BORTOLOTTI, G. R. Are avian hematocrits indicative of condition? American Kestrels as a model. *J. Wildl. Manage.*, v. 61, n. 4, p. 1297-1306, 1997.

DeBIASI, P.; CARDOSO JUNIOR, R. P.; SANTOS, S. M. A. Presença de *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) – Coccidia, Hemogregarinidae – em exemplar de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) – Serpentes Viperidae, Crotalinae – mantido em cativeiro. *Mem. Inst. Butantan*, v. 51, n. 3, p. 117-121, 1989.

DOTSON, T. K.; RAMSAY, E. C.; BOUNOUS, D. I. A color atlas of blood cells of the yellow rat snake. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v. 17, n. 8, p. 1013-1016, 1995.

FRYE, F. L. Hematology as applied to clinical reptile medicine. In: _____. *Biomedical and surgical, aspects of captive reptile husbandary*. 2 ed. Malabar: Krieger, 1991, cap. 7, p. 211-227.

HOGE, A. R.; ROMANO, H. S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan*, v. 42-43, p. 373-496, 1981.

- HAWKEY, C. M.; DENNETT, T. B. In: _____. *A Color Atlas of Comparative Veterinary Haematology. Normal and Abnormal Blood Cells in Mammals, Birds and Reptiles*. London: Wolfe Publishing, 1989, 217 p.
- HULL, R. W.; CAMIN, J. H. Haemogregarines in snakes: The incidence of erythrocytic stages. *J. Parasitol.*, v. 46, p. 515-523, 1960.
- JACOBSON, E. R. Blood collection techniques in reptiles: laboratory investigations. In: FOWLER, M. E. *Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy*. 3 ed. Philadelphia: Saunders, 1993, p. 144-152.
- JOHNSON, J. H.; BENSON, P. A. Laboratory reference values for a group of captive Ball Pythons (*Python regius*). *Am. J. Vet. Res.*, v. 57, n. 9, p. 1304-1307, 1996.
- LANDAU, I.; MICHEL, J. C.; CHABAUD, A. G.; BRYGOO, E. R. Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*; discussion sur les caractères fondamentaux d'un cycle de coccidie. *Z. Parasitenkd.*, v. 38, p. 250-270, 1972.
- LANGMANN, G. On haemosporidia in American reptiles and batrachians. *N. Y. Med. J.*, v. 69, p. 1-6, 1899.
- LEVINE, N. D. Some corrections in haemogregarine (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Protozool.*, v. 29, p. 601-603, 1982.
- LEWIS, J. E.; WAGNER, E. D. *Hepatozoon Sauromali* sp. n., a hemogregarine from the Chuckwalla (*Sauromalus* spp.) with notes on the life history. *J. Parasitol.*, v. 50, p. 11-14, 1964.
- LOWICHNIK, A.; LANNERS, N. L.; LOWRIE, R. C.; MEINERS, N. E. Gametogenesis and sporogony of *Hepatozoon mocassini* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in an experimental mosquito host. *J. Eukaryot. Microbiol.*, v. 40, p. 287-297, 1993.
- LOWICHNIK, A.; YAEGER, R. G. Ecological aspects of snake hemogregarine infections from two habitats in southeastern Louisiana. *J. Parasitol.*, v. 73, n. 6, p. 1109-1115, 1987.
- LUTZ, A. Ueber die Drepanidemder Schlangen. Ein Beitrag zur Kenntnis der Hämosporidien. *Zbl. Bakt., Orig.*, v. 29, p. 309-397, 1901.
- MACKERRAS, M. J. The life history of a *Hepatozoon* (Sporozoa: Adeleidea) of varanide lizards in Australia. *Aust. J. Zool.*, v. 10, p. 35-44, 1962.
- McHANON, J. A.; HAMER, A. H. Hematology of the Sidewinder (*Crotalus cerastes*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 51A, p. 53-58, 1975.
- MADER, D. R. Normal hematology of reptiles. In: FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5 ed. Blackburg: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, cap. 175, p. 1126-1132.
- MADSEN, T.; SHINE, R. Silver spoons and snakes sizes: prey availability early in life influences long-term growth rates of free-ranging pythons. *J. Anim. Ecol.*, v. 69, p. 952-258, 2000.
- MADSEN, T.; UJVARI, B.; OLSSON, M. Old Pythons stay fit; effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. *Oecologia*, v. 142, n. 3, p. 407-412, 2005.
- MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A.; SAZIMA, I. *Serpentes da Mata Atlântica. Guia Ilustrado para a Serra do Mar*. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 184p.
- MOÇO, T. C.; O'DWYER, L. H.; VILELA, F. C.; BARRELLA, T. C.; SILVA, R. J. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 10, n. 8, p. 1169-1176, 2002.

- MURPHY, J. B. A method of immobilizing venomous snakes at Dallas Zoo. *Int. Zoo. Yearb.*, v. 11, p. 233, 1971.
- NADLER, S. A.; MILLER, J. H. A redescription of *Hepatozoon mocassini* (Laveran, 1902) n. comb. From *Agkistrodon piscivorus leucostoma* Troost, 1836. *J. Protozool.*, v. 31, p. 321-324, 1984.
- NATT, M. P.; HERRICK, C. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of chicken. *Poultry Sci.*, v. 31, p. 735-738, 1952.
- O'DWYER, L. H.; MOÇO, T. C.; SILVA, R. J. Description of the gamonts of a small species of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). *Parasitol. Res.*, v. 92, p. 110-112, 2004.
- OLSON G. A.; HESSLER, J. R.; FAITH, R. E. Techniques for blood collection and intravascular infusion of reptiles. *Lab. Anim. Sci.*, v. 25, p. 783-786, 1975.
- OPPLIGER, A.; CÉLÉRIER, M. L.; CLOBERT, J. Physiological and behavior changes in common lizards parasitized by Haemogregarines. *Parasitology*, v. 113, p. 433-438, 1996.
- PALACIOS, L.; PLANAS, J.; PALAUS. Valores hemáticos en varias especies de colubrídeos (Serpentes). *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat.(Biol.)*, v. 70, p. 137-151, 1972.
- PAPERNA, I.; LAINSON, R. *Hepatozoon* cf. *terzii* (Sambon e Seligman, 1907) infection in the snake *Boa constrictor constrictor* from north Brazil: transmission to the mosquito *Culex quinquefasciatus* and the lizard *Tropidurus torquatus*. *Parasite*, v. 11, n. 2, p. 175-181, 2004.
- PARKER, O. S.; McCOY, R. H. Some blood values of the Diamond-back rattlesnake (*Crotalus atrox*) from south Texas. *J. Wildl. Dis.*, v. 13, p. 269-272, 1977.
- PESSOA, S. B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. I: hemogregarinas de algumas espécies de serpentes da família Colubridae. *Rev. Bras. Biol.*, v. 27, n. 1, p. 34-45, 1967a.
- PESSOA, S. B. Nota sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras.V: hemogregarinas da cascavel. *Rev. Bras. Biol.*, v. 27, p. 381-384, 1967b.
- PESSOA, S. B.; SACCHETA, L.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. X: Hemogregarina *Hydrodynastes Gigas* (Duméril et Bibron) e sua evolução. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.*, v. 12, p. 197-200, 1970.
- PESSOA, S. B.; DE BIASE, P. Considerações taxonômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras. *Mem. Inst. Butantan*, v. 37, p. 291-307, 1973.
- PESSOA, S. B.; DE BIASE, P.; PUORTO, G. Notas sobre frequência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. *Mem. Inst. Butantan*, v. 18, p. 69-118, 1974a
- PESSOA, S. B.; DE BIASE, P.; PUORTO, G. Transferência do *Hepatozoon tupinambis* parasita do lagarto *Tupinambis teguixin* para a serpente cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) por intermédio do mosquito *Culex fatigans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 72, p. 295-299, 1974b.
- PHISALIX, M. Les hémogrégarines de *Crotalus terrificus*. *Lau. Bull. Soc. Pathol. Exot.*, v. 24, p. 190-194, 1931.
- PIENAAR, U. de V. *Haematology of some south africa reptiles*. Johannesburg: University of Witwatersrand, 1962, 299 p.
- ROBIN, L.A. Cycle évolutif d'un *Hepatozoon* de *Gecko verticillatus*. *Annales de l'Institute Pasteur.*, v. 56, p. 376-394, 1936.

- RODMAN, G. P.; EBAUGH, F. G.; FOX, M. R. Jr. The life span of the red blood cell and the red blood cell volume in the chicken, pigeon and duck as estimated by the use of $\text{Na}^{251}\text{CrO}_4$, with observations on red cell turnover rate in the mammal, bird and reptile. *Blood*, v. 12, p. 355-366, 1957.
- ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica: Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, v. 20, p. 329-334, 1947.
- ROSSKOPF JUNIOR, W. J.; WOERPEL R. J.; FUDGE, A.; PITTS, B. J.; WHITTAKER, D. A practical method of performing venipuncture in snakes. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v. 77, p. 820-821, 1982.
- ROSSKOPF JUNIOR, W. J.; WOERPEL R. J.; YANOFF, S. R. Normal hemogram and blood chemistry values for *Boa constrictor* and Pythons. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v. 77, p. 822-823, 1982.
- SALAKIJ, C.; SALAKIJ, J.; APIBAL, S.; NARKKONG, N-A; CHANHOME, L.; ROCHANAPAT, N. Hematology, morphology, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood cells in King Cobra (*Ophiophagus hannah*). *Vet. Clin. Pathol.*, v. 31, n. 3, p. 116-126, 2002.
- SAMBON, L. H.; SELIGMAN, C. G. Description of five new species of haemogregarines from snakes. *Proc. Zool. Soc. London*, p. 283-284, 1908.
- SAMOUR H. J.; RISLEY, D.; MARCH, T.; SAVAGE, B.; NIEVA, O.; JONES, D. M. Blood sampling techniques in reptiles. *Vet. Rec.*, v. 114, p. 472-476, 1984.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEP-MVZ., 1998, 221p.
- SCHOUTEN, G. B. *Haemogregarina migonei* n. sp. hematozoário de ofídio, *Cyclagrasia gigas* D e B. *Rev. Soc. Cient. Paraguay*, v. 3, p. 145-157, 1934.
- SMITH, T. G.; DESSER, S. S.; MARTIN, D. S. The development of *Hepatozoon sipedon* n. sp. (Apicomplexa: Adeleina: hepatozoidae) in its natural host, Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), the culicine vectors, *Culex pipiens* and *Culex territans* and an intermediate host, the northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Parasitol. Res.*, v. 80, p. 559-568, 1994.
- SMITH, T. G. The Genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J. Parasitol.*, v. 82, n. 4, p. 565-585, 1996.
- SMITH, T. G.; KOPKO S. H.; DESSER, S. S. Life cycles, morphological characteristics, and host specificity of *Hepatozoon* species infecting eastern garter snakes from Ontario. *Can. J. Zool.*, v. 74, p. 1850-1856, 1996.
- SORCI, G. Repeated measurements of blood parasite levels reveal limited ability for host recovery in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *J. Parasitol.*, v. 81, n. 5, p. 825-827, 1995.
- STEBBENS, W. E.; JOHNSTON, M. R. L. The ultrastructure of a haemogregarine parasitic in *Gehyra variegata* (Duméril and Bibron, 1836). *J. Parasitol.*, v. 57, p. 251-261, 1967.
- STEBBENS, W. E.; JOHNSTON, M. R. L. Cystic bodies schizonts associated with a haemogregarine (Sporozoa) parasitic in *Gehyra variegata* (Reptilia:Gekkonidae). *J. Parasitol.*, v. 54, p. 1151-1165, 1968.
- SYPEC, J. P.; BORYSENKO, M. Reptiles. In: ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. *Vertebrate blood cells*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988, p. 211-256
- TELFORD JUNIOR, S. R. Haemoparasites of reptiles. In: HOFF, G. L.; FRYE F. L.; JACOBSON, E. R. *Diseases of amphibians and reptiles*. New York: Plenum, 1984, p. 385-517.

- TELFORD JUNIOR, S. R.; ERNEST, J. A.; CLARK, A. M.; BUTLER, J. F. *Hepatozoon sauritus*: a polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in north Florida, with specific identity verified from genome. *J. Parasitol.*, v. 90, n. 2, p. 352-358, 2004.
- TROIANO, J. C.; VIDAL, J. C.; GOULD, E. F.; HEKER, J.; GOULD, J.; VOGT, A. U.; SIMONCINI, C.; AMANTINI, E.; ROODT, A. Hematological values of some *Bothrops* species (Ophidia – Crotalidae) in captivity. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 6, n. 2, 2000.
- UJVARI, B.; MADSEN, T.; OLSSON, M. High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. *J. Parasitol.*, v. 90, n. 3, p. 670-672, 2004.
- WILLETE-FRAHM, M. Blood collection techniques in amphibian and reptiles. In: KIRK R. *Kirk's Currents in Veterinary Therapy*. Philadelphia: Saunders, 1995, p. 1344-1348.
- WOZNIAK, E. J.; TELFORD JUNIOR, S. R.; DeNARDO, D. F.; McLAUGHLIN, G. L.; BUTLER, J. F. Granulomatous hepatitis associated with *Hepatozoon* sp. meronts in a southern water snake (*Nerodia fasciata pictiventris*). *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 29, n. 1, p. 68-71, 1988.
- WOZNIAK, E. J.; TELFORD JUNIOR, S. R. The fate of *Hepatozoon* species naturally infecting Florida back racers and watersnakes in potential mosquito and soft tick vectors, and histological evidence of pathogenicity in unnatural host species. *J. Parasitol.*, v. 21, n. 5, p. 511-516, 1991.
- WOZNIAK, E. J.; TELFORD JUNIOR, S. R.; McLAUGHLIN, G. L. Employment of the Polymerase Chain Reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarine and its application to preventative zoological medicine. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 25, n. 4, p. 538-547, 1994a.
- WOZNIAK, E. J.; McLAUGHLIN, G. L.; TELFORD JUNIOR, S. R. Description of the vertebrate stages of a hemogregarine species naturally infecting Mojave Desert Sidewinders (*Crotalus cerastes cerastes*). *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 25, n. 1, p. 103-110, 1994b.
- WOZNIAK, E. J.; KAZACOS, K. R.; TELFORD JUNIOR, S. R.; McLAUGHLIN, G. L. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. *Int. J. Parasitol.*, v. 26, n. 2, p. 141-146, 1996.