

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FRANK AUGUST DE OLIVEIRA TOLEDO

**ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO, PARASITOLÓGICO, TOXICOLÓGICO,
HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE *CROTALUS DURISSUS* DE VIDA
LIVRE EM MINAS GERAIS**

BELO HORIZONTE

2020

FRANK AUGUST DE OLIVEIRA TOLEDO

**ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO, PARASITOLÓGICO, TOXICOLÓGICO,
HEMATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE *CROTALUS DURISSUS* DE VIDA
LIVRE EM MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Patologia Animal

Orientação: Renato de Lima Santos

Co-orientação: Marcelo Pires N. de Carvalho
Tatiane Alves da Paixão

BELO HORIZONTE

2020

T649e Toledo, Frank August de Oliveira. 1987 -
Estudo anátomo - patológico, parasitológico, toxicológico, hematológico e bioquímico de
Crotalus durissus de vida livre em Minas Gerais/ Frank August de Oliveira Toledo. 2020.

94 f.il.

Orientador: Renato de Lima Santos
Coorientadores: Marcelo Pires Nogueira de Carvalho
Tatiane Alves da Paixão

Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
Área de concentração: Patologia Animal.
Inclui bibliografia.

1- *Crotalus durissus* – Serpentes - Teses - 2 - Animais de vida livre - Teses - 3 – Patologia animal - Teses- I – Santos, Renato de Lima – II – Carvalho, Marcelo Pires Nogueira de - III – Paixão, Tatiane Alves da - IV – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V – Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO FRANK AUGUST DE OLIVEIRA TOLEDO

Às 14:00 horas do dia **30 de abril de 2020**, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

Estudo anátomo-patológico, parasitológico, toxicológico, hematológico e bioquímico de *Crotalus durissus* de vida livre em Minas Gerais

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Patologia Animal**.

Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Renato de Lima Santos**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovado	Reprovado
Prof(a). Dr(a). Renato de Lima Santos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof(a). Dr(a). Marcelo Pires Nogueira de Carvalho	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof(a). Dr(a). Tatiane Alves da Paixão	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof(a). Dr(a). José Luiz Catão Dias	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): Aprovado
 Reprovado

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 01 volume encadernado da versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de abril de 2020.

Assinatura dos membros da banca:

Renato de Lima Santos
Tatiane Alves da Paixão
Marcelo Pires Nogueira de Carvalho
José Luiz Catão Dias

(Normas Regulamentares da defesa de dissertação no verso)
(Este documento não deverá conter rasuras e não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)

Dedico este trabalho ao meu Deus,
pois por Ele e para Ele todas as
coisas foram criadas.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado sabedoria e tranquilidade para enfrentar os desafios, por ter colocado pessoas especiais na minha vida e por Sua misericórdia.

Ao meu Senhor Jesus Cristo que me ensinou a amar, servir e perdoar. Que mesmo sendo como Deus, se esvaziou, se humilhou e morreu, para me dar vida.

À minha família pelo apoio e amor incondicional. Aos meus pais, Márcia e Nelson e ao meu irmão Michael. A minha tia Benedita Toledo (*in memoriam*) que nos deixou no início dessa caminhada.

À minha amada Aline que sempre me acompanha e me apoia. Ao seu amor e carinho sem fim. Te amo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Patologia Molecular pelo convívio e ajuda diária, pela troca de experiências e conhecimento, e principalmente pela amizade.

Aos demais colegas e funcionários da Escola de Veterinária que dão vida as instalações e sustentam a sua história.

À todos os colaboradores do projeto que permitiram a realização desse estudo. Ao Rômulo e a Juliana que me receberam na FUNED. Ao Philippe, a Morgana e ao professor Hudson do Departamento de Parasitologia do ICB. À professora Marília (EV-UFGM), ao Felipe e a professora Mariana (UFV), que se envolveram nas análises toxicológicas. Ao Pedro e a professora Fabíola do Laboratório de Patologia Clínica (EV-UFGM). Aos meus companheiros de necrópsia e coletas, Ayisa, Daniel, Pâmela e Izabela. Ao meu amigo Diego e ao professor Raphael Wenceslau pelo suporte e dicas nas análises estatísticas. Ao professor Marcelo pelas orientações, conhecimento compartilhado e tempo disponibilizado.

Ao meu professor e orientador Renato, pela paciência e ensinamentos. Por ser exemplo de dedicação e excelência profissional.

À professora Tatiane, por ter me recebido e acompanhado desde o apoio técnico. Por me mostrar que inteligência e empatia podem se unir.

Meu muito obrigado!

RESUMO

A literatura sobre a patologia e condição sanitária de *Crotalus durissus* é escassa, principalmente se tratando de animais de vida-livre. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a condição sanitária das *C. durissus* de vida-livre no estado de Minas Gerais, por meio de exames anatomopatológico, parasitológico, toxicológico, hematológico e bioquímico. Foram necropsiadas 96 serpentes durante o período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020. Dos 96 animais estudados, totalizou-se 54 fêmeas e 42 machos, 89 adultos e 7 filhotes. Quanto à procedência desses animais, a mesoregião Metropolitana de Belo Horizonte foi representada por 56% da amostragem (54/96). Em um total de 56 animais apresentando alguma lesão, 46 tinham gastrite granulomatosa associada aos ascaridídeos gástricos *Ophidascaris* sp. e *Hexametra* sp., que corresponderam a 47,91% da população estudada (46/96). Além disso, foram encontradas lesões associadas a protozoários (*Sarcocystes* sp., *Cryptosporidium* sp. e *Entamoeba invadens*), fungos (*Ophidiomyces ophiodiicola*), presença de hemoparasitos (*Hepatozoon* sp. e *Trypanosoma* sp.), dentre outras lesões não infecciosas. Quanto à avaliação residual dos metais pesados, observou-se que os machos apresentaram-se com maiores concentrações de alguns elementos, além de diferenças significativas entre regiões de procedência. Conclui-se que as serpentes *C. durissus*, mesmo em seus ambientes naturais, estão sujeitos a doenças de etiologias distintas e que esses animais podem servir como biomarcadores de contaminação ambiental para diferentes tipos de metais pesados.

Palavras-chave: Cascavéis; Diagnóstico; Salubridade; Bioacumulação.

ABSTRACT

Scientific information on pathology and sanitary conditions of *Crotalus durissus* is scarce, especially in free-ranging animals. Thus, the goal of this study was to evaluate health parameters of free-ranging in the state of Minas Gerais, through anatomopathological, parasitological, toxicological, and hematological examination. A total of 96 snakes were euthanized and necropsied from September 2019 to February 2020. There were 54 females and 42 males, 89 adults and 7 young. In relation to the origin, the metropolitan mesoregion of Belo Horizonte was represented by 56% of the animals (54/96). Most of the metazoan lesions observed were associated with both gastric ascaridids *Ophidascaris* sp. and *Hexametra* sp. Among the 56 animals with lesions, 46 had granulomatous gastritis corresponding to 47.91% in the studied population (46/96). In addition, lesions associated with protozoa (*Sarcocystis* sp., *Cryptosporidium* sp. and *Entamoeba invadens*), fungi (*Ophidiomyces ophiodiicola*), degenerative or traumatic, as well as the presence of hemoparasites (*Hepatozoon* sp. and *Trypanosoma* sp.) were also found. Males had higher concentrations of heavy metal residues and some elements were also statistically meaningful according to the geography. In conclusion, *C. durissus* even in their natural environments are subject to pathologies of different etiologies and these animals may serve as biological markers for different heavy metals.

Keywords: Rattlesnakes; Diagnosis; Salubrity; Bioaccumulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição de algumas espécies de cascavéis no continente americano. Serpentes *Crotalus durissus* é única espécie de cascavél encontrada na América do Sul. Fonte: Mecchi e Herrera, 2015..... 21
- Figura 2.** Características anatômicas das cascavéis. (A) Cabeça triangular com pupila elíptica, narina e fosseta loreal, e (B) presas retráteis. (C) A camuflagem é oliva e castanha com formas geométricas rombóides. (D) Principal particularidade das cascavéis é a presença do guizo na extremidade da cauda. Fonte: adaptado de Brasil, 2001..... 22
- Figura 3.** Etapas realizadas na FUNED. (A) Pesagem realizada em balança mecânica e (B) colheita de sangue com acesso pela veia coccígea ventral..... 34
- Figura 4.** Distribuição de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais utilizadas no estudo (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 38
- Figura 5.** Frequência de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da mesoregião de procedência e sexo (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 39
- Figura 6.** Frequência mensal de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da mesoregião de procedência (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 40
- Figura 7.** Frequência total de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais com ou sem lesão em função da mesoregião de procedência (n=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 41
- Figura 8.** Frequência de machos e fêmeas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais com ou sem lesão em função da mesoregião de procedência. (A) Frequência de machos com ou sem lesão por mesoregião (N=42). (B) Frequência de fêmeas com ou sem lesão por mesoregião (N=54). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 42
- Figura 9.** Frequência mensal de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais com ou sem lesão (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 43
- Figura 10.** Frequência de lesões em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sistema, órgão ou tecido afetado (N=108). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 43

- Figura 11.** Frequência de lesões em machos e fêmeas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sistema, órgão ou tecido afetado (N=108). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 44
- Figura 12.** Frequência de lesões infecciosas associadas a metazoários (LIAM), lesões infecciosas não metazoária (LINM) e lesões não infecciosas (LNI) em função do sexo em *Crotalus durissus* de vida livre do estado de Minas Gerais (N=108). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 44
- Figura 13.** Frequência de lesões infecciosas associadas a metazoários (LIAM) em função do sistema, órgão ou tecido afetado em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N = 67). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 45
- Figura 14.** Frequência de lesões infecciosas associadas a metazoários (LIAM) em função do diagnóstico morfológico em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N = 67). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$)..... 46
- Figura 15.** Lesões infecciosas associadas aos ascaridídeos gástricos, *Ophidascaris* sp. e *Hexameta* sp. em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Macroscopicamente o estômago com a superfície serosa irregular, com lesões nodulares e firmes. (B) À abertura, numerosos parasitos nematoides penetram lesão focal ulcerada e se fixam profundamente nas lesões nodulares. (C) Microscópicamente as lesões atingem as musculares. HE, escala = 500 µm. (D) Processo inflamatório granulomatoso, histi heterofílico, multifocal e intenso. HE escala = 100 µm. (E) Corte longitudinal revela cutícula rugosa dos parasitos. HE, escala = 500 µm. (F) Em corte transversal do parasito nota-se musculatura do tipo celomiaria. HE, escala = 250 µm..... 47
- Figura 16.** Lesões infecciosas associadas a metazoários em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. A-B) Serosite granulomatosa. (A) Serosa pulmonar com múltiplos granulomas irregulares e acastanhados. (B) Microscopicamente nota-se lesões lineares causadas por larvas de parasitos, acompanhadas de reação granulomatosa e mineralização. HE escala = 100 µm. C-D) Miosite por acantocéfalo. (C) Acantocéfalo encistado na superfície da intercostal. (D) Histologia da musculatura intercostal adjacente com reação inflamatória. HE, escala = 100 µm. E-F) Pneumonia associada a pentastomídeo. (E) Palidez multifocal do parênquima pulmonar e pentastomídeo em foco. (F) Corte histológico exibindo espessamento intersticial e reação inflamatória linfocitária e heterofílica. HE, escala = 100 µm..... 48
- Figura 17.** Frequência de lesões infecciosas não metazoárias (LINM) por sistema ou tecido afetado em *Crotalus durissus* de vida livre parasitadas no estado de Minas Gerais (N=25)..... 49

Figura 18. Lesões associadas ao *Sarcocystis* sp. em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Macroscopicamente, observa-se espessamento da mucosa com evidenciação das vilosidades intestinais. (B) Microscopicamente, há aumento da celularidade nas vilosidades, predominantemente na lâmina própria. HE, escala = 200 µm. (C) Zoítos em meio a reação inflamatória histiocitária. HE, escala = 50 µm. (D) Processo inflamatório crônico caracterizado por formação de granuloma. Há vacuolos intralésionais vazios e contendo cistos de *Sarcocystis* sp. HE, escala = 50 µm..... 50

Figura 19. Colite protozoal associada a *Cryptosporidium serpentis* em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Macroscopicamente, focalmente extensa, acentuada, necro-hemorrágica e ulcerativa no intestino grosso. (B) Microscopicamente, há aumento de celularidade com congestão, necrose e perda da continuidade epitelial. HE, escala = 200 µm. (C-D) Adjacente as áreas de necrose e inflamação é possível visualizar microorganismos protozoais de 2-3 µm de diâmetro aderidos à superfície luminal dos enterócitos, em meio a conteúdo mucoso e restos celulares. (C) Protozoários morfológicamente compatíveis com *C. serpentis* nos vilos intestinais. HE, escala = 50 µm. (D) Protozoários morfológicamente compatíveis com *C. serpentis* também podem ser observados nas criptas. HE, escala = 50 µm. (E) Apesar da intensa afinidade tintorial dos enterócitos pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) é possível visualizar os protozoários em meio ao muco e restos celulares. PAS, escala = 100 µm. (F) Maior aumento. PAS, 50 µm..... 50

Figura 20. Colite protozoal associada a *Entamoeba invadens* em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Macroscopicamente, lesão focalmente extensa, acentuada, necro-hemorrágica e com crostas. (B) Microscopicamente, há congestão, infiltrado inflamatório multifocal e restos celulares. HE, escala = 200 µm. (C) Periféricamente observa-se congestão, infiltrado inflamatório na submucosa, lamina própria e mucosa. HE, escala = 100 µm. (D) Ocasionalmente é visto na mucosa microorganismos protozoais de 7-14 µm, de aparência granular e discretamente vacuolizada, contendo núcleo único, pequeno, escuro e esférico. HE, escala = 50 µm. E-F) Cortes histológicos exibindo infiltrado inflamatório mais intenso tintorial do protozoário por coloração especial. (E) PAS, escala = 100 µm. (F) Maior aumento com protozoário em detalhe. PAS, escala = 50 µm..... 50

Figura 21. Lesões micóticas em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=7). (A) Macroscopicamente, há irregularidade nas escamas com encurtamento, escurecimento e ulceração. (B) Microscopicamente, há intensa necrose das escamas e colonização fúngica. HE, escala = 100 µm. (C) As hifas fúngicas possuem paredes paralelas, por vezes septadas e raramente ramificadas, morfológicamente compatíveis com *Ophidiomyces ophiodiicola*. HE, escala = 100 µm..... 50

escala = 50 µm. (D) Hifas na musculatura esquelética e em detalhe. PAS, escala = 50 µm.....53

Figura 22. Características macro e microscópicas das alterações infecciosas de etiologia indefinida em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. A-B) Gastrite ulcerativa. (A) Lesão focal, acentuada, necrotizante e ulcerativa. Animal tinha roedor parcialmente digerido e ascaridídeo livre no estômago. (B) Microscopicamente nota-se necrose extensa, com perda do epitélio, congestão e hemorragia. O Infiltrado inflamatório se estende da superfície à submucosa. HE, escala = 200 µm. C-D) Dermatomiosite. (C) Lesão necrótica com halo hiperêmico no subcutâneo e musculatura intercostal, e em detalhe o ectoparasito pertencente a família Ixodidae. (D) Microscopicamente, há inflamação linfocitária e heterofílica com necrose de fibras musculares. HE, escala = 200 µm.....54

Figura 23. Características macro e microscópicas das lesões não infecciosas não traumáticas em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=9). A-B) Cisto hepático. (A) Parênquima hepático com cisto de 1 cm de diâmetro, brilhante e translúcido. (B) Microscopicamente parede do cisto é composta por tecido conjuntivo displásico, irregular, variando de delgado a espesso. C-D) Degeneração hepatocelular. HE, escala = 100 µm. (C) Palidez difusa e acentuada do fígado. (D) Hepatócitos com intensa vacuolização citoplasmática. HE, escala = 50 µm.....

Figura 24. Características macro e microscópicas das lesões não infecciosas não traumáticas em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=9). A-C) Maceração fetal. (A) Útero com presença de fetos em processo de reabsorção. (B-C) Microscopia exibe mucosa uterina congesta e edemaciada e presença de feto no lúmen com tecido necrótico. HE, escala = 200 µm. D-F) Fibrose pulmonar. (D) Lesão linear, deprimida e brancacenta no parênquima pulmonar. Detalhe em canto superior direito está a representação em corte transversal da área lesionada (entre linhas azuis) e posição contralateral ao lúmen brônquico (seta). (E) Área de transição de parênquima normal e esclerosado. Bandas aleatórias de colágeno denso substituem o tecido pulmonar. HE, escala = 200 µm. (F) Corte histológico com intensa quantidade de colágeno com afinidade tintorial pelo azul de anilina. Tricômio de Masson, HE, escala = 200 µm.....

Figura 25. Lesões traumáticas em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=7). (A-B) Laceração linear, de aproximadamente 5 cm, profunda, com bordos da ferida necrosadas e musculatura com hematomas. (C) Múltiplos hematomas na musculatura intercostal e perfurações. (D) Amputação da cauda com presença de tecido cicatricial.....57

Figura 26. Frequência de parasitismo em <i>Crotalus durissus</i> de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sexo (n = 96). As frequências foram comparadas pelo teste exato de Fisher (P>0,05).....	58
Figura 27. Frequência de parasitismo em <i>Crotalus durissus</i> de vida livre parasitadas no estado de Minas Gerais em função da mesoregião (N=96). (A) Frequência total de serpentes parasitadas ou não por mesoregião. (B) Frequência de machos parasitados ou não por mesoregião. (C) Frequência de fêmeas parasitadas ou não por mesoregião. As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado (P>0,05).....	58
Figura 28. Frequência de parasitismo em <i>Crotalus durissus</i> de vida livre no estado de Minas Gerais em função do mês (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado (P>0,05).....	59
Figura 29. Frequência de machos e fêmeas de <i>Crotalus durissus</i> de vida livre no estado de Minas Gerais em função da classificação inicial dos parasitos (N=73). O número de casos supera o número de animais parasitados devido ao parasitismo simultâneo.....	59
Figura 30. Frequência de parasitismo em função do órgão ou tecido parasitado em <i>durissus</i> de vida livre no estado de Minas Gerais (N=97). O número de casos supera o n animais parasitados devido ao parasitismo simultâneo.....	60
Figura 31. Vista apical do aparato bucal dos parasitos dos gêneros <i>Ophidascaris</i> e <i>Hexa</i> (A-B) Ambas as espécies possuem três lábios com pequenos dentes, que permitem a fixação firme desses parasitos nas camadas profundas do estômago	61
Figura 32. Caracterização morfológica dos gêneros <i>Ophidascaris</i> e <i>Hexametra</i> . A-B) Espécime de <i>Ophidascaris</i> sp. (A) Aparelho bucal com presença de interlábio e (B) presença de dois ramos uterinos. C-D) Espécime de <i>Hexametra</i> sp. (C) Ausência de interlábio e (D) presença de seis ramos uterinos.....	62
Figura 33. Características morfológicas do <i>Serpentirhabdias</i> sp. (A) Presença de <i>Serpentirhabdias</i> sp. no pulmão. Os espécimes são pequenos, de aproximadamente 7 mm e pigmentados. Frequentemente encontrados enrolados dentro dos faveolos. (B) Corte histológico dos parasitos dentro de um faveolo. (C) Espécime completamente relaxado e estendido após fixação por formalina a 4% pré aquecida. (D) Observação sob microscópio óptico após processo de clarificação. (E) Detalhe do útero contendo inúmeros ovos larvados. (F) Registro da larva em processo de eclosão.....	63

Figura 34. Características morfológicas do gênero *Kalicephalus*. (A) Intestino delgado com presença de acilostomídeos de 1 a 2 cm, delgados e brancacentos. (B) Vista lateral exibindo esôfago curto e robusto. (C) Capsula bucal em detalhe com três papilas e quatro placas anteriores.....64

Figura 35. Distinção morfológica entre *Kalicephalus inermis inermis* e *Kalicephalus costatus costatus*. A-B) Espécimes de *K. inermis inermis*. (A) Cauda curta e robusta das fêmeas e (B) ramos terminais do raio dorsal do grupo V dos machos. C-D) Espécimes de *K. costatus costatus*. (C) Terminação caudal pontiaguda das fêmeas e (D) ramos terminais do raio dorsal do grupo III dos machos.....65

Figura 36. Frequência de parasitismo em função da combinação dos diferentes grupos de parasitos identificados em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=57). (ACAN = Acanthocephala; ASC = Ascarididae; CAP = Capilariidae; IXO = Ixodidae; KAL = *Kalicephalus*; PEN = Pentastomida; RHA = Serpenterhabdias; SPI = Spirometra; NI = Não identificado).....66

Figura 37. Frequência de parasitismo em função da combinação dos diferentes grupos de parasitos identificados em machos e fêmeas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=57). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-Quadrado (P>0,05).....67

Figura 38. Concentração de metais pesados em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sexo e peso. (A) Níveis de Cd em função do sexo (p=0,0429). (B) Níveis de Pb em função do sexo (p=0,0434). (C) Níveis de Cd em função de serpentes acima e abaixo do peso médio (p=0,0056). (D) Níveis de Pb em função de serpentes acima e abaixo do peso médio (p=0,0323). Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney e as barras dos gráficos gerados pelos valores de mediana e amplitude interquartil. (µg=micrograma, g=grama, MS=matéria seca).....68

Figura 39. Concentração de metais pesados em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da mesoregião. (A) Níveis de Mg em função das mesoregiões (Oeste x Metropolitana p=0,0071 e Oeste x Demais p=0,0022). (B) Níveis de Zn em função das mesoregiões (Oeste x Metropolitana p=0,0466 e Oeste x Demais p=0,0279). (C) Níveis de Cd em função das mesoregiões (p=0,0258). (D) Níveis de Pb em função das mesoregiões (p=0,0049). Dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por teste *post-hoc* de comparação múltipla de Dunn, com as barras dos gráficos gerados pelos valores de mediana e amplitude interquartil. (µg=micrograma, g=grama, MS=matéria seca).....69

Figura 40. Frequência de hemoparasitose em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sexo (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Exato de Fisher ($P>0,05$).....71

Figura 41. Frequência de hemoparasitose em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da mesoregião e mês (N=96). (A) Quantidade de serpentes hemoparasitadas ou não por mesoregião. (B) Quantidade mensal de serpentes hemoparasitadas ou não. As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).....72

Figura 42. Esfregaço sanguíneo com hemoparasitadas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Microorganismos morfológicamente compatíveis com *Hepatozoon* sp. e com (B) *Trypanossoma* sp.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de parasitismo em função da classificação taxonômica e órgão ou tecido parasitado em <i>Crotalus durissus</i> de vida livre no estado de Minas Gerais	65
Tabela 2. Concentração de metais na população de <i>Crotalus durissus</i> de vida livre no estado de Minas Gerais	67
Tabela 3. Perfil hematológico de <i>Crotalus durissus</i> de vida livre no estado de Minas Gerais (n = 85)	70
Tabela 4. Perfil bioquímico de <i>Crotalus durissus</i> de vida livre no estado de Minas Gerais	71

LISTA DE ABREVIACOES

ALT	- Alanina Aminotransferase
AST	- Aspartato Aminotransferase
FUNED	- Fundao Ezequiel Dias
GMS	- Metenamina de Prata de Gomori
HE	- Eosina e Hematoxilina
IBD	- <i>Inclusion Body Disease</i>
LIAM	- Leses infecciosas associadas a metazoários
LINM	- Leses infecciosas não metazoárias
LNI	- Leses não infecciosas
MS	- Matéria seca
OPMV s	- <i>Ophidian Paramyxoviruses</i>
PAS	- cido Peridico de Shiff
QuEChERS	- <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
RCF	- <i>Relative Centrifuge Force</i>
SFD	- <i>Snake Fungal Disease</i>
VG	- Volume Globular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Distribuição e taxonomia.....	20
2.2. Anatomia e Fisiologia.....	21
2.3. Perfil hematológico e Imunologia	22
2.4. Patologia das doenças infecciosas não-metazoárias das serpentes.....	24
2.4.1. Protozoários	24
2.4.2. Patógenos micóticos	25
2.4.3. Patógenos bacterianos	26
2.4.4. Patógenos virais.....	27
2.5. Metazoários e doenças infecciosas metazoárias das serpentes.....	30
2.6. Biomarcadores Tóxicos	31
2.7. Importância do diagnóstico anatomopatológico das doenças.....	32
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Procedência, Registro e Eutanásia dos animais.....	33
4.2. Exame anatomopatológico	34
4.3. Avaliação parasitológica	35
4.4. Exame toxicológico	35
4.5. Avaliação hematológica e bioquímica.....	36
4.6. Tratamento Estatístico	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Caracterização das amostras	38

5.2. Avaliação anatomo-patológica	40
5.2.1. Considerações gerais dos achados anatomo-patológicos	40
5.2.3. Diagnóstico das lesões associadas a metazoários.....	44
5.2.4. Diagnóstico das lesões infecciosas não associadas a metazoários	47
5.2.5. Diagnóstico das lesões não infecciosas	52
5.3. Avaliação parasitológica	55
5.3.1. Considerações gerais dos resultados parasitológicos	55
5.3.2 Descrição e diagnóstico parasitológico	57
5.4. Avaliação toxicológica	65
5.5. Avaliação hematológica e bioquímica.....	68
6. DISCUSSÃO	71
6.1. Considerações Gerais	71
6.2. Alterações anatomo-patológicas.....	72
6.2.1. Lesões infecciosas associadas a metazoários	72
6.2.2. Lesões infecciosas associadas a protozoários.....	73
6.2.3. Lesões infecciosas associadas aos patógenos fúngicos	74
6.2.4. Lesões infecciosas de etiologia indefinida	75
6.2.5. Lesões não infecciosas.....	76
6.3. Dados parasitológicos.....	77
6.4. Dados toxicológicos	78
6.5. Dados hematológicos e bioquímicos	79
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
9. APÊNDICES E ANEXOS	90

1. INTRODUÇÃO

As serpentes peçonhentas do gênero *Crotalus* pertencem à família Viperidae e são encontradas por todo continente americano, em regiões de vegetação aberta e clima seco, sendo sua principal característica morfológica o guizo na extremidade da cauda (Bastos *et al.*, 2005). No Brasil, popularmente chamada de “cascavél”, a *Crotalus durissus* é a única espécie encontrada, sendo identificadas cinco subespécies: *C. durissus terrificus*, *C. durissus collilineatus*, *C. durissus cascavella*, *C. durissus ruruima* e *C. durissus marajoensis* (Pinho e Pereira, 2001), que estão distribuídas em uma faixa territorial que se estende do sul ao nordeste, não sendo encontradas em região de floresta e pantanal, e raramente, no litoral (Brasil, 2001).

Acredita-se que a *C. durissus* seja capaz de se adaptar a áreas desflorestadas para formação de pastos, aproximando-se cada vez mais ao ambiente urbano (Bastos *et al.*, 2005; Brasil, 2001). Os acidentes ofídicos são de interesse para a saúde pública brasileira (Pinho e Pereira, 2001) e a *C. durissus* tem demonstrado reponsável por grande das ocorrências. Existe uma vasta literatura sobre acidentes ofídicos crotálicos em regiões periurbanas e rurais, assim como sobre a patogênese do veneno crotálico nesses acidentes, tanto no homem como em animais domésticos (Franco *et al.*, 2001; Bucarechi *et al.*, 2002; Bastos *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2019). No entanto, trabalhos científicos sobre doenças e condição sanitária de *C. durissus* são escassos, com predomínio de relatos parasitológicos e frequentemente abordando animais em cativeiro (Panizzutti *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008; Quirino *et al.*, 2018).

Devido as serpentes serem encontradas em diferentes ambientes, viverem em contato direto com solo e serem topo de cadeia alimentar, estudos de conservação e manutenção do meio ambiente vem sendo realizados utilizando esses animais como marcadores biológicos de contaminação ambiental. Por exemplo, Frossard *et al.* (2017) utilizou serpentes *Boa constrictor* e *Bothrops jararaca* para avaliar a condição ambiental das regiões litorânea e serrana no estado do Espírito Santo. Esses autores encontraram elevados níveis de zinco (Zn) nessas espécies e concluíram que esses animais podem ser importantes indicadores da qualidade do meio ambiente. Estudos semelhantes também têm sido realizados em outros locais do mundo (Burger *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2005; Hopkins *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2018).

Tendo em vista a importância das serpentes *C. durissus* para a saúde pública, a escassez de literatura quanto às doenças de animais de vida-livre e o uso desses animais como biomarcadores ambientais, o objetivo deste trabalho foi estudar as condições sanitárias de serpentes *C. durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais, por meio de exames anatomopatológicos, parasitológicos, toxicológicos e hematológicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Distribuição e taxonomia

As serpentes *C. durissus*, conhecidas como cascáveis neotropicais, são encontradas em grande parte do continente americano, desde o México até a Argentina. No entanto esses animais evitam ocupar áreas de florestas tropicais da América Central e América do Sul. As populações dessas serpentes estão parcialmente separadas pela floresta amazônica. Segundo pesquisa filogeográfica de *C. durissus*, o padrão genético encontrado nas diferentes populações no estudo condiz com a ocupação gradativa desses animais da América Central para a América do Sul, seguido de um deslocamento norte no sentido do Panamá (Wuster *et al.*, 2005). Assim, as populações de cascavéis que habitam ao norte da região amazônica deram origem às cascáveis que habitam ao sul da Amazônia.

As cascavéis encontradas nas Américas Central e do Sul são todas pertencentes a espécie *C. durissus* (Campbell e Lamar, 1989; Mecchi e Herrera, 2015), diferente de outras regiões como Estados Unidos e México que possuem mais de uma espécie em seus territórios (Figura 1). A distinção das subespécies pode ser discreta e desafiadora com quaisquer ferramentas utilizadas para esta finalidade. Autores citam métodos morfológicos (Peters *et al.*, 1970; Hoser, 2009), genéticos (Echeverrigaray *et al.*, 2001) e por análise da composição do veneno (Boldrini-França *et al.*, 2010; Santoro *et al.*, 1999).

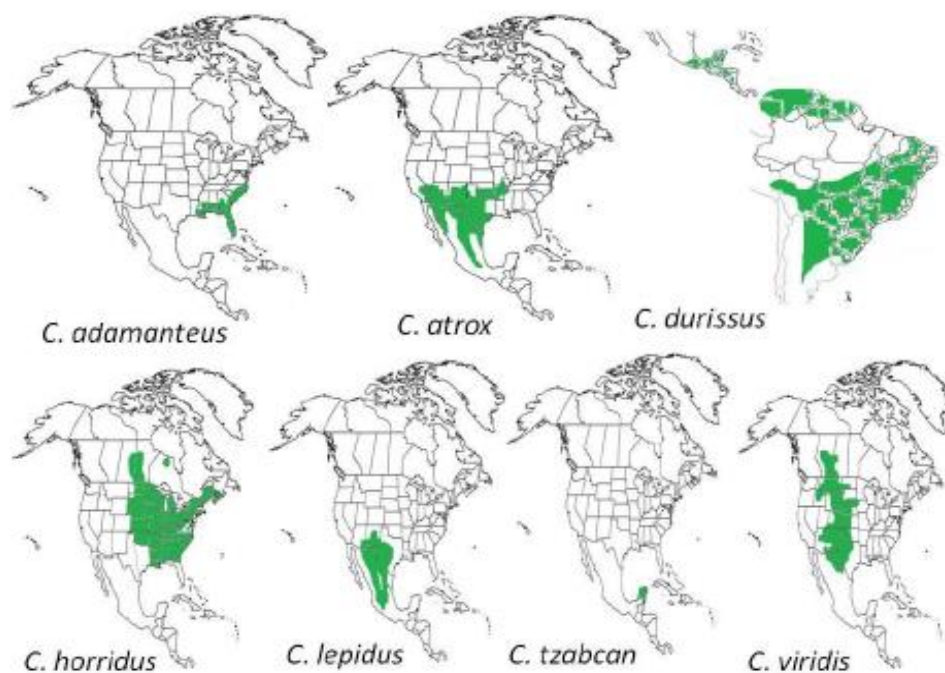


Figura 1. Distribuição de algumas espécies de cascavéis no continente americano. Serpentes *Crotalus durissus* é única espécie de cascavél encontrada na América do Sul. Fonte: Mecchi e Herrera, 2015.

Em avaliação filogenética das espécies neotropicais por meio de identificação de DNA mitocondrial, Wuster *et al.* (2005) considera as serpentes *C. durissus cascavella*, *C. durissus collilineatus* e *C. durissus terrificus* como sendo sinônimos. Quanto a atividade e composição do veneno, as três subespécies possuem alta similaridade (Boldrini-França *et al.*, 2010; Santoro *et al.*, 1999). Acredita-se ainda que as sutis diferenças morfológicas e biológicas sejam decorrentes de sua distribuição geográfica e hábito alimentar, do que a real diferença genética entre as três subespécies (Santoro *et al.*, 1999).

2.2. Anatomia e Fisiologia

As *C. durissus* são serpentes reconhecidas anatomicamente por ter fosseta loreal, cabeça triangular, pupila elíptica, camuflagem oliva e castanha, com formas geométricas romboides, e principalmente pela presença de guizo na extremidade da cauda (Figura 2). Esses animais são pertencentes à família Viperidae e, portanto, possuem presas frontais retráteis (Peters *et al.*, 1970; Campbell e Lamar, 1989), dentição denominada solenóglifa.

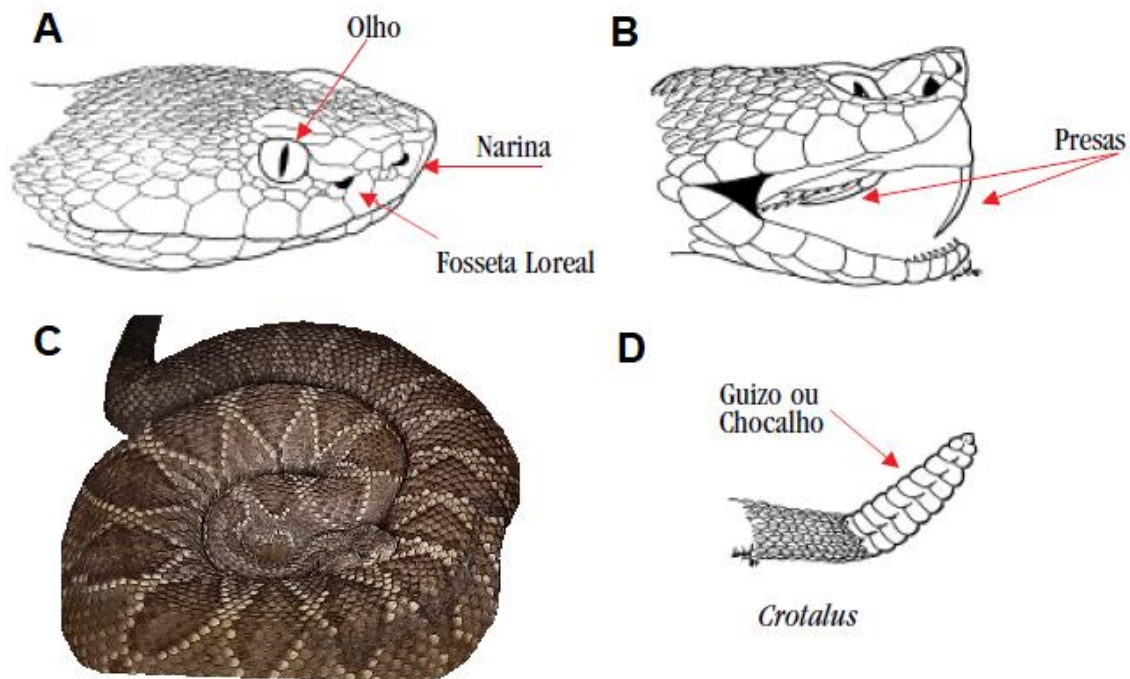


Figura 2. Características anatômicas das cascavéis. (A) Cabeça triangular com pupila elíptica, narina e fosseta loreal, e (B) presas retráteis. (C) A camuflagem é oliva e castanha com formas geométricas rombóides. (D) Principal particularidade das cascavéis é a presença do guizo na extremidade da cauda. Fonte: adaptado de Brasil, 2001.

As serpentes são animais com ausência total dos membros pélvicos e torácicos, cavidades auditivas e membrana timpânica. Possuem língua bifurcada que captam partículas presentes no ar e as direcionam ao órgão vomeronasal, que possui atividade quimiorreceptora. São animais bem alongados com centenas de costelas na maioria das espécies. A pele é recoberta por múltiplas fileiras de escamas pequenas dorsalmente e lateralmente, e escamas maiores e mais largas ventralmente. Em contraste com os demais répteis, as vísceras das serpentes são mais alongadas e organizadas de forma linear. Não possuem vesícula urinária, sendo o término do uretér diretamente na cloaca. A urina retorna da cloaca para o colón, onde há reabsorção de água e condensação semi-sólida de urato, sendo então excretada na defecação (Jacobson, 2007).

2.3. Perfil hematológico e Imunologia

Os eritrócitos de répteis são elípticos e nucleados assim com nas aves, anfíbios e peixes. Apesar da imunidade inata e adaptativa ter sido identificada, muito da informação conhecida é morfológica e descritiva, tendo poucos estudos mecanísticos publicados. O

conhecimento da resposta inflamatória dos répteis é precário devido a publicações incompletas ou até mesmo contraditórias. Por exemplo, azurofilos e eosinófilos são leucócitos circulantes cujas funções são ainda desconhecidas. Os leucócitos dos répteis incluem heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Importante ressaltar que entre as espécies há ampla variedade no tamanho, morfologia e porcentagem das células (Strik *et al.*, 2007).

Os heterófilos são células grandes, redondas, com 10 a 25 μm de diâmetro e inúmeros grânulos intracitoplasmáticos, que por vezes recobrem o núcleo. Na maioria das serpentes os núcleos dos heterófilos são redondos a ovais e discretamente lateralizados. Em casos de intoxicação, essas células podem sofrer alterações ainda na medula óssea, e se apresentarem mais basofílicas, vacuolizadas e degranuladas na circulação. A presença ou ausência de eosinófilos em serpentes é controversa, havendo autores que citam a presença em algumas espécies, outros dizem se tratar de um subtipo de heterófilos (Strik *et al.*, 2007). Em cascavéis (*Crotalus* sp.) o eosinófilos estão ausentes (Alleman *et al.*, 1999; Carvalho *et al.* 2016; Carvalho *et al.*, 2017). As funções dos basófilos, linfócitos e monócitos de répteis são morfologicamente e fisiologicamente semelhantes aos dos mamíferos.

Os basófilos são células pequenas com núcleo recoberto por grânulos metacromáticos escuros. Quando visível, seu núcleo apresenta-se redondo e discretamente lateralizado. Os linfócitos são pequenos, com citoplasma basofílico escasso, núcleo redondo e centralizado. As células plasmocitárias possuem núcleo lateralizado com região perinuclear citoplasmática pálida, referente ao complexo de Golgi. Os monócitos são células maiores em comparação aos demais leucócitos, possuem núcleo grande, oval ou redondo, de citoplasma amplo, por vezes vacuolizado, semelhante aos monócitos de mamíferos. Os monócitos são considerados azurófilos reativos. Os azurófilos são morfológicamente semelhantes aos monócitos e possuem mesma origem monocitóide. São diferenciados apenas pela presença de alguns grânulos pequenos e azuis no citoplasma. Alguns autores os reconhecem como sendo monócitos azurofílicos (Strik *et al.*, 2007).

O sistema imunológico é composto por órgãos, células e fatores que permitem a defesa do organismo contra patógenos virais, bacterianos, fúngicos, parasitários e contra

células neoplásicas. A evolução imunológica foi precisamente moldada em diferentes níveis de organização e complexidade, incluindo formas mais rudimentares na maioria dos organismos multicelulares invertebrados e respostas mais especializadas e complexas nos grandes vertebrados. Muito do que se sabe sobre a resposta imunológica dos répteis foi fruto de pesquisas principalmente realizadas por volta de 1970 e 1980. Desde então, poucas investigações têm sido realizadas (Origgi, 2007).

A resposta imune é um processo mediado pela imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata é composta por barreiras físicas e químicas, células de defesa e algumas proteínas séricas inflamatórias (Abbas *et al.*, 2015). A pele dos répteis se diferencia dos demais vertebrados por possuir uma camada externa de queratina bem desenvolvida e resistente. O processo de ecdise, troca da camada superficial que ocorre e contribui com o crescimento, também é uma estratégia de defesa contra microorganismos que infectam a pele ou que a utiliza como porta de entrada. Nas serpentes, a velha camada epitelial é eliminada completamente em um único segmento e de forma rápida, no processo denominado ecdise. O prolongamento no intervalo entre as trocas pode ocorrer devido a algumas doenças (Origgi, 2007).

A imunidade adaptativa é adquirida e específica, mediada por linfócitos B e T, resultando em resposta humoral ou celular, respectivamente (Abbas *et al.*, 2015). Nos répteis há poucos estudos sobre o mecanismo adaptativo e grande parte das informações é extrapolada de pesquisas em outras espécies. Contudo, sabe-se que existem IgM e IgY, que correspondem respectivamente aos isotipos IgM e IgG dos mamíferos (Origgi, 2007). Em serpentes, por meio de estudo transcriptômico e sequenciamento genômico, foram descritas: IgM, IgD e três classes de imunoglobulina Y - IgYa, IgYb e IgYc (Gambón-Deza *et al.*, 2012).

2.4. Patologia das doenças infecciosas não-metazoárias das serpentes

2.4.1. Protozoários

Infecções por *Cryptosporidium* spp. são importantes causas de gastrites em serpentes. Espessamento da parede gástrica pode ser observado nos casos de infecção por *Cryptosporidium serpentis*. Macroscopicamente, a mucosa apresenta-se proeminente e acúmulo de muco. Em cortes histológicos há hiperplasia glandular da mucosa com

aumento do tecido conjuntivo da lamina própria. Quantidade variada de oocistos pode estar aderidos à superfície luminal, nas microvilosidades. Enterites por esses protozoários, embora mais comum em lagartos, também podem ocorrer nas serpentes (Ossiboff, 2018).

Entamoeba invadens é um causador comum de hepatite e enterocolite necrótica em serpentes. Infecções em serpentes de cativeiro frequentemente estão associadas ao abrigo misto de répteis que são reservatórios, como lagartos e quelônios. A ingestão dos cistos resulta na invasão dos trofozoítos primariamente no intestino grosso, causando necrose segmentar da mucosa. Intestino delgado e estômago também podem ser afetados. Após necrose da mucosa, os microorganismos acessam a circulação portal e chegam ao fígado. Hepatite necrótica pode ocorrer tanto pela presença dos trofozoítos quanto por infecção bacteriana secundária ascendente (Ossiboff, 2018).

Grande quantidade de casos de infecção por *Eimeria* e *Isospora* também tem sido relatada em serpentes. No entanto, a presença desses microorganismos é, na maioria das vezes, assintomática (Ossiboff, 2018).

2.4.2. Patógenos micóticos

Os estudos de micologia em serpentes implicam diretamente na conservação das espécies tanto em vida-livre quanto em cativeiro. No geral, dermatomicoses são comuns e frequentemente causadas por agentes oportunistas como *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Considerando que todos esses organismos têm morfologia de hifa, a descrição morfológica precisa e técnicas auxiliares adicionais são fundamentais para estabelecer o diagnóstico (Ossiboff, 2018). Uma das principais dermatites fúngicas relatadas em serpentes é causada pelo ascomiceto *Ophidiomyces ophidiicola*, responsável por causar uma doença conhecida como doença fúngica das serpentes (SFD), do inglês “*snake fungal disease*”.

A doença fúngica das serpentes é uma doença emergente em animais de vida-livre e cativeiro. Foi primeiramente relatada em 2008, em serpentes de vida-livre na América do Norte. Desde então, tem sido relatada mundialmente em diversas espécies, incluindo animais de cativeiro. A principal e mais grave característica da doença é o processo necrótico cutâneo que cursa com perda de escamas, e em casos mais crônicos,

principalmente em crotalíneos, pode ocorrer desfiguração da face. Microscopicamente, se observa lesões necroulcerativas com inflamação heterofílica e granulomatosa, associado a miríade de hifas intralesionais. As hifas têm até 5 µm de diâmetro, com paredes paralelas, sendo septadas e ramificadas (Ossiboff, 2018).

Casos mais discretos de SFD podem ser naturalmente curados por múltiplas ecdises bem sucedidas. Por outro lado, casos mais graves com envolvimento da face, podem progredir para osteomielite e osteolise. Também pode ocorrer disseminação visceral com lesões granulomatosas contendo hifas intralesionais (Ossiboff, 2018).

Colorações histoquímicas como metenamina de prata de Grocott-Gomori (GMS) e ácido periódico de Schiff (PAS) podem auxiliar no diagnóstico e diferenciação morfológica dos fungos. Além dos fungos citados anteriormente, leveduras e fungos dimórficos também são relatados, embora sejam raros. Casos de pneumonia granulomatosa e meningoencefalite por *Cryptococcus* sp. foram previamente relatados, e *Coccidioides immitis* também já foi associado a pneumonia (Ossiboff, 2018).

2.4.3. Patógenos bacterianos

Embora bactérias Gram-positivas possam infectar os répteis, as infecções causadas por bactérias Gram-negativas são mais frequentes (Jacobson, 2007). Dentre as bacterias consideradas oportunistas destacam-se *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp.

A maioria dos relatos de *Pseudomonas* refere-se a serpentes e lagartos. Geralmente estão associadas a lesões tegumentares focais ou difusas, lesões orais e linguais, pneumonias e septicemias. Essas bactérias colonizam feridas de pele causadas por queimaduras. Tanto as lesões cutâneas quanto as orais, podem, em casos crônicos, progredir para pneumonia (Jacobson, 2007). Em um zoológico, as duas causas mais frequentes de morte de serpentes e lagartos foram lesões orais e enterites necrotizantes associadas a *Pseudomonas aeruginosa* (Gray *et al.*, 1966).

Estomatites ulcerativas ou hemorragia difusa da mucosa oral em serpentes, são comumente associadas a infecção por *Aeromonas* com processos de vasculites. Nesses casos, a aspiração de exsudato e restos celulares, também pode causar pneumonia. Casos

de sepse também podem ocorrer, geralmente acompanhadas de equimoses e úlceras cutâneas (Jacobson, 2007).

Embora *Salmonella* spp. seja parte da microbiota gastrointestinal normal dos répteis, é também considerada um patógeno comum nas serpentes (Ossiboff, 2018). As lesões gastrointestinais podem aparecer como placas ou membranas fibrino-necróticas na mucosa. Granulomas na serosa de diferentes órgãos e osteomielites também são manifestações descritas em casos de infecção por *Salmonella* spp. (Jacobson, 2007).

Micobacterioses têm sido diagnosticadas em serpentes de cativeiro, embora não sejam tão comuns quanto em outros répteis e anfíbios. As lesões podem ser localizadas ou disseminadas. A manifestação pulmonar é a mais frequente, com a maioria dos casos afetando jiboias (Ossiboff, 2018). Casos naturais de micobacterioses em répteis geralmente são crônicos, mas casos agudos também já foram relatados. Envolvimento tegumentar usualmente se apresenta como nódulos subcutâneos ou lesões ulcerativas na pele. Animais com infecções generalizadas apresentam-se com sinais inespecíficos, representados por anorexia, apatia e perda de peso (Jacobson, 2007).

Embora haja poucos relatos de infecção por *Chlamydomphila pneumonia* em serpentes, essa bactéria intracelular obrigatória deve ser considerada como diferencial para infecções pulmonares granulomatosas (Ossiboff, 2018). As clamidioses em serpentes podem aparecer como infecções granulomatosas com microorganismos intralésionais nas diferentes camadas do coração, no fígado, pulmão, baço e intestinos (Jacobson, 2007).

2.4.4. Patógenos virais

A maioria dos vírus identificados em répteis tem sido considerada como causadora de doença, no entanto poucos estudos atendem aos postulados de Koch. Antigamente os relatos eram baseados em microscopia eletrônica e isolamento por cultivo celular. Em seguida foi adotada a técnica de imuno-histoquímica para identificação dos antígenos virais, e mais recentemente, foram adotadas técnicas moleculares como a reação da cadeia de polimerase (PCR) e a hibridização *in situ* (Jacobson, 2007).

Dentre as infecções causadas por vírus DNA destacam-se a herpesvirose, iridovirose e adenovirose, já as ocasionadas por vírus RNA, incluem a arenavirose, nidovirose, paramixovirose e reovirose.

Casos de herpesvírus em serpentes são incomuns, mas quando presentes podem causar doenças gastrointestinais, e inclusões virais podem ser observadas em células do fígado, pâncreas, rim e adrenal (Ossiboff, 2018).

A iridovirose eritrocítica é uma doença observada em diversas espécies das ordens dos escamados e quelônios. Historicamente, na ausência de confirmação ultraestrutural, muitas inclusões em eritrócitos de serpentes foram atribuídas como sendo organismos protozoais. Nesse sentido, acredita-se que a prevalência da iridovirose eritrocítica das serpentes seja elevada, devido aos possíveis casos de erro de diagnóstico (Ossiboff, 2018). Inclusões iridovirais intraeritrocíticas podem ser encontradas em serpentes saudáveis ou anêmicas (Jacobson, 2007).

As adenovirose são pouco frequentes na literatura, e geralmente estão associadas a doença gastrointestinal esporádica (Ossiboff, 2018). Em jiboias, adenovirose podem causar necrose hepatocelular com inclusão viral intranuclear basofílica nos hepatócitos. Inclusões virais semelhantes às de adenovirus também podem ser observadas em eritrócitos de colubrídeos com enterite (Jacobson, 2007).

Inicialmente acreditava-se que a doença da inclusão viral das jiboias e pítons, “*inclusion body disease*” (IBD), fosse causada por um retrovírus, no entanto hoje se atribui a infecção a um arenavirus da família Arenaviridae, de ordem Reptarenavirus. Os sinais clínicos da doença incluem neuropatias, regurgitação crônica e perda de peso. Algumas serpentes podem adoecer de forma grave em semanas e outras sobreviverem por meses. Há ainda divergência na literatura, pois as inclusões virais também são observadas em animais saudáveis. Estudos ainda são necessários para determinar quais cepas ou espécies estão associadas a determinado tropismo tecidual e desenvolvimento dos sinais clínicos (Ossiboff, 2018).

Em pítons, geralmente a doença da inclusão viral possui progressão mais rápida e as inclusões estão limitadas ao sistema nervoso central. Já em jiboias, a doença geralmente é mais branda e inclusões podem ser vistas em diversas células, como as do

epitélio intestinal, respiratório e renal, hepatócitos, células acinares pancreáticas e células linfoides (Jacobson, 2007; Turchetti *et al.*, 2013). A mortalidade decorrente de infecções secundárias por bactérias, fungos e protozoários, é frequente. A ocorrência de neoplasias linfoides também tem sido associadas a esta doença (Jacobson, 2007).

O nidovirus, pertencente à família Coronaviridae, faz parte de um grupo importante e emergente nos répteis, principalmente nas jiboias. As nidoviroses cursam com uma doença respiratória fatal. No entanto, essa doença nas demais espécies ainda não é bem caracterizada. Macroscopicamente, observam-se estomatite, traquite e pneumonia catarral, necrótica e exudativa, frequentemente com secreções presentes no lúmen bronquial e gastrointestinal. Em cortes histológicos, há infiltrado plasmocitário, linfocítico e heterofílico, associado a necrose e hiperplasia acentuada de pneumócitos. Esofagite segmentar também pode ocorrer, e quando presente, favorece o diagnóstico de infecção por nidovirus (Ossiboff, 2018).

Os paramixovirus são responsáveis por doenças respiratórias em serpentes de cativeiro. Todos os paramixovirus ofídicos identificados atualmente, “*ophidian paramyxoviruses*” (OPMV), pertencem ao gênero *Ferlavirus*. Os OPMVs foram primeiramente relatados em viperídeos e crotalíneos de cativeiro e, posteriormente, nas demais serpentes. Assim como nas nidoviroses, as alterações macro e microscópicas observadas são necróticas e exudativas, no entanto tendem a ser hemorrágicas. Histologicamente, há formação de células sinciciais e inclusão intracitoplasmática eosinofílica (Ossiboff, 2018), com hiperplasia do epitélio respiratório (Kolesnikovas *et al.*, 2006). Infecções associadas com pancreatites também acontecem e, geralmente, são fatais, além da ocorrência de meningoencefalites com manguitos perivascularares linfocitários, desmielinização e degeneração neuronal associada a presença de inclusão viral (Hyndman *et al.*, 2013).

Relatos de reovirose em serpentes são caracterizados por pneumonia e traquite proliferativa moderada. Quando ocorre apenas a manifestação respiratória ou acompanhada de alterações neurológicas e respiratórias, é necessário realizar o diagnóstico diferencial com nidovirose e paramixovirose, respectivamente (Jacobson, 2007).

2.5. Metazoários e doenças infecciosas metazoárias das serpentes

Parasitismo por metazoários nas serpentes é principalmente observado em animais de vida-livre ou de cativeiro quando recentemente capturados do habitat natural (Ossiboff, 2018). Poucos trabalhos de répteis associam a carga parasitária com morbidade e mortalidade (Jacobson, 2007). Nesse sentido, pouco se sabe das consequências clínicas causadas pelos parasitos em serpentes.

Os nematodos rabditoides são clinicamente relevantes nas serpentes. Infecções ou migração intensa de parasitos podem causar pneumonia proliferativa ou infecções bacterianas secundárias. Parasitismo por *Serpentirhabdias dubielzigi* pode apresentar-se com opacidade de córnea e edema dos tecidos periocular, facial e oral (Ossiboff, 2018).

Ascarídeos também são frequentes em serpentes de vida-livre e geralmente estão associados com lesões gástricas. Parasitos adultos do gênero *Ophidascaris* podem ser encontrados fixados à mucosa e à parede da região caudal do esôfago e no estômago, provocando inflamação, ulceração e fibrose. Migração larvária visceral também pode ocasionar inflamação granulomatosa multifocal em vários órgãos (Ossiboff, 2018).

A maioria das infecções por cestodas em serpentes são subclínicas. Tetrahydria, larva de cestoda do gênero *Mesocostoides*, é comumente encontrada em serpentes. As larvas podem estar em meio a lesões nodulares no intestino, fígado e superfície serosa das vísceras (Ossiboff, 2018).

Pentastomídeos são parasitos superficialmente segmentados comumente encontrado em répteis. Em serpentes foram relatados os gêneros *Armillifer*, *Kiricephalus*, *Porocephalus* e *Raillietiella* (Jacobson, 2007). Apesar dos adultos viverem dentro do pulmão, obstrução ou inflamação significativa geralmente não ocorre. Inflamação mais intensa pode ser observada durante migração das larvas (Ossiboff, 2018).

O gênero *Amblyomma* representa a maioria dos ixodídeos encontrados no Brasil (Aragão, 1936), e os principais carrapatos encontrados em cascavéis brasileiras pertencem a espécie *Amblyomma rotundatum* (Onofrio, 2007; Dantas-Torres *et al.*, 2005). Infestação por carrapatos é comum em répteis e raramente desencadeiam problemas de saúde, mas podem causar lesões focais nos sítios de fixação (Jacobson, 2007).

2.6. Biomarcadores Tóxicos

A utilização de animais como biomarcadores tem sido utilizado ao redor do mundo, principalmente peixes e anfíbios, e mais recentemente os répteis (Van der Oost *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, por exemplo, serpentes aquáticas (*Nerodia fasciata*) foram estudadas quanto a capacidade de bioacumulação. Os animais foram alimentados com peixes que receberam ou não alimentação contaminada. Esses predadores foram capazes de acumular arsênio (As), cádmio (Cd), selênio (Se), estrôncio (Sr) e vanádio (V) em diversos tecidos. Os pesquisadores ainda sugerem que sangue e biópsias de cauda podem ser facilmente utilizadas para a avaliação de exposição aos contaminantes e causam lesões menos invasivas aos répteis para amostragem (Hopkins *et al.*, 2001).

Um estudo realizado na Europa demonstrou que serpentes aquáticas (*Natrix maura*) que se alimentam de peixes tiveram altos níveis de mercúrio (Hg) nas escamas quando comparados com os que se alimentaram de anfíbios. Além disso, os animais que se alimentam de anfíbios apresentaram menores declives no tamanho médio do corpo. Os resultados sugerem que a diferença significativa observada na taxa de acumulação está associada ao hábito alimentar e que peixes podem contribuir para a contaminação de mercúrio (Lemaire *et al.*, 2018).

No Brasil, serpentes de vida livre *Boa constrictor* (n = 18) e *Bothrops jararaca* (n = 18) foram avaliadas quanto ao nível de cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn). Foram encontrados níveis tóxicos de Zn nas duas espécies estudadas e os autores afirmam que esses animais podem ser usados como marcadores de qualidade do meio ambiente (Frossard *et al.*, 2017).

Os biomarcadores podem ser classificados como sendo de exposição ou de efeito. Os biomarcadores de exposição são obtidos pela mensuração dos níveis dos elementos exógenos absorvidos em um organismo. Já os biomarcadores de efeito estão relacionados a capacidade dos contaminantes de causar alterações e doença nos organismos (Van der Oost *et al.*, 2013).

2.7. Importância do diagnóstico anatomopatológico das doenças

O diagnóstico é importante na prevenção de doenças contagiosas e no reconhecimento de doenças novas ou emergentes. Nesse sentido, a investigação anatomopatológica é fundamental para o melhoramento do serviço de vigilância (Maxie e Miller, 2016).

Os exames macro e microscópicos de espécimes obtidos *ante mortem* ou *post mortem* agrupam evidências objetivas sobre a patogênese e o resultado da doença, melhorando o controle de qualidade da prática médica. Além disso, a necropsia pode ser o único e melhor método para confirmar o diagnóstico clínico, determinar a causa da morte e avaliar as respostas da terapia. Em casos de morte inesperada, a necropsia é o primeiro passo para estabelecer um diagnóstico diferencial e o caminho para determinar o diagnóstico morfológico e etiológico definitivo (Maxie e Miller, 2016).

Estudar as características macro e microscópicas das serpentes são fundamentais para diferenciar a variação entre as espécies e das alterações comuns associadas às doenças (Ossiboff, 2018). Embora as alterações possam ser categorizadas conforme etiologia por meio de cortes histológicos, seja corados por eosina e hematoxilina ou por coloração especial, alguns casos exigem exames adicionais para diagnóstico (Jacobson, 2007). Apesar das ferramentas moleculares terem revolucionado o método diagnóstico, a triagem morfológica é indispensável para conhecer a interação do patógeno no hospedeiro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a condição sanitária e presença de metais pesados de serpentes da espécie *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever os achados anatomo-patológicos por meio de avaliação macro e microscópica;
- Identificar e classificar os parasitos;

- Avaliar a presença de metais pesados;
- Realizar a avaliação hematológica e bioquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Procedência, Registro e Eutanásia dos animais

Foram estudadas serpentes da espécie *Crotalus durissus* capturadas pelos órgãos responsáveis de diferentes municípios do estado de Minas Gerais e encaminhadas à Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Os animais utilizados no estudo foram os que não foram inseridos ao serpentário da instituição. O procedimento de eutanásia foi realizado sob responsabilidade da própria FUNED, que estão de acordo com as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FUNED) sob número de protocolo 14/2019. Como fármaco utilizou-se tiopental na dose de 100mg/kg, via intracelomática. O projeto de pesquisa também foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob número 70233-1.

Os procedimentos de registro e identificação, medida, pesagem e colheita de sangue foram realizados na FUNED. A identificação foi realizada utilizando as iniciais da espécie seguida do número sequencial de eutanásia (ex. cd 001). O peso registrado em gramas (g) e tamanho em centímetros (cm), utilizando-se comprimento rostro-cloacal, cabeça e cauda. A colheita de sangue foi realizada utilizando agulha 25 x 7 acoplada a seringa de 3 mL com acesso pela veia coccígea ventral (Figura 3B). Em seguida as carcaças foram transportadas para a Escola de Veterinária da UFMG para necropsia e coleta de amostras. Foram submetidos à eutanásia e necropsiados 101 serpentes durante o período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020. Dos 101 animais, cinco foram excluídos do estudo por terem recebido medicação e sido alimentadas em cativeiro.



Figura 3. Etapas realizadas na FUNED. (A) Pesagem realizada em balança mecânica e (B) colheita de sangue com acesso pela veia coccígea ventral.

4.2. Exame anatomopatológico

Todos os animais foram necropsiados e fragmentos de pele, músculo esquelético, fígado, rim, pulmão, espleno-pâncreas, coração, estômago, intestino delgado, intestino grosso, órgãos reprodutores (ovário e testículo) e sistema nervoso central foram colhidos e fixados em formalina tamponada a 4%. Adicionalmente foram colhidos outros órgãos ou tecidos nos quais foram observadas alterações macroscópicas. Após 24 horas de fixação os fragmentos passaram por processamento histológico de rotina, foram embebidos em parafina e posteriormente cortados com 3 a 4 μ m de espessura em micrótomo histológico e corados, inicialmente com hematoxilina e eosina, para avaliação por microscopia óptica. Em alguns casos, foram realizadas técnicas histoquímicas complementares para auxílio no diagnóstico, que incluíram colorações de Gram histológico, Ziehl Neelsen, metenamina de prata de Grocott, Tricômico de Gomori e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Para cada lesão examinada foram realizados diagnóstico morfológico e ou diagnóstico etiológico.

Para apresentação dos resultados, os achados macroscópicos foram inicialmente agrupados em lesões infecciosas associadas a parasitos metazoários (LIAM), lesões infecciosas não associadas a metazoários (LINM) e lesões não infecciosas (LNI). Após avaliação microscópica e conclusão diagnóstica, as lesões foram subdivididas conforme natureza etiológica específica. As alterações classificadas como LIAM foram todas associadas a endoparasitos, incluindo ascaridídeos, acantocéfalos e pentastomídeos,

pertencentes respectivamente a família Ascarididae (Nematoda), ao filo Acanthocephala e a subclasse Pentastomida. Apenas os ascaridídeos foram reclassificados conforme o gênero. As alterações do grupo LINM foram classificadas por lesões protozoais, fúngicas e de etiologia indefinida. Os achados pertencentes ao grupo LNI foram subdivididos em lesões não traumáticas e traumáticas.

4.3. Avaliação parasitológica

Os animais foram avaliados quanto à presença de ecto e endoparasitos. Os ectoparasitos foram coletados em etanol 70% e os tecidos contendo endoparasitos foram colocados em placa de Petri lavados com NaCl 0,65%. Os espécimes foram analisados no Laboratório de Parasitologia do ICB-UFMG. Os helmintos encontrados foram individualizados, lavados com a mesma solução para remoção de debris, fixados em formol aquecido a 4%, e posteriormente estocados em etanol 70% para análises morfológicas. A identificação inicial dos nematóides foi feita baseada nas chaves taxonômicas de Anderson (2000) e Gibbons (2010), seguida da identificação específica de cada grupo encontrado. Para os estudos em microscopia óptica, os espécimes do filo Nematoda foram clarificados em glicerina e montados entre lâmina e lamínula no mesmo meio. As micrografias foram obtidas através do software LAS EZ no microscópio óptico LEICA DM500. Nos casos em que os parasitos foram observados posteriormente em cortes histológicos corados por HE, realizou-se a identificação morfológica com base nas descrições de Gardiner e Poynton (1999).

4.4. Exame toxicológico

Para análise toxicológica foram utilizados tecidos hepático, renal e adiposo, congelados e armazenados a -20°C. A preparação das amostras foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da EV-UFMG e a avaliação dos microelementos no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A extração foi realizada pelo método QuEChERS (Anastassiades *et al.*, 2003). Aproximadamente 20 gramas de tecido (pool) foram utilizados para avaliação de metais pesados. Os metais pesados avaliados foram magnésio (Mg), zinco (Zn), cobre (Cu), cádmio (Cd), cromo (Cr) e chumbo (Pb).

Após extração, as amostras foram lavadas com água deionizada e depois secas até se obter a matéria seca bruta. Cerca de 100 mg da massa seca foram mineralizados em 1,5 mL da mistura de ácido nítrico-perclórico (2:1). A determinação da concentração dos analitos foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica (Marin et al. 1993). Os limites de detecção (mg/L) são: 0,1 (Pb), 0,02 (Cd), 0,03 (Cu), 0,06 (Cr), 0,003 (Mg) e 0,01 (Zn).

Para os resultados descritivos de cada elemento foram colocados em tabela a média, mediana, valor mínimo e valor máximo. Foi avaliado os valores de cada elemento em função do sexo, peso e mesoregião de procedência. Para o peso, as serpentes foram separadas em dois grupos utilizando a média de pesos como ponto de corte (animais acima e abaixo da média de peso). As mesoregiões foram separadas em 3 grupos: Metropolitana, Oeste de Minas e Demais Regiões (que agrupou as regiões Sul de Minas, Zona da Mata e Vale do Mucuri).

4.5. Avaliação hematológica e bioquímica

Amostras de sangue foram coletadas para avaliação hematológica e bioquímica. Para o exame hematológico foram utilizados tubos de coleta de sangue a vácuo contendo heparina sódica e para análise bioquímica foram utilizados microtubos de 2 mL estéreis. O material obtido foi transportado sob refrigeração em caixas térmicas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, EV-UFMG, para o processamento da avaliação bioquímica, contagem das hemácias e leucócitos totais em hemocítômetro, exame diferencial dos leucócitos e estimativa de trombócitos, determinação do volume globular (VG) e das concentrações de proteínas por refratometria.

Os capilares, após centrifugação, foram utilizados para determinação do VG pela técnica de microhematócrito e determinação da proteína plasmática, através da técnica de refratometria (Jain, 1986). Além disso, 10µl de sangue foram aliquotados em 1 mL de solução de diluição Dacie para contagem dos eritrócitos e leucócitos totais (Jain, 1986). Os esfregaços foram corados por método de panótico rápido e a observação da presença de hemoparasitos foi realizada por microscopia em aumento de 400x. Já a contagem diferencial de leucócitos foi realizada sob óleo de imersão (1000x), totalizando 100 células. Para determinação da concentração de hemoglobina foi utilizada a técnica da

cianometahemoglobina, após a centrifugação da amostra para sedimentação dos núcleos extrusos.

Após realização do hemograma, todas as amostras foram centrifugadas e separadas para obtenção de plasma ou soro. A centrifugação foi realizada inicialmente a cerca de 100 RCF (*Relative Centrifugal Force*) durante 1 minuto e a 1800 RCF durante 4 minutos. Este protocolo de centrifugação foi adotado a fim de minimizar a ocorrência de hemólise. O plasma e o soro foram refrigerados a 4°C para posterior processamento do perfil bioquímico. Todas as análises foram realizadas no aparelho de bioquímica automático Cobas Mira Plus utilizando-se kits comerciais Biotecnica, já validados pelo laboratório de patologia clínica da EV-UFMG. Os analitos avaliados foram: uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gamaglutamiltransferase (GGT), glicose, amilase, proteína, albumina, globulina, ácido úrico, colesterol, cálcio e triglicerídeos.

Os valores de referência utilizados para análise dos resultados foram segundo Grego *et al* (2014). Para a descrição dos resultados hematológicos e bioquímicos foram calculadas a média, mediana, valor mínimo, valor máximo e desvio padrão.

4.6. Tratamento Estatístico

Foi utilizado teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher para caracterização amostral e para análises de frequência dos achados anatomo-patológicos e parasitológicos.

Para análise dos resultados toxicológicos, não foi considerada a diferença entre a média ou a mediana entre os diferentes grupos e sim a média dos *ranks* elaborada pela aplicação dos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. Ambos os testes consistem em pontuar os valores da população estudada, dando ao menor valor o *rank* 1, e ao maior valor o *rank* 100. Em seguida são obtidas as médias dos *ranks* dos grupos e avaliada a diferença entre elas. Os gráficos foram gerados utilizando os valores de mediana e de amplitude interquartil. Os testes estatísticos aplicados e representação gráfica foi realizada conforme Knafo *et al* (2016).

A distribuição contínua dos dados foi avaliada utilizando teste de Anderson-Darling. Para parâmetros de distribuição normal, foi realizado o “t” teste não pareado com correção de Welch. Para os dados que não apresentaram distribuição normal foram utilizados os testes Mann-Whitney (grupos de sexo e peso) e de Kruskal-Wallis seguido por teste *post-hoc* de comparação múltipla de Dunn (grupos de mesoregiões).

Os valores foram considerados significativos quando o valor-p foi menor que 5% ($p < 0,05$). As análises e gráficos foram auxiliados pelo programa *GraphPad Prism* versão 8.4.1 para o *Windows* 10, desenvolvido por *GraphPad Software* (Califórnia, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das amostras

Dos 96 animais de vida livre em estudo, totalizou-se 54 (56%) fêmeas e 42 (44%) machos, 89 (93%) adultos e 7 (7%) filhotes. Quanto à procedência, 56% das serpentes (54/96) foram da mesoregião Metropolitana de Belo Horizonte. A distribuição das serpentes em estudo está apresentada na Figura 4. Dois animais não tiveram o município identificado na lista de municípios e regiões do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) nem pelo site do Governo do Estado de Minas Gerais. Nesse caso a mesoregião foi classificada como não identificada (NI). A frequência de machos e fêmeas procedentes de cada mesoregião está apresentada na Figura 5.

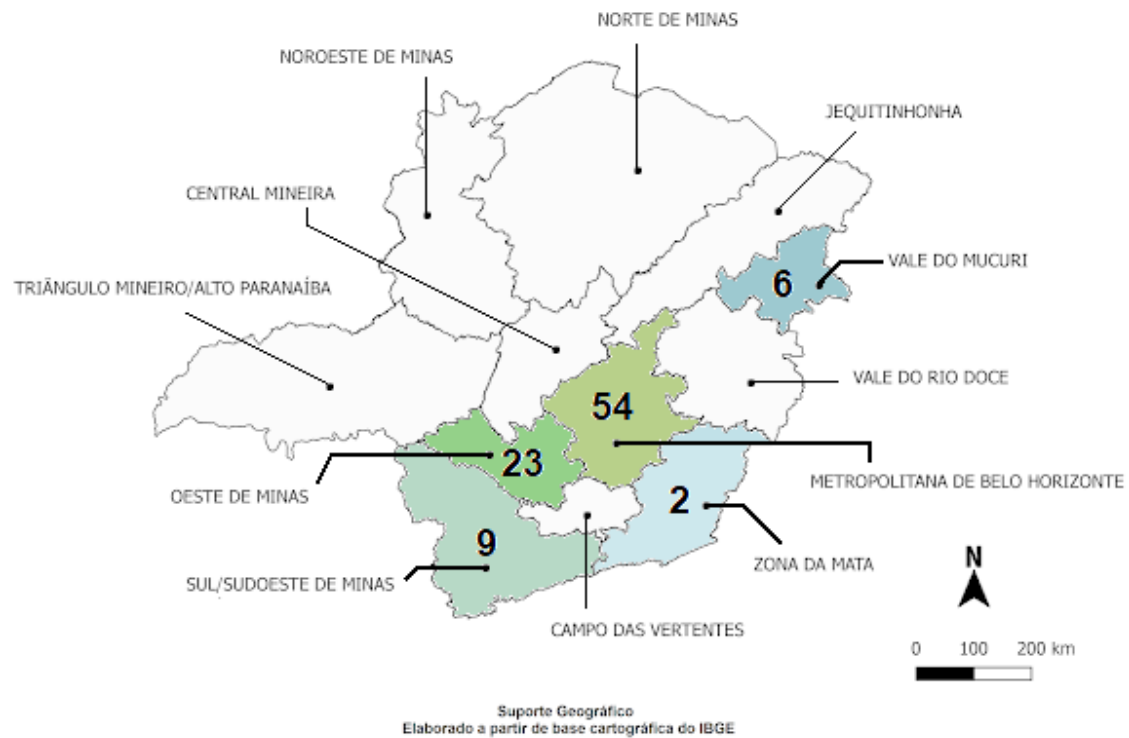


Figura 4. Distribuição de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais utilizadas no estudo (N=94). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

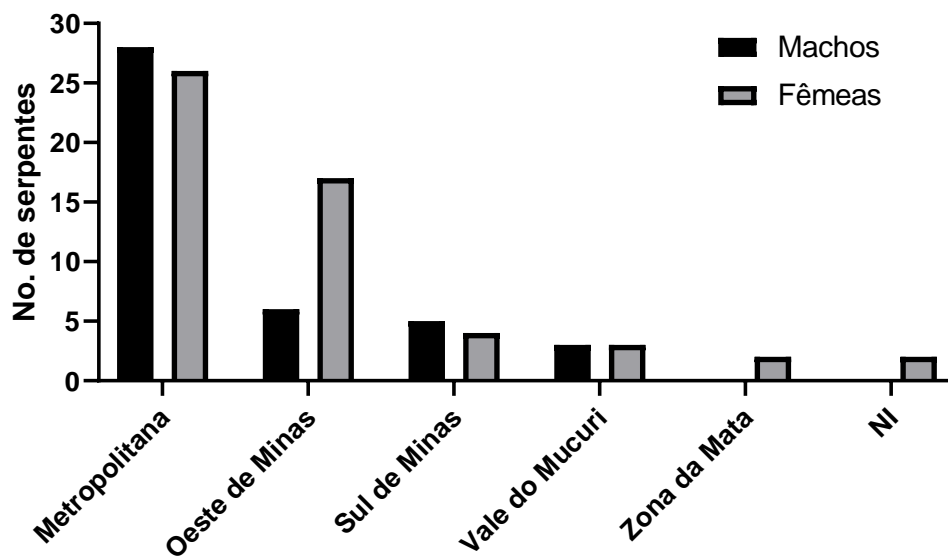


Figura 5. Frequência de recebimento de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da mesoregião de procedência e sexo (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

O mês de dezembro teve o maior número de recebimento de animais, e consequentemente de necropsias, representado por 29% das amostras (28/96). Todos os meses tiveram mais fêmeas do que machos necropsiados exceto o mês de janeiro, quando o número de machos foi superior ao de fêmeas. A diferença entre machos e fêmeas não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). A mesoregião Metropolitana, procedência com maior número de serpentes, foi a única que teve animais necropsiados todos os meses. A quantidade mensal de serpentes agrupadas por mesoregião está apresentada na Figura 6.

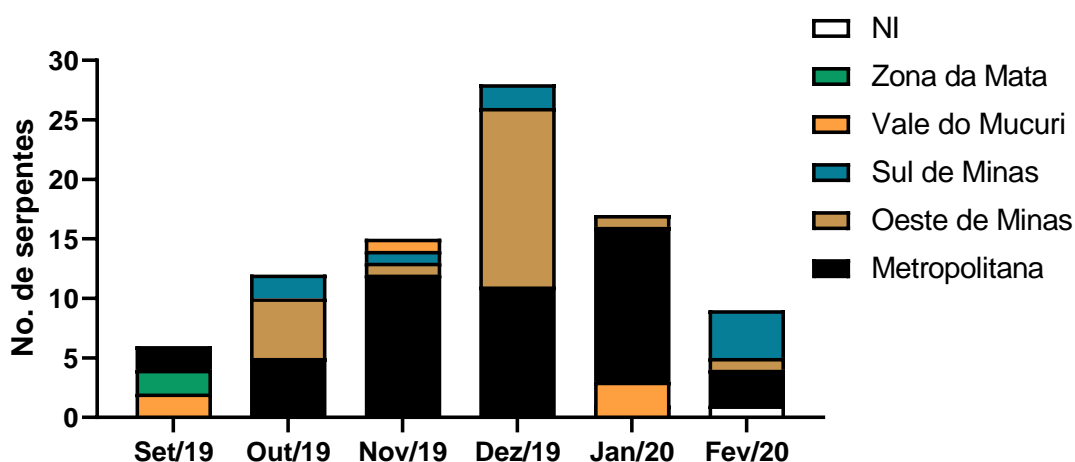


Figura 6. Frequência mensal de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da mesoregião de procedência (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

5.2. Avaliação anatomo-patológica

5.2.1. Considerações gerais dos achados anatomo-patológicos

Dos animais necropsiados, 58% tiveram alguma alteração morfológica macro ou microscópica (56/96) e 42% apresentaram-se sem alterações (40/96). As lesões foram encontradas em 64,3% dos machos (27/42) e em 53,7% das fêmeas (29/25). Considerando somente animais adultos, esse valor sobe para 67% para machos (27/40) e 59% para as fêmeas (29/20). A quantidade de animais com e sem lesão em função da mesoregião está representada na Figura 7. A quantidade de machos e fêmeas com ou sem lesões por mesoregião de procedência está representada na Figura 8.

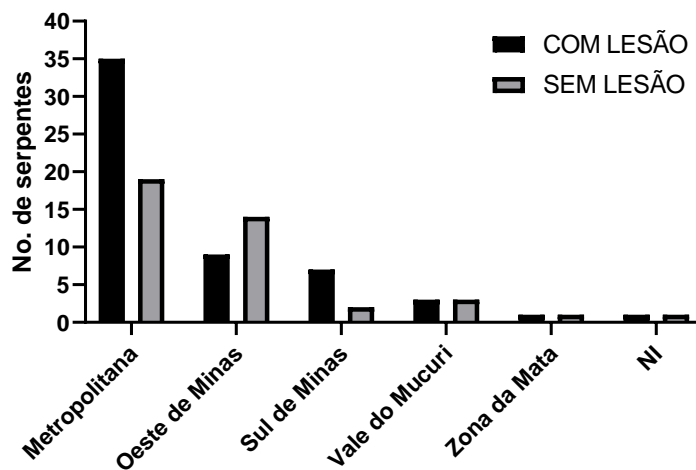


Figura 7. Frequência total de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais com ou sem lesão em função da mesoregião de procedência (n=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

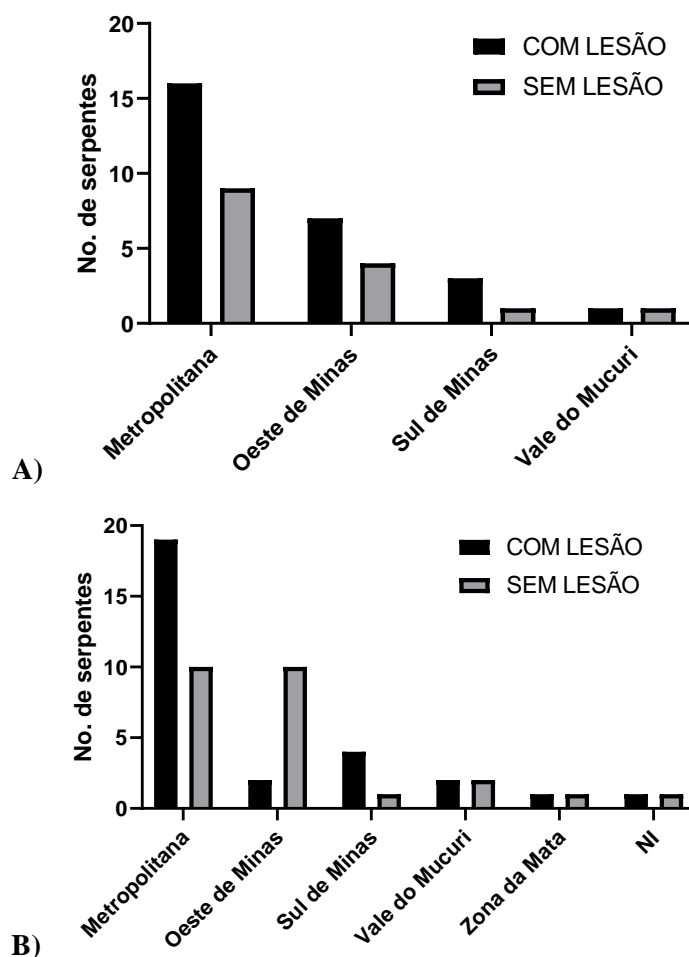


Figura 8. Frequência de machos e fêmeas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais com ou sem lesão em função da mesoregião de procedência. (A) Frequência de machos com ou sem lesão por mesoregião (N=42). (B) Frequência de fêmeas com ou sem lesão por mesoregião (N=54). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

O mês de setembro teve a mesma quantidade de animais com ou sem lesão, todos os demais apresentaram quantidades diferentes. A quantidade mensal de animais com ou sem lesão estão representadas na Figura 9.

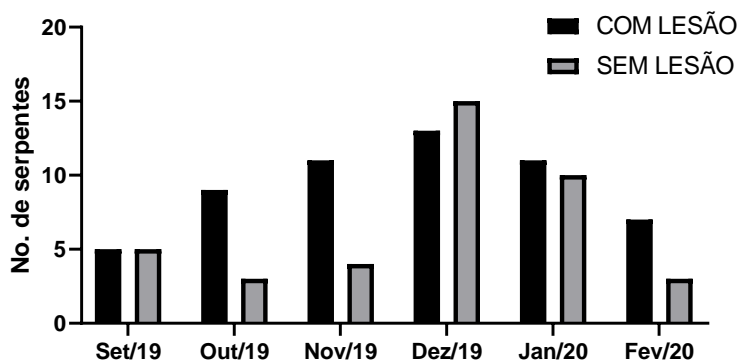


Figura 9. Frequência mensal de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais com ou sem lesão (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

Dos 96 animais necropsiados 56 apresentaram alguma alteração morfológica macro ou microscópica que totalizaram 108 lesões, com animais apresentando uma ou mais lesão em diferentes tecidos. O sistema digestório foi representado por 51% das alterações (56/108). Destaque em seguida para as lesões tegumentares, que representaram 12% das lesões (13/108). A frequência total de lesões por sistema, órgão ou tecido estão apresentadas na Figura 10. A distribuição das lesões nos diferentes sistemas, órgãos ou tecidos em função do sexo está representada na Figura 11.

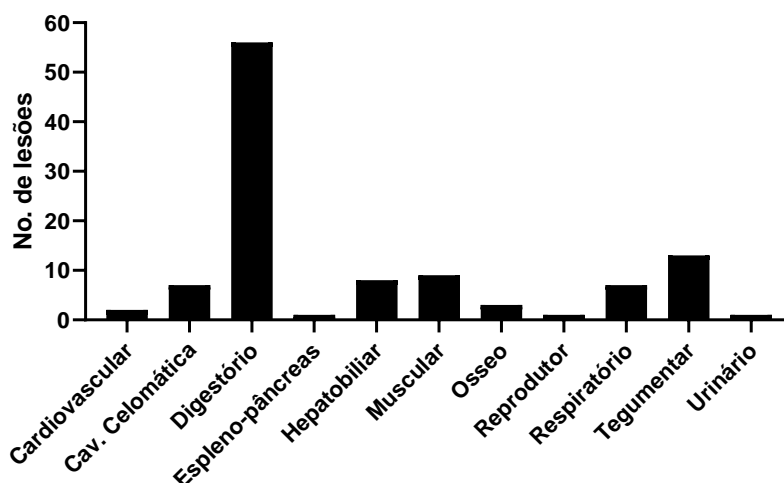


Figura 10. Frequência de lesões em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sistema, órgão ou tecido afetado (N=108). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

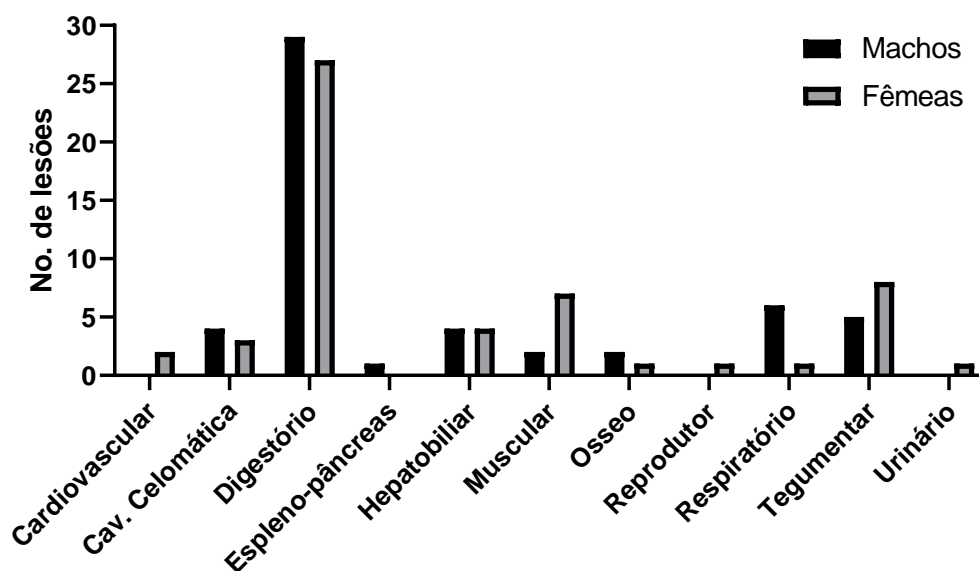


Figura 11. Frequência de lesões em machos e fêmeas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sistema, órgão ou tecido afetado (N=108). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

Frequentemente as lesões foram associadas a presença de parasitos metazoários, principalmente os endoparasitos. Nesse sentido, para organização inicial, as lesões foram agrupadas em lesões infecciosas associadas a metazoários (LIAM), lesões infecciosas não metazoárias (LINM) e lesões não infecciosas (LNI). A frequência de lesões em cada um desses grupos em função do sexo representada na Figura 12.

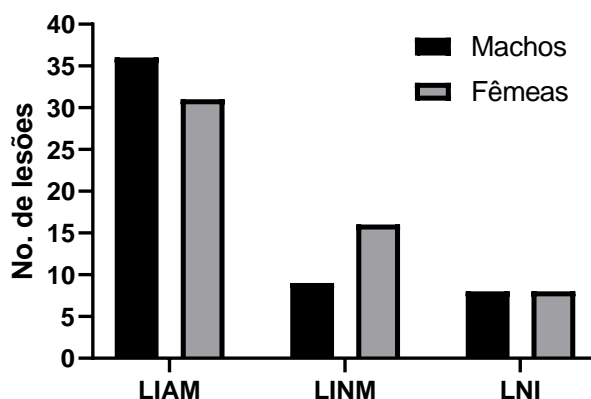


Figura 12. Frequência de lesões infecciosas associadas a metazoários (LIAM), lesões infecciosas não metazoária (LINM) e lesões não infecciosas (LNI) em função do sexo em *Crotalus durissus* de vida livre do estado de Minas Gerais (N=108). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

5.2.3. Diagnóstico das lesões associadas a metazoários

As lesões associadas aos metazoários foram todas associadas a endoparasitos, incluindo ascaridídeos, acantocéfalos e pentastomídeos. A frequência dos achados associados aos metazoários em função do sistema, órgão ou tecido está apresentada na Figura 13. A quantidade de lesões infecciosas associadas a metazoários, segundo o diagnóstico morfológico está apresentada na Figura 14.

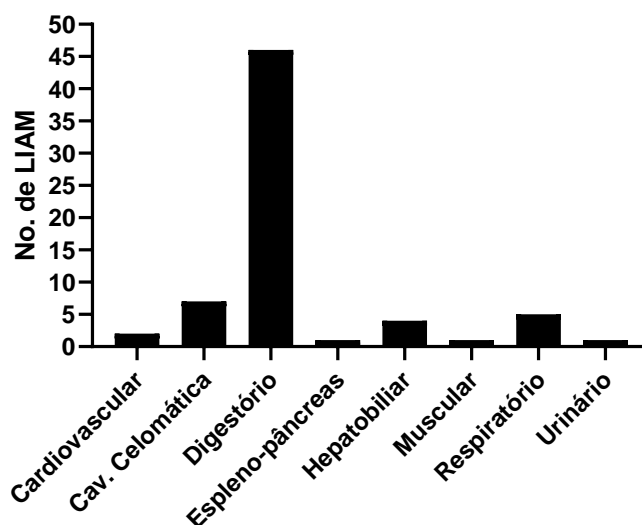


Figura 13. Frequência de lesões infecciosas associadas a metazoários (LIAM) em função do sistema, órgão ou tecido afetado em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N = 67). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P > 0,05$).

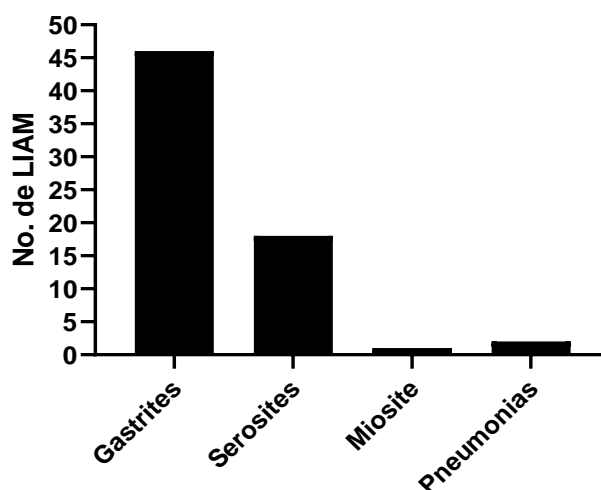


Figura 14. Frequência de lesões infecciosas associadas a metazoários (LIAM) em função do diagnóstico morfológico em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N = 67). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P > 0,05$).

Das 67 alterações macroscópicas do grupo LIAM, 46 envolveram o sistema digestório, caracterizadas por gastrites granulomatosas associadas aos ascaridídeos *Ophidascaris* sp. e *Hexameta* sp. (Figura 15). Ambos os ascaridídeos são macroscopicamente semelhantes e a distinção morfológica entre as duas espécies está apresentada nos resultados parasitológicos. As demais lesões metazoárias foram acompanhadas de processo inflamatório discreto, sendo 18 caracterizadas por granulomas nas superfícies das serosas associados a migração de larvas dos ascaridídeos, um caso de miosite por acantocéfalo e duas pneumonias intersticiais causadas por pentastomídeos (Figura 16).



Figura 15. Lesões infecciosas associadas aos ascaridídeos gástricos, *Ophidascaris* sp. e *Hexametra* sp. em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Macroscopicamente o estômago com a superfície serosa irregular, com lesões nodulares e firmes. (B) À abertura, numerosos parasitos nematoides penetram lesão focal ulcerada e se fixam profundamente nas lesões nodulares. (C) Microscopicamente as lesões atingem as camadas musculares. HE, escala = 500 μ m. (D) Processo inflamatório granulomatoso, histiocítico e heterofílico, multifocal e intenso. HE escala = 100 μ m. (E) Corte longitudinal revela cutícula rugosa dos parasitos. HE, escala = 500 μ m. (F) Em corte transversal do parasito nota-se musculatura do tipo celomiaria. HE, escala = 250 μ m.

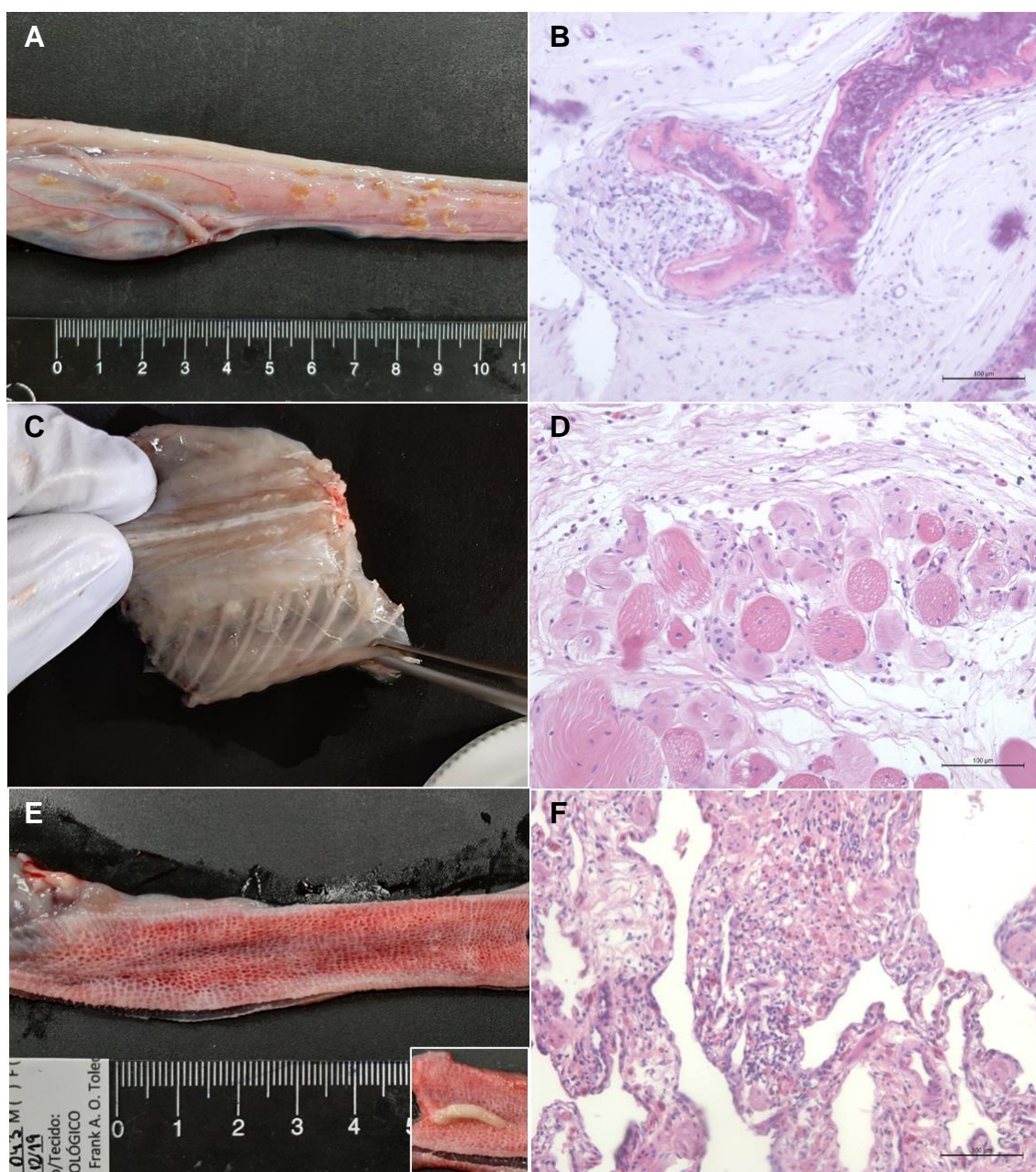


Figura 16. Lesões infecciosas associadas a metazoários em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. A-B) Serosite granulomatosa. (A) Serosa pulmonar com múltiplos granulomas irregulares e acastanhados. (B) Microscopicamente nota-se lesões lineares causadas por larvas de parasitos, acompanhadas de reação granulomatosa e mineralização. HE, escala = 100 µm. C-D) Miosite por acantocéfalo. (C) Acantocéfalo encistado na superfície da musculatura intercostal. (D) Histologia da musculatura intercostal adjacente com reação inflamatória discreta. HE, escala = 100 µm. E-F) Pneumonia associada a pentastomídeo. (E) Palidez multifocal do parênquima pulmonar e pentastomídeo em foco. (F) Corte histológico exibindo espessamento intersticial e reação inflamatória linfocitária e heterófila. HE, escala = 100 µm.

5.2.4. Diagnóstico das lesões infecciosas não associadas a metazoários

As lesões infecciosas não metazoárias (LINM) foram classificadas como lesões protozoais, fúngicas e lesões de etiologia indefinida. Das lesões observadas nesse grupo, 36% foram associadas a patógenos protozoais (9/25), 28% associadas a microorganismos fúngicos (7/25) e 36% associadas a processos inflamatórios sem etiologia definida (9/25). Essas alterações foram encontradas no sistema digestório, músculo e pele. A distribuição das lesões infecciosas não metazoárias por sistema ou tecido afetado está representada na Figura 17.

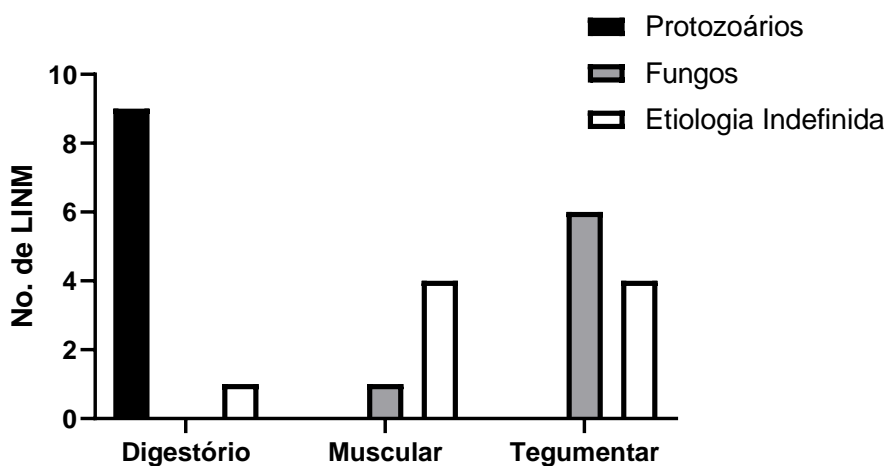


Figura 17. Frequência de lesões infecciosas não metazoárias (LINM) por sistema ou tecido afetado em *Crotalus durissus* de vida livre parasitadas no estado de Minas Gerais (N=25).

Todas as lesões de etiologia protozoal foram processos inflamatórios intestinais, sendo sete associadas à presença de *Sarcocystis* sp. (7/9), um associado à

Cryptosporidium serpentis (1/9) e um associado a *Entamoeba invadens* (1/9). Todas as lesões associadas ao *Sarcocystis* sp. foram observadas no intestino delgado, após microscopia, caracterizadas por inflamação granulomatosa discreta (Figura 18). As outras duas alterações protozoais foram colites necro-hemorragicas, associadas *Cryptosporidium serpentis* e *Entamoeba invadens*, conforme Figuras 19 e 20, respectivamente.

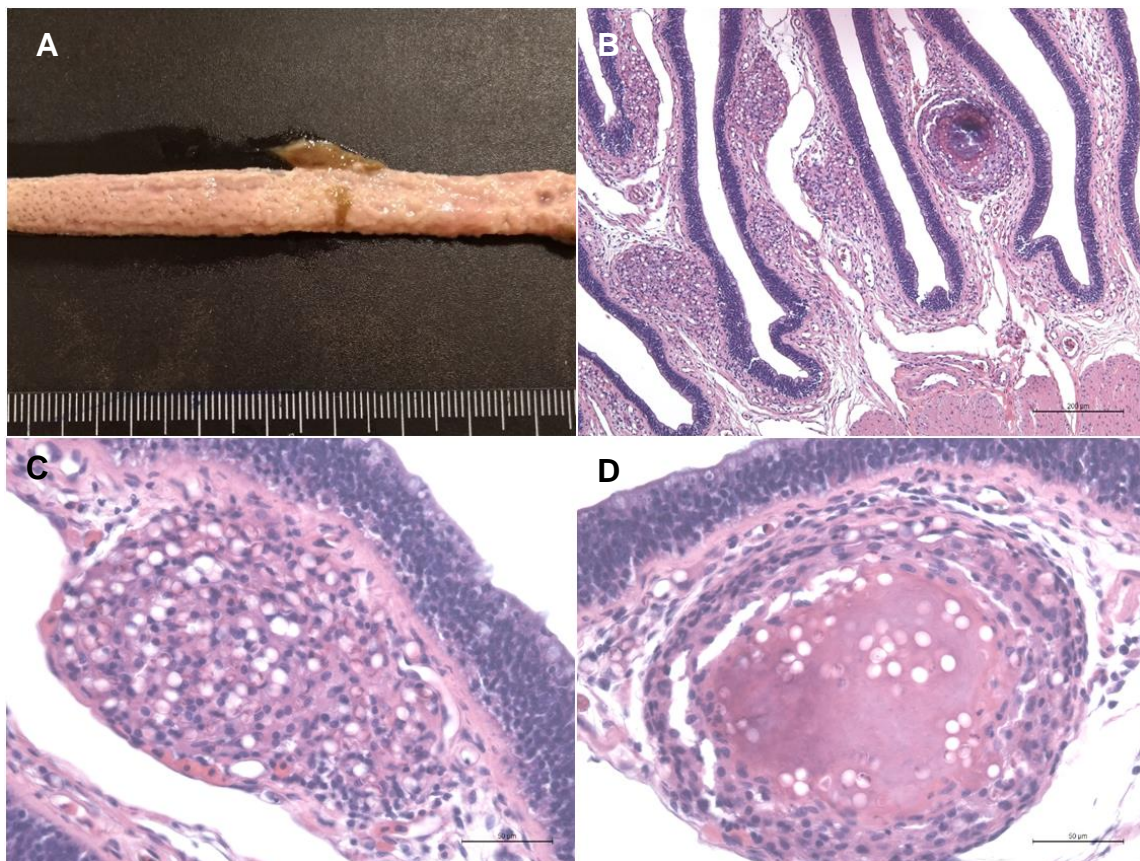


Figura 18. Lesões associadas ao *Sarcocystis* sp. em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Macroscopicamente, observa-se espessamento da mucosa com evidência das vilosidades intestinais. (B) Microscopicamente, há aumento da celularidade nas vilosidades, predominantemente na lâmina própria. HE, escala = 200 μ m. (C) Zoítos em meio a reação inflamatória histiocitária. HE, escala = 50 μ m. (D) Processo inflamatório crônico caracterizado por formação de granuloma. Há vacuolos intralumenais vazios e contendo cistos de *Sarcocystis* sp. HE, escala = 50 μ m.

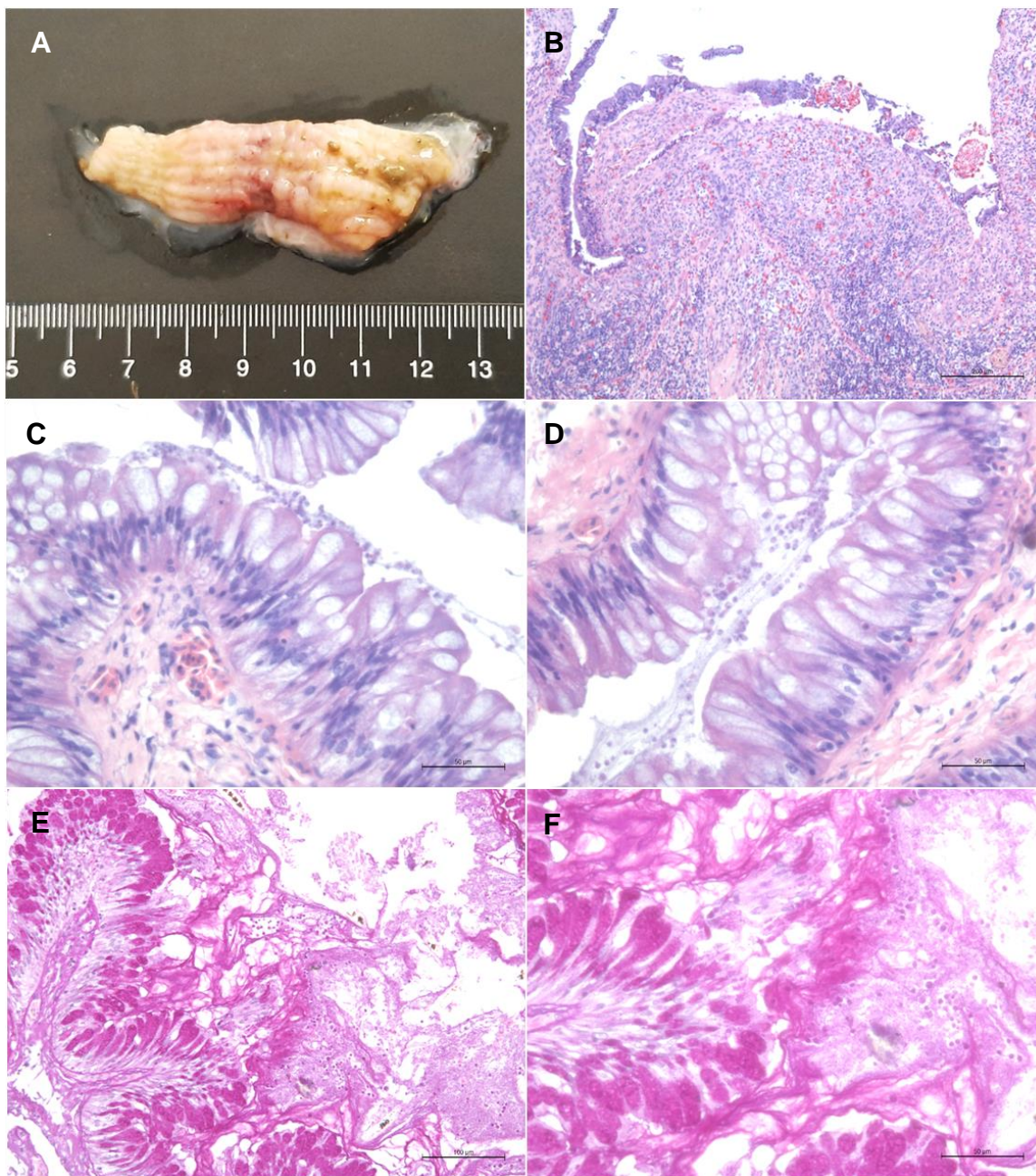


Figura 19. Colite protozoal associada a *Cryptosporidium serpentis* em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Macroscopicamente, focalmente extensa, acentuada, necro-hemorrágica e ulcerativa no intestino grosso. (B) Microscopicamente, há aumento de celularidade com congestão, necrose e perda da continuidade epitelial. HE, escala = 200 µm. (C-D) Adjacente as áreas de necrose e inflamação é possível visualizar microorganismos protozoais de 2-3 µm de diâmetro aderidos à superfície luminal dos enterócitos, em meio a conteúdo mucoso e restos celulares. (C) Protozoários morfológicamente compatíveis com *C. serpentis* nos vilos intestinais. HE, escala = 50 µm. (D) Protozoários morfológicamente compatíveis com *C. serpentis* também podem ser observados nas criptas. HE, escala = 50 µm. (E) Apesar da intensa afinidade tintorial dos enterócitos pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) é possível visualizar os protozoários em meio ao muco e restos celulares. PAS, escala = 100 µm. (F) Maior aumento. PAS, escala = 50 µm.

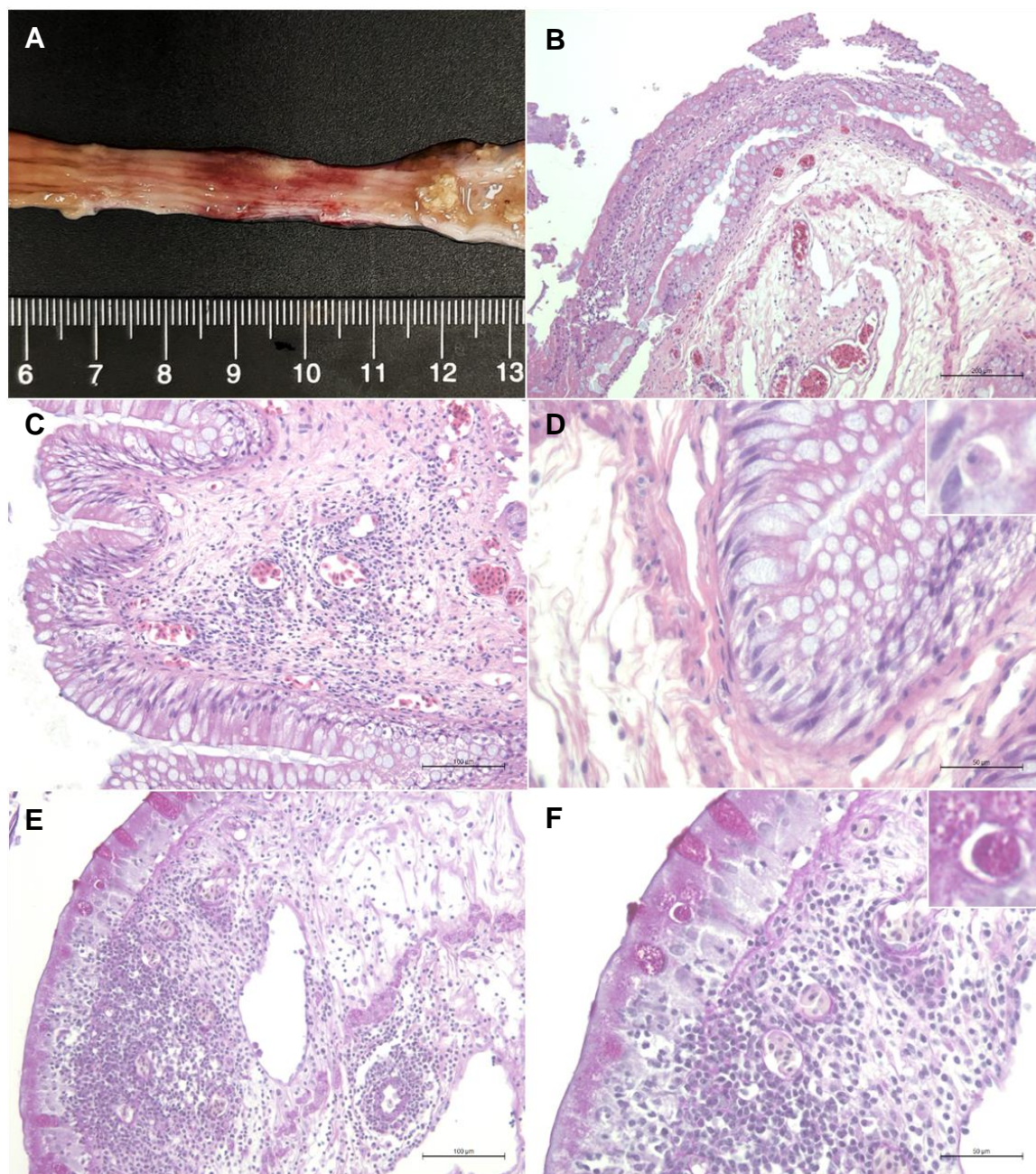


Figura 20. Colite protozoal associada a *Entamoeba invadens* em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Macroscopicamente, lesão focalmente extensa, acentuada, necro-hemorrágica e com crostas. (B) Microscopicamente, há congestão, infiltrado inflamatório multifocal e restos celulares. HE, escala = 200 μm . (C) Periféricamente observa-se congestão, infiltrado inflamatório na submucosa, lamina própria e mucosa. HE, escala = 100 μm . (D) Ocasionalmente é visto na mucosa microorganismos protozoais de 7-14 μm , de aparência granular e discretamente vacuolizada, contendo núcleo único, pequeno, escuro e esférico. HE, escala = 50 μm . E-F) Cortes histológicos exibindo infiltrado inflamatório mais intenso e afinidade tintorial do protozoário por coloração especial. (E) PAS, escala = 100 μm . (F) Maior aumento com protozoário em detalhe. PAS, escala = 50 μm .

As lesões micóticas incluíram seis casos de dermatites e um caso de miosite. Todos caracterizadas por processos inflamatórios necrotizantes, principalmente do extrato córneo (no caso das dermatites), mas que também se estendiam para derme e músculo (Figura 21). As lesões apresentaram-se com diferentes distribuições e intensidades, acompanhadas de linfócitos, histiócitos e heterófilos, e associadas a hifas fúngicas septadas intralesionais morfológicamente compatíveis com *Ophidiomyces ophiodiicola*.

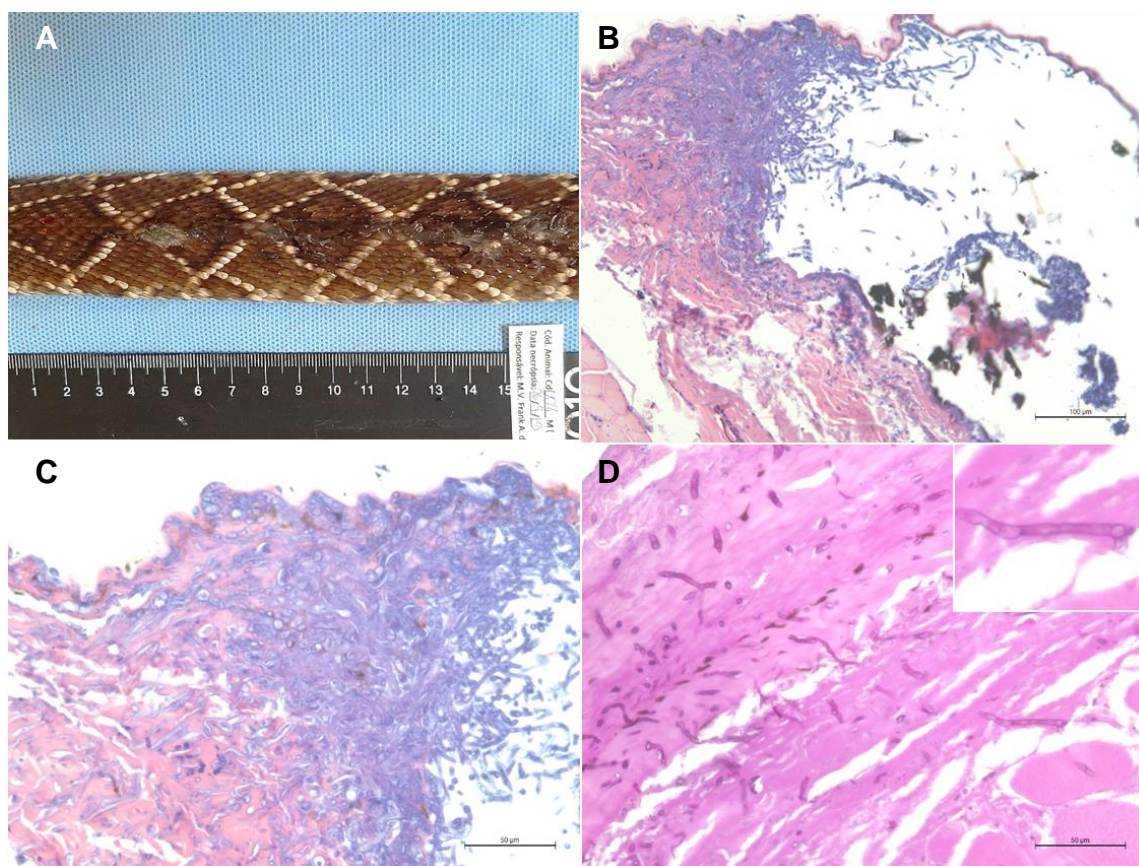


Figura 21. Lesões micóticas em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=7). (A) Macroscopicamente, há irregularidade nas escamas com encurtamento, escurecimento e ulceração. (B) Microscopicamente, há intensa necrose das escamas e colonização fúngica. HE, escala = 100 μ m. (C) As hifas fúngica possuem paredes paralelas, por vezes septadas e raramente ramificadas, morfológicamente compatíveis com *Ophidiomyces ophiodiicola*. HE, escala = 50 μ m. (D) Hifas na musculatura esquelética e em detalhe. PAS, escala = 50 μ m.

Alterações infecciosas de etiologia indefinida incluíram um caso de gastrite ulcerativa, quatro casos de miosites e quatro casos de dermatites, representadas na Figura 22. A serpente com gastrite ulcerativa também apresentava um ascaridídeo livre e conteúdo alimentar no estômago caracterizado por um roedor parcialmente digerido. Dos quatro animais com miosite, três eram ectoparasitados. E dos quatro animais com

dermatites, um era ectoparasitado e outros três apresentavam necrose multifocal discreta restrita ao extrato córneo. Todos ectoparasitas encontrados foram representantes da família Ixodidae (Figura 22C).

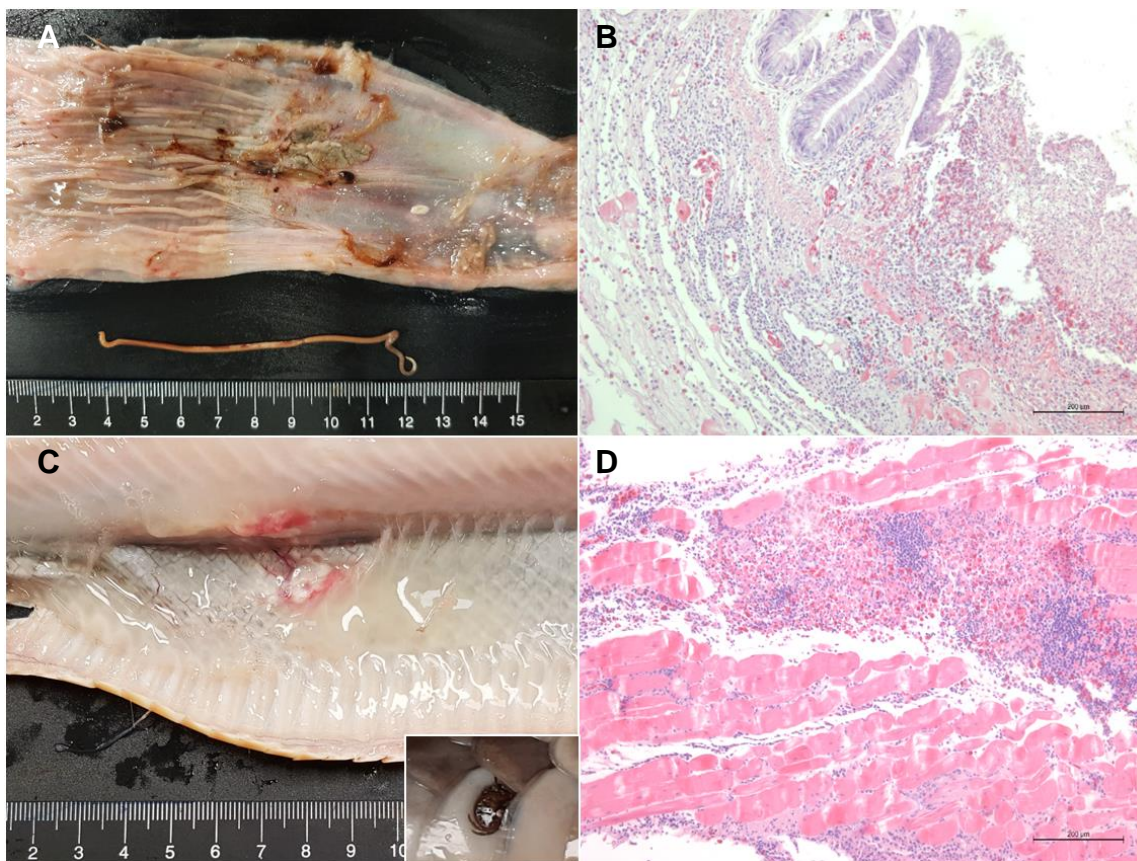


Figura 22. Características macro e microscópicas das alterações infecciosas de etiologia indefinida em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. A-B) Gastrite ulcerativa. (A) Lesão focal, acentuada, necrotizante e ulcerativa. Animal tinha roedor parcialmente digerido e ascaridídeo livre no estômago. (B) Microscopicamente nota-se necrose extensa, com perda do epitélio, congestão e hemorragia. O Infiltrado inflamatório se estende da superfície à submucosa. HE, escala = 200 μ m. C-D) Dermatomiosite. (C) Lesão necrótica com halo hiperêmico no subcutâneo e musculatura intercostal, e em detalhe o ectoparasito pertencente a família Ixodidae. (D) Microscopicamente, há inflamação linfocitária e heterofílica com necrose de fibras musculares. HE, escala = 200 μ m.

5.2.5. Diagnóstico das lesões não infecciosas

Alterações não infecciosas foram classificadas como não traumáticas e traumáticas. As lesões não traumáticas representaram 56% das alterações (9/16) e as

lesões traumáticas 44% (7/16). Os sistemas ou tecidos com lesões não traumáticas foram o respiratório, reprodutor e hepatobiliar, e com lesões traumáticas foram o tegumentar, osseo e muscular. As lesões não traumáticas incluíram: cistos hepáticos (3/7), degeneração hepatocelular macrovacuolar (1/7), fibrose pulmonar (2/7) e maceração fetal (1/7) (Figuras 23 e 24). Os diagnósticos das lesões traumáticas foram de fratura (1/9), hematomas (4/7), mutilação ou laceração (3/9) e perfuração (1/9) (Figura 25).

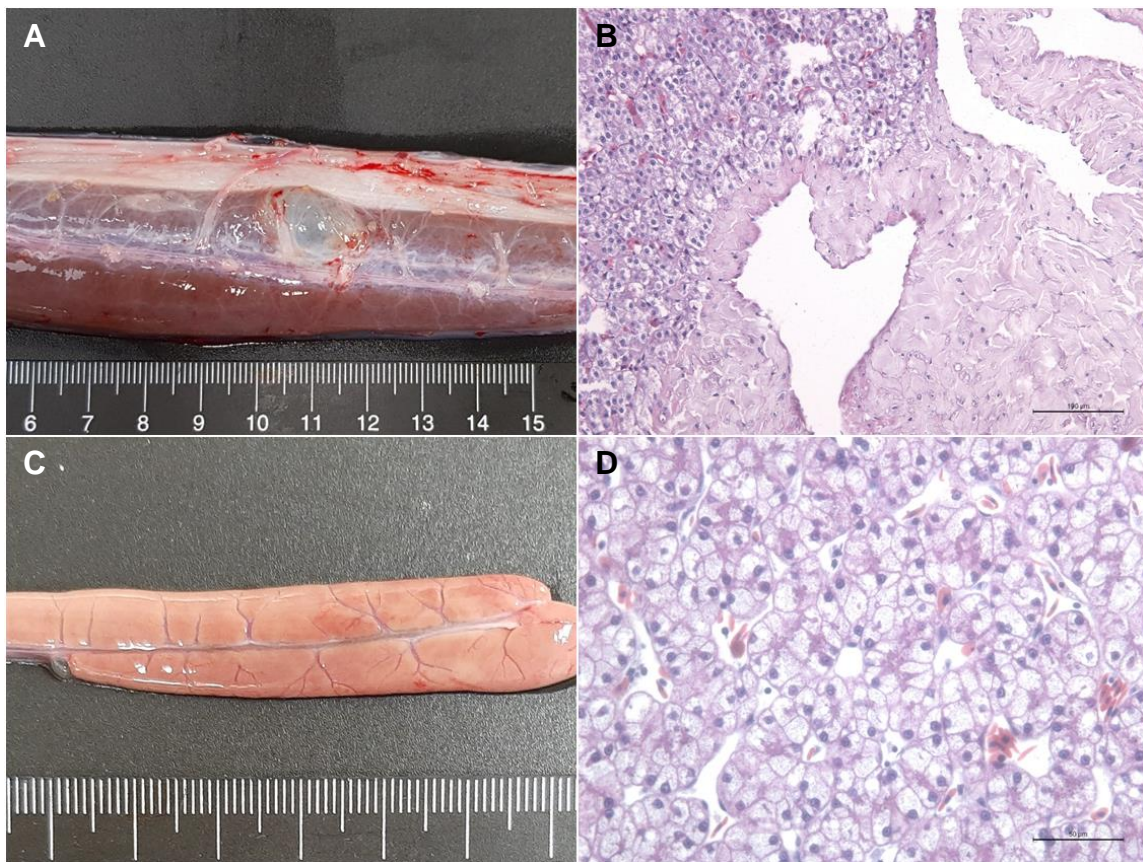


Figura 23. Características macro e microscópicas das lesões não infecciosas não traumáticas em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=9). A-B) Cisto hepático. (A) Parênquima hepático com cisto de 1 cm de diâmetro, brilhante e translúcido. (B) Microscopicamente parede do cisto é composta por tecido conjuntivo displásico, irregular, variando de delgado a espesso. C-D) Degeneração hepatocelular. HE, escala = 100 µm. (C) Palidez difusa e acentuada do fígado. (D) Hepatócitos com intensa vacuolização citoplasmática. HE, escala = 50 µm.

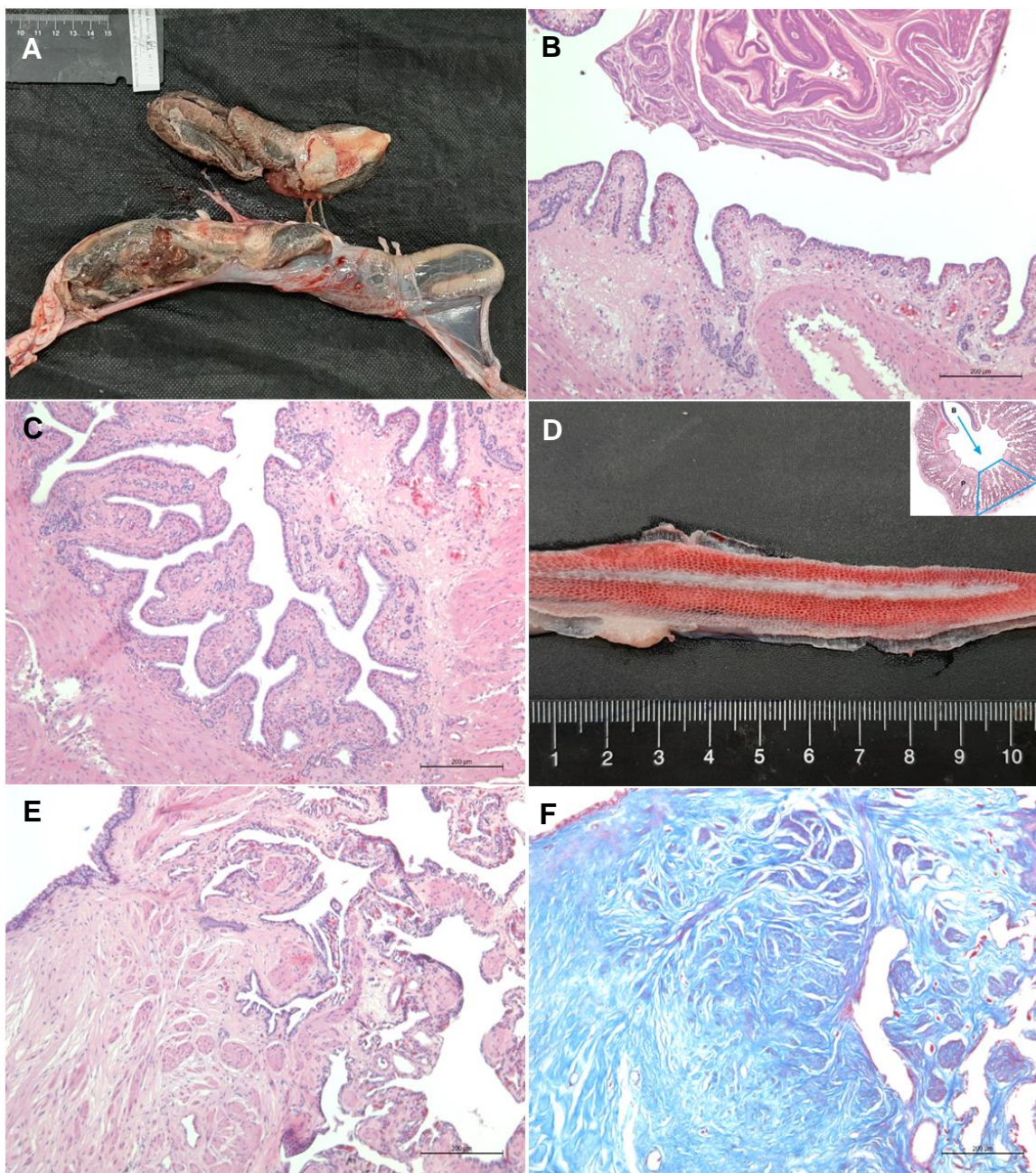


Figura 24. Características macro e microscópicas das lesões não infecciosas não traumáticas em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=9). A-C) Maceração fetal. (A) Útero com presença de fetos em processo de reabsorção. (B-C) Microscopia exhibe mucosa uterina congestionada e edemaciada e presença de feto no lúmen com tecido necrótico. HE, escala = 200 μ m. D-F) Fibrose pulmonar. (D) Lesão linear, deprimida e brancacenta no parênquima pulmonar. Detalhe em canto superior direito está a representação em corte transversal da área lesionada (entre linhas azuis) e posição contralateral ao lúmen brônquico (seta). (E) Área de transição de parênquima normal e esclerosado. Bandas aleatórias de colágeno denso substituem o tecido pulmonar. HE, escala = 200 μ m. (F) Corte histológico com intensa quantidade de colágeno com afinidade tintorial pelo azul de anilina. Tricômio de Masson, escala = 200 μ m.

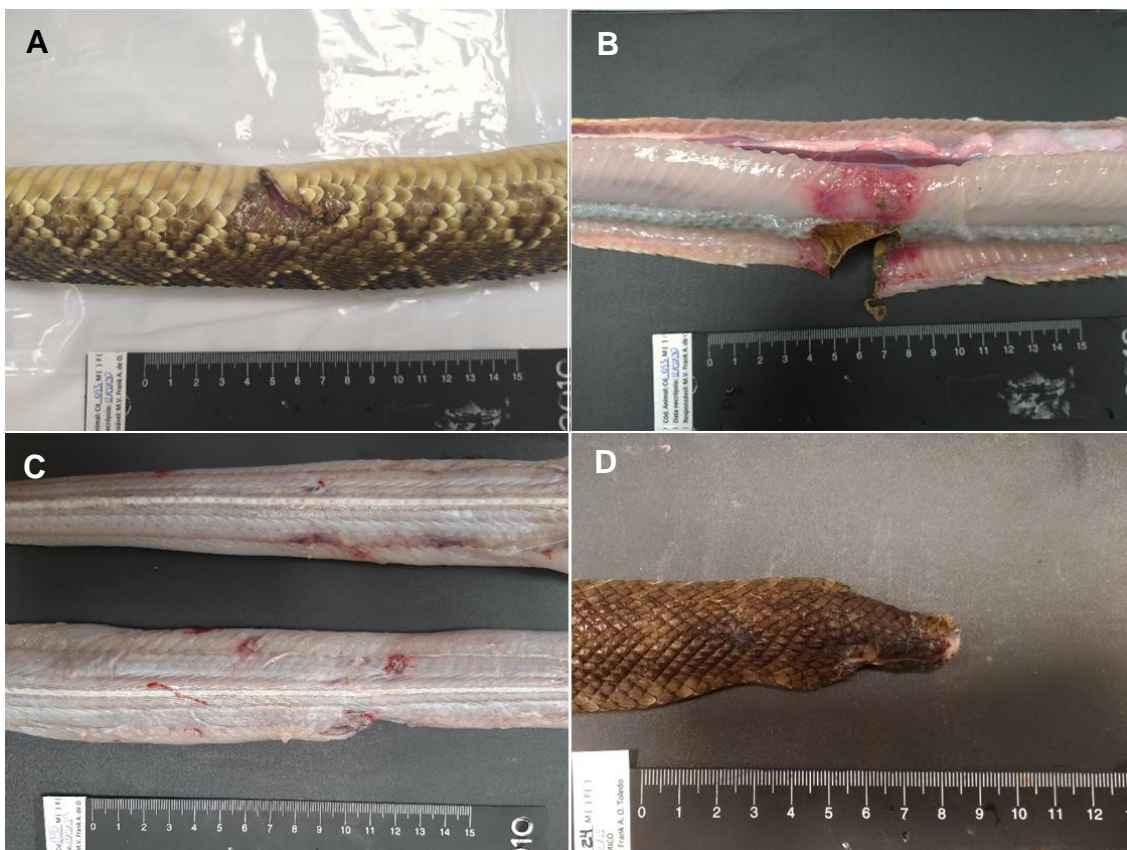


Figura 25. Lesões não infecciosas traumáticas em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=7). (A-B) Laceração linear, de aproximadamente 5 cm, profunda, com bordos da ferida necrosadas e musculatura com hematomas. (C) Múltiplos hematomas na musculatura intercostal e perfurações. (D) Amputação da cauda com presença de tecido cicatricial.

5.3. Avaliação parasitológica

5.3.1. Considerações gerais dos resultados parasitológicos

Dos 96 animais estudados, 59% eram parasitados (57/96) e 41% não tinham nenhum parasito metazoário (39/96). A frequência de parasitismo em função do sexo está apresentado na Figura 26. Todas as regiões tiveram serpentes parasitadas, mesmo as representadas por poucos animais. A quantidade de serpentes parasitadas ou não em função da mesoregião e sexo está apresentada na Figura 27. A frequência mensal de serpentes parasitadas ou não está apresentada no Figura 28.

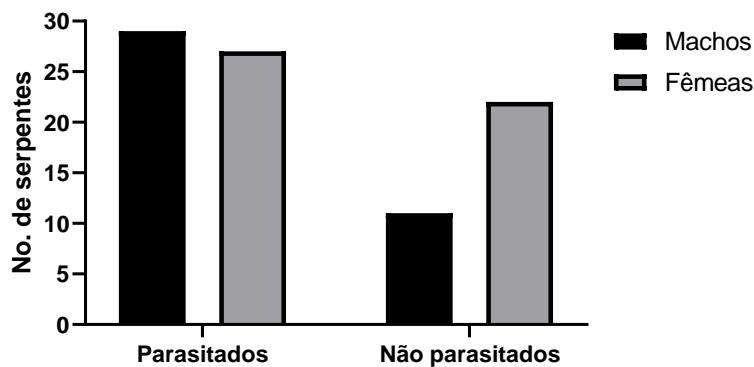


Figura 26. Frequência de parasitismo em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sexo (n = 96). As frequências foram comparadas pelo teste exato de Fisher ($P > 0,05$).

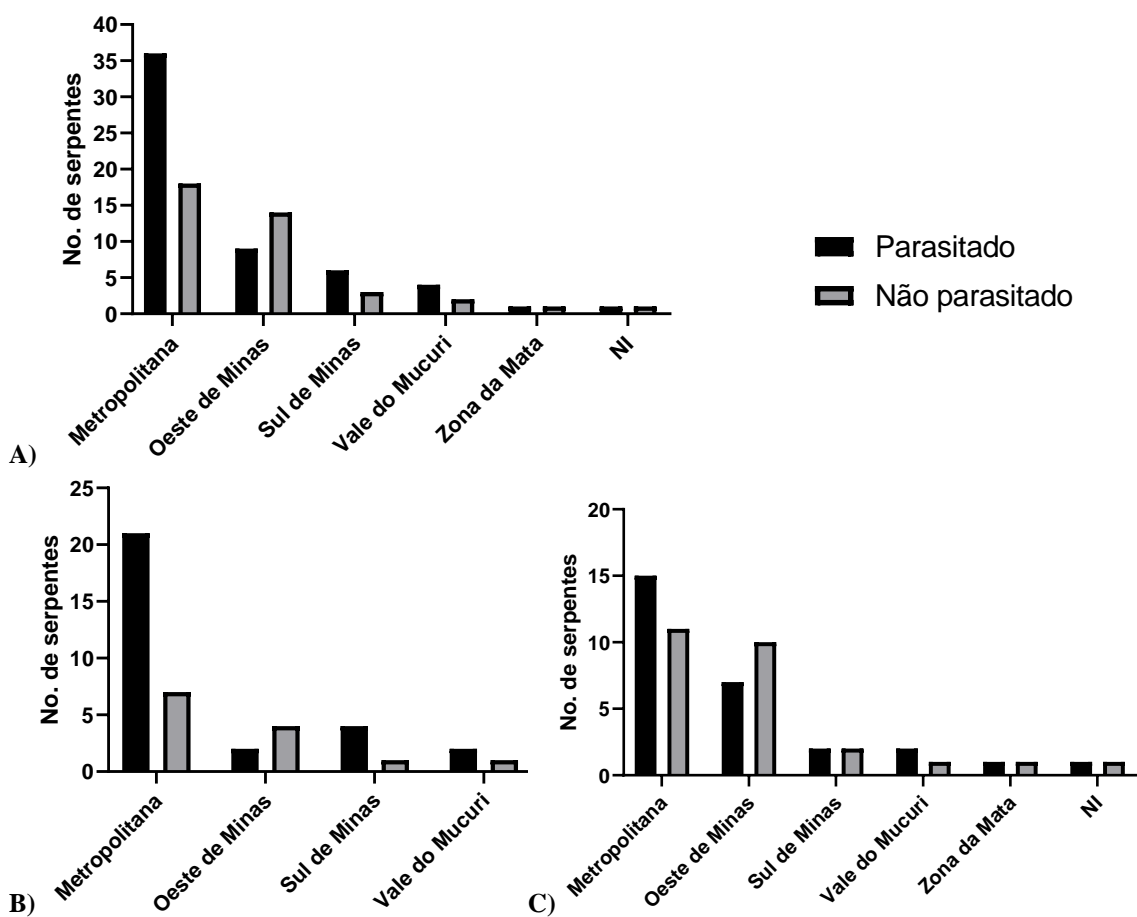


Figura 27. Frequência de parasitismo em *Crotalus durissus* de vida livre parasitadas no estado de Minas Gerais em função da mesoregião (N=96). (A) Frequência total de serpentes parasitadas ou não por mesoregião. (B) Frequência de machos parasitados ou não por mesoregião. (C) Frequência de fêmeas parasitadas ou não por mesoregião. As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P > 0,05$).

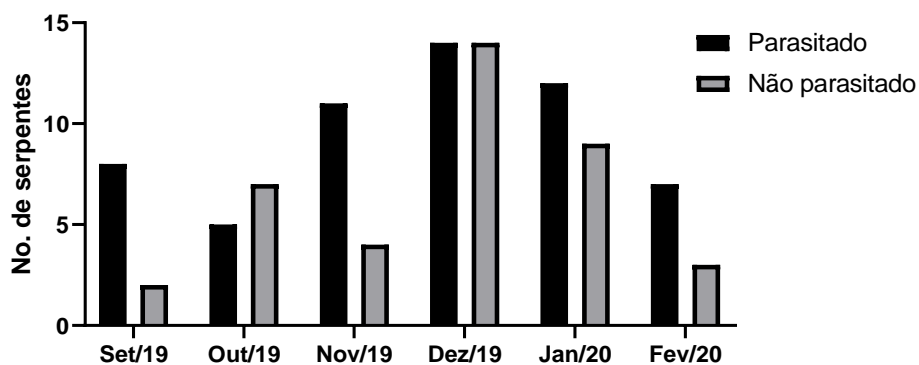


Figura 28. Frequência de parasitismo em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do mês (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

5.3.2 Descrição e diagnóstico parasitológico

Os parasitos metazoários encontrados foram classificados conforme grupos taxonômicos, representados por Acanthocephala (5/73), Cestoda (2/73), Nematoda (57/73), Pentastomida (2/73) e Ixodidae (5/73). Teve ainda, dois parasitos em fase larvária não identificados, e ambos estavam em cavidade celomática. Considerando essa taxonomia inicial, totalizou-se 73 casos nos 57 animais parasitados. O número de casos supera ao de animais devido a parasitose simultânea de um animal por mais de um tipo de parasito. A quantidade de machos e fêmeas parasitados em função da identificação inicial está representada na Figura 29.

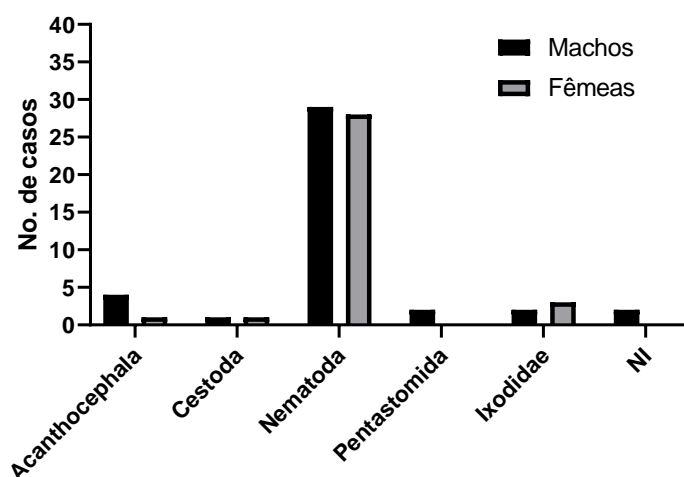


Figura 29. Frequência de machos e fêmeas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da classificação inicial dos parasitos (N=73). O número de casos supera o número de animais parasitados devido ao parasitismo simultâneo.

Os parasitos nematoides foram encontrados no estômago (51/97), pulmão (16/97), saco aéreo (2/97) e intestinos (12/97). A quantidade de animais parasitados em função do órgão ou tecido parasitado está apresentada na Figura 30. Quando observado a frequência de casos em função do órgão ou tecido parasitado, a quantidade de casos supera a quantidade animais devido a animais terem mais de um tipo de parasito e ou tecido parasitado. Nesse sentido, totalizou-se 97 casos em 57 animais parasitados.

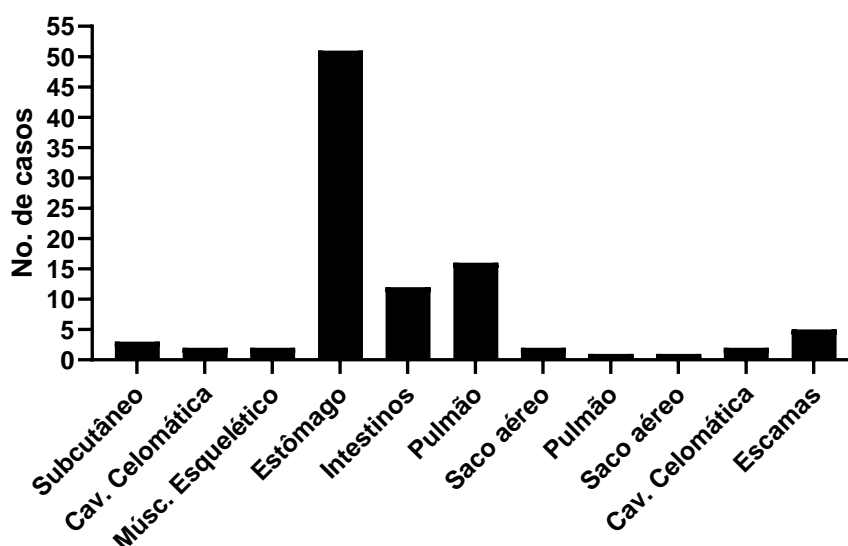


Figura 30. Frequência de parasitismo em função do órgão ou tecido parasitado em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=97). O número de casos supera o número de animais parasitados devido ao parasitismo simultâneo.

A identificação mais precisa feita posteriormente, por meio de análises microscópicas, permitiu a classificação específica dos endoparasitas. Dessa forma, a quantidade de parasitos identificados e distribuição nos órgãos e tecidos parasitados está apresentada na Tabela 1. Em um caso, referente ao esôfago, não foi possível o avanço diagnóstico morfológico devido a fase de larva do parasito. O número de casos supera a quantidade de animais parasitados devido ao parasitismo simultâneo por mais de um tipo de parasito ou por mais de um órgão ou tecido parasitado.

Tabela 1. Frequência de parasitismo em função da classificação taxonômica e órgão ou tecido parasitado em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais.

Parasito	Órgão/Tecido	N
Acanthocephala	Subcutâneo	3
	Cavidade Celomática	2
Cestoda	Músculo Esquelético	2
Nematoda	Estômago	51
	Intestinos	12
	Pulmão	16
	Saco aéreo	2
Pentastomida	Pulmão	1
	Saco aéreo	1
Não indentificado	Cavidade Celomática	2
Ixodidae	Escamas	5

Os nematoides ascaridídeos identificados se tratam de espécimes de *Ophidascaris* sp. e *Hexametra* sp. Na extremidade cefálica de ambas as espécies é possível observar três lábios com dentes, responsável pela fixação desses parasitos nas camadas profundas do estômago Figura 31. A distinção morfológica entre ambos foi realizada pela observação do interlábio e ramos uterinos (Sprent, 1988; Sprent, 1978). Espécimes do gênero *Ophidascaris* possuem interlábio e apenas dois ramos uterinos, enquanto representantes de *Hexametra* não possuem interlábio e apresentam seis ramos uterinos, conforme observado na Figura 32.

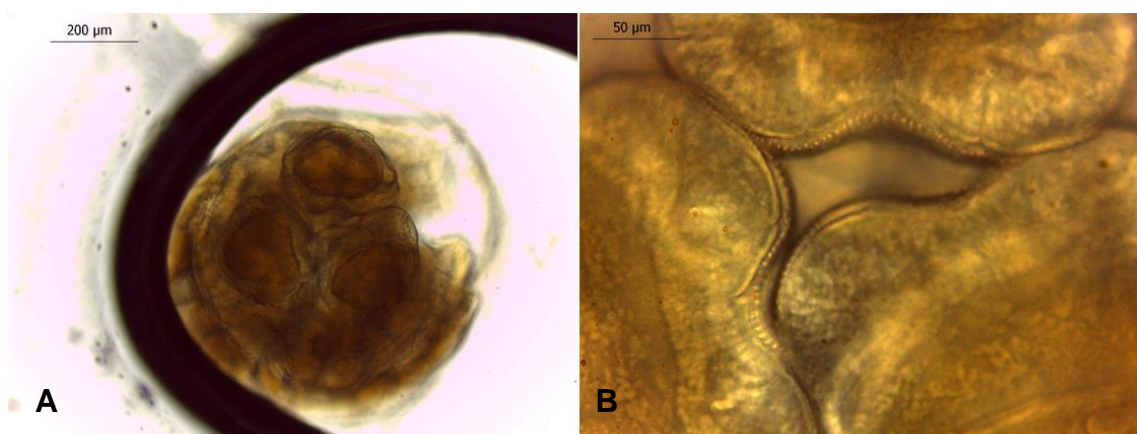


Figura 31. Vista apical do aparato bucal dos parasitos dos gêneros *Ophidascaris* e *Hexametra*. (A-B) Ambas as espécies possuem três lábios com pequenos dentes, que permitem a fixação firme desses parasitos nas camadas profundas do estômago.

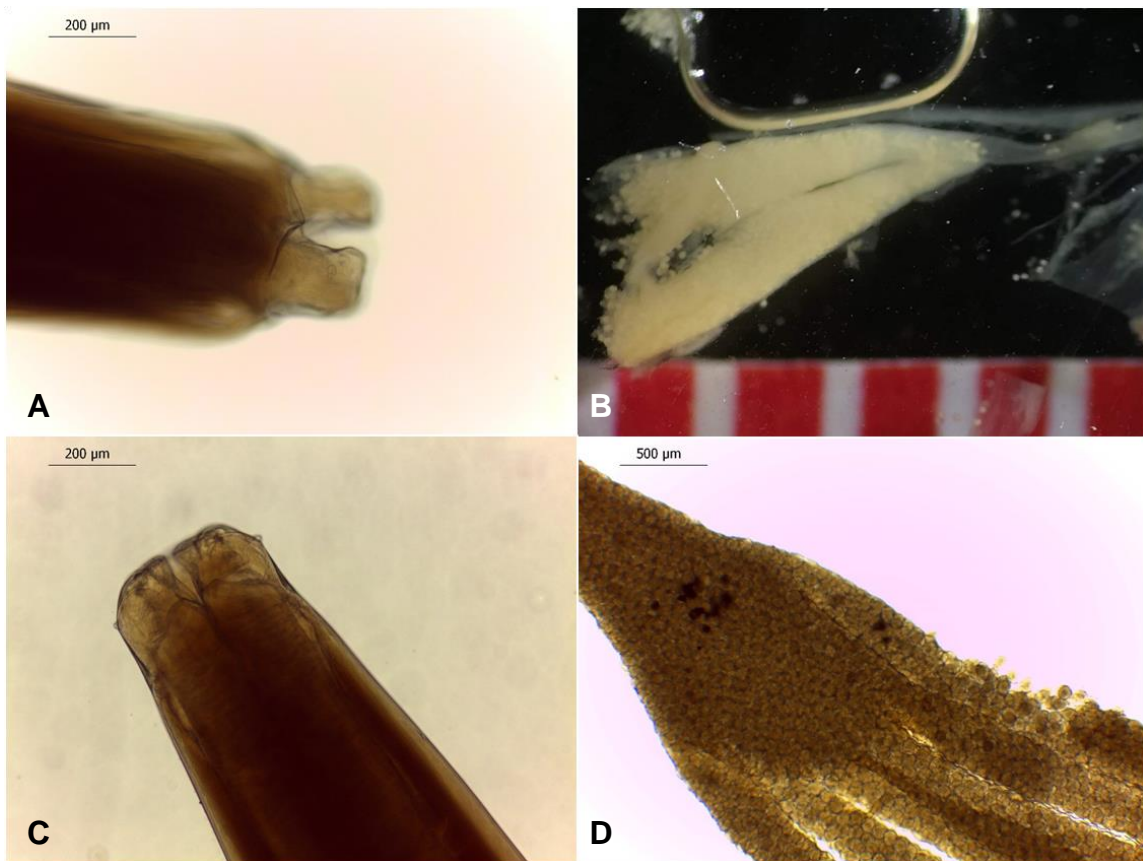


Figura 32. Caracterização morfológica dos gêneros *Ophidascaris* e *Hexametra*. A-B) Espécime de *Ophidascaris* sp. (A) Aparelho bucal com presença de interlábio e (B) presença de dois ramos uterinos. C-D) Espécime de *Hexametra* sp. (C) Ausência de interlábio e (D) presença de seis ramos uterinos.

Os nematoides pulmonares, *Serpentirhabdias* sp., são parasitos pequenos, aproximadamente 7 mm, pigmentados, que ficam livres no pulmão e saco aéreo. As fêmeas são partenogenéticas, portanto apresentam um órgão hemafrodita denominado singônio (Kuzmin *et al*, 2019; Tkach *et al*, 2014). Além disso, as fêmeas possuem ovos larvados (Figura 33).

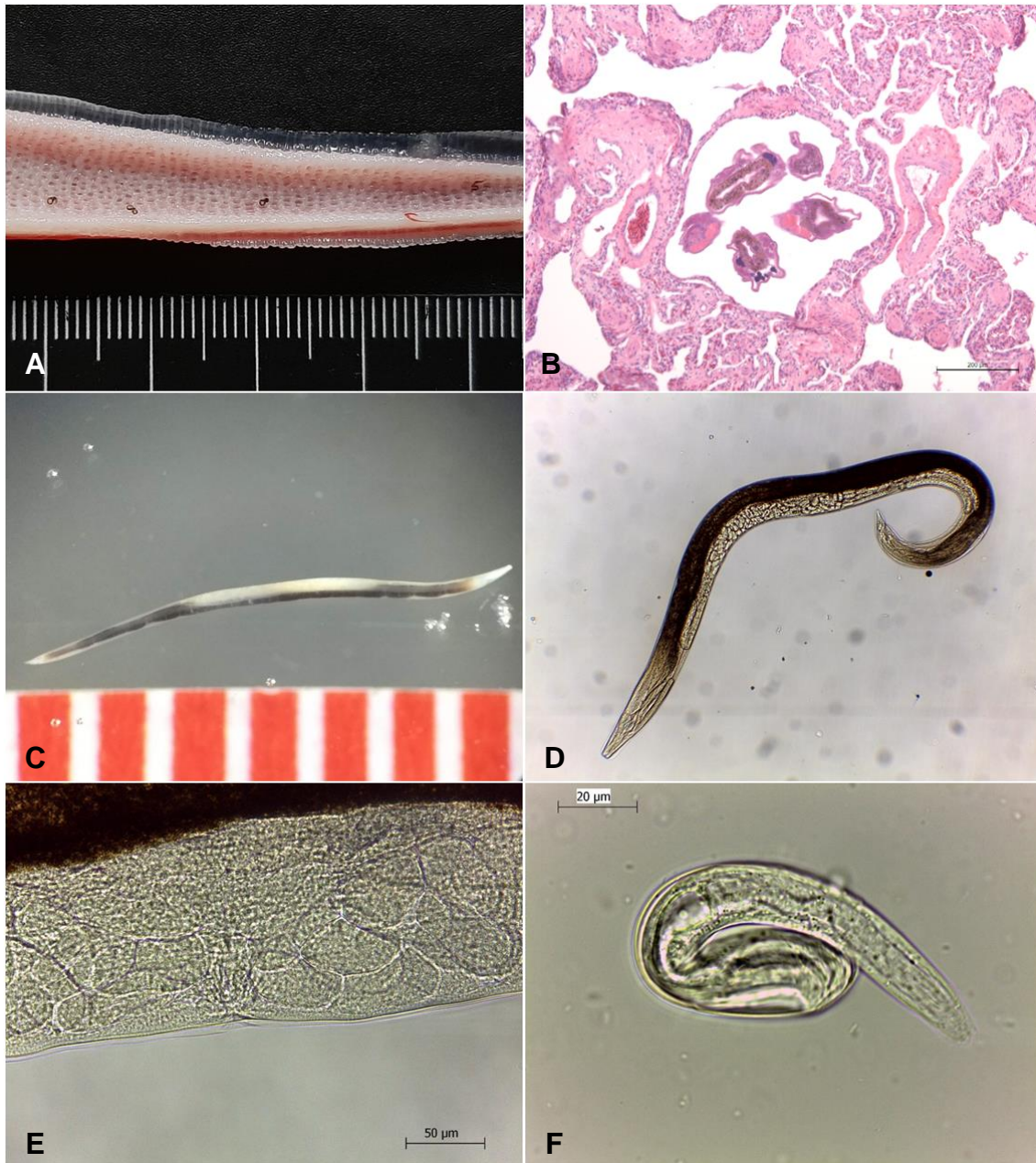


Figura 33. Características morfológicas do *Serpentirhabdias* sp. (A) Presença de *Serpentirhabdias* sp. no pulmão. Os espécimes são pequenos, de aproximadamente 7 mm e pigmentados. Frequentemente encontrados enrolados dentro dos faveolos. (B) Corte histológico dos parasitos dentro de um faveolo. (C) Espécime completamente relaxado e estendido após fixação por formalina a 4% pré aquecida. (D) Observação sob microscópio óptico após processo de clarificação. (E) Detalhe do útero contendo inúmeros ovos larvados. (F) Registro da larva em processo de eclosão.

Os nematodos intestinais *Kalicephalus* spp. foram identificados como duas espécies distintas, *Kalicephalus costatus costatus* e *Kalicephalus inermis inermis*. Esses ancilostomídeos podem chegar a medir até 2 cm e são encontrados no intestino delgado. O esôfago é curto e robusto e a capsula bucal possui três papilas e quatro placas anteriores observadas em vista lateral (Figura 34).



Figura 34. Características morfológicas do gênero *Kalicephalus*. (A) Intestino delgado com presença de acilostomídeos de 1 a 2 cm, delgados e brancacentos. (B) Vista lateral exibindo esôfago curto e robusto. (C) Capsula bucal em detalhe com três papilas e quatro placas anteriores.

A identificação e diferenciação entre as espécies foram realizadas pela morfologia da cauda e ramos dorsais, das fêmeas e machos respectivamente (Schad, 1962). Os

espécimes fêmeas de *K. inermis inermis* possuem cauda curta e robusta e os machos têm ramos terminais do raio dorsal do grupo V, enquanto fêmeas de *K. costatus costatus* possuem terminação caudal pontiaguda e os machos têm ramos terminais do raio dorsal do grupo III (Figura 35). Dos animais parasitados, quatro tinham *K. inermis* e três tinham *K. costatus*. Todos os tipos de raios dorsais estão no Anexo 3.

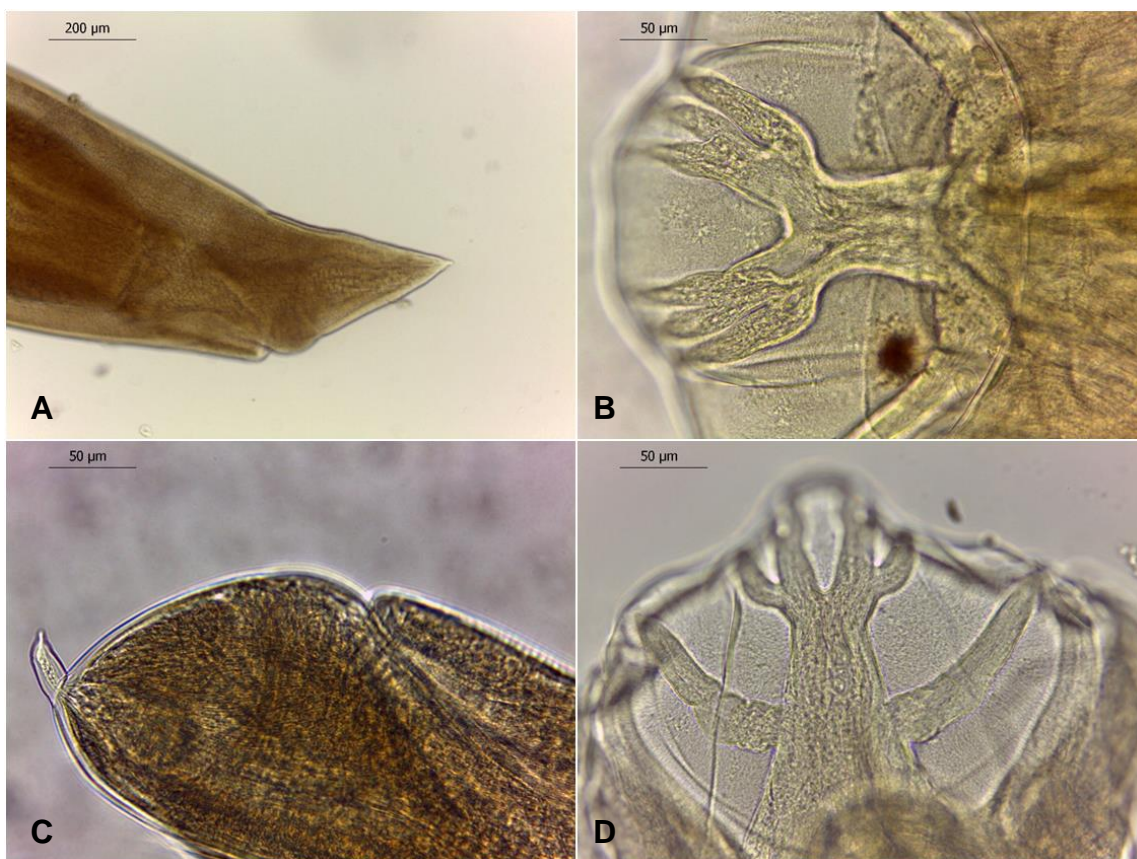


Figura 35. Distinção morfológica entre *Kalicephalus inermis inermis* e *Kalicephalus costatus costatus*. A-B) Espécimes de *K. inermis inermis*. (A) Cauda curta e robusta das fêmeas e (B) ramos terminais do raio dorsal do grupo V dos machos. C-D) Espécimes de *K. costatus costatus*. (C) Terminação caudal pontiaguda das fêmeas e (D) ramos terminais do raio dorsal do grupo III dos machos.

Os animais parasitados foram ainda agrupados conforme diversidade e combinação dos diferentes grupos de parasitos identificados. Dos 57 animais parasitados, 2 estavam parasitados por 4 grupos de parasitos, 5 estavam parasitados por 3 tipos de parasitos, 20 estavam parasitados por 2 tipos, e 30 animais estavam parasitados por apenas um grupo de parasito. A quantidade de animais parasitados por um ou mais

parasitos e a combinação dos grupos de parasitos encontrados estão apresentados na Figura 36. As quatro serpentes com combinação de quatro tipos de parasitos eram machos. A frequência de machos e fêmeas em função da quantidade de parasitos encontrados está apresentada na Figura 37.

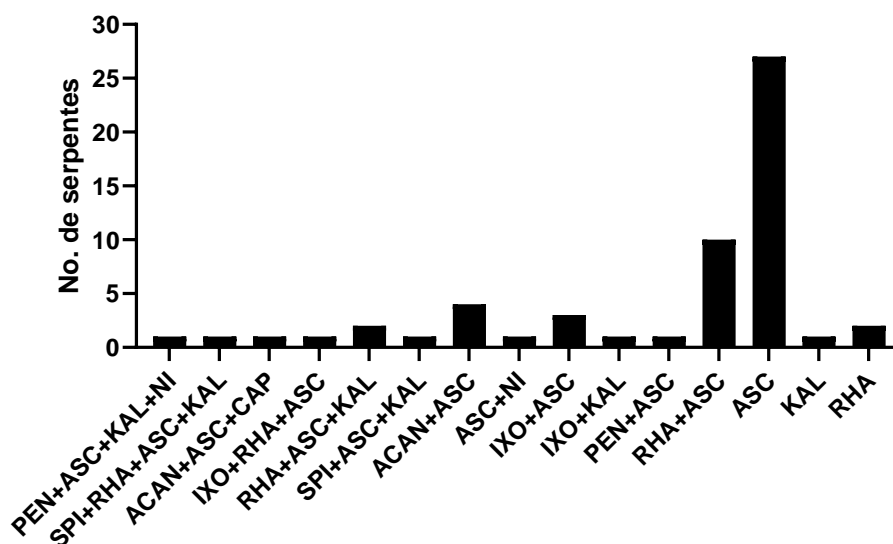


Figura 36. Frequência de parasitismo em função da combinação dos diferentes grupos de parasitos identificados em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=57). (ACAN = Acanthocephala; ASC = Ascarididae; CAP = Capilariidae; IXO = Ixodidae; KAL = Kalicephalus; PEN = Pentastomida; RHA = Serpenterhabdias; SPI = Spirometra; NI = Não identificado).

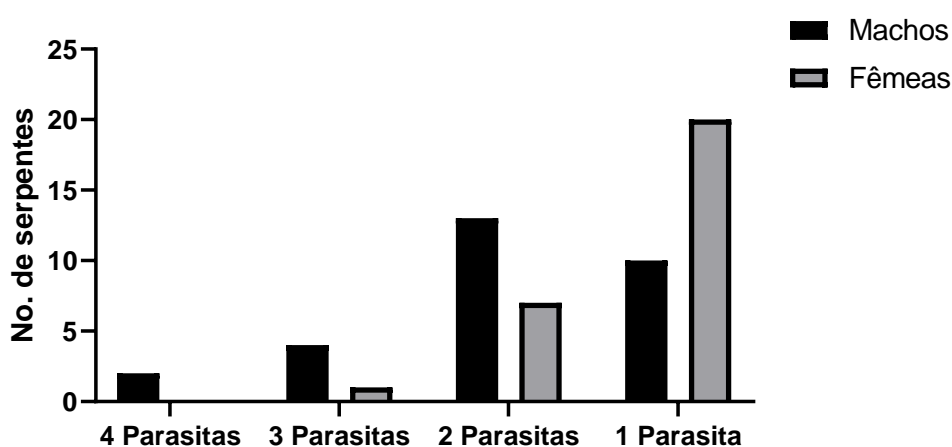


Figura 37. Frequência de parasitismo em função da combinação dos diferentes grupos de parasitos identificados em machos e fêmeas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (N=57). As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P > 0,05$).

5.4. Avaliação toxicológica

Os valores de média, mediana, mínima, máxima e desvio padrão para cada elemento avaliado nas serpentes estão descritos na Tabela 2. O magnésio foi o elemento com maior concentração residual considerando o valor máximo encontrado, seguido de zinco, chumbo, cobre, cromo e cádmio.

Tabela 2. Concentração de metais na população de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais.

Elementos	Média	Mediana	Mín.	Max.	σ
Mg	776,14	248,8	1,9	23380	3338
Zn	27,44	18,9	1,2	195,7	20,75
Cu	3,27	2,5	1,2	22,2	2,14
Cd	3,19	2,3	0,2	8,8	2,45
Cr	0,66	0	0,3	12,6	2,14
Pb	5,98	0	1,1	26,3	8,83

(valores em $\mu\text{g/g}$ de matéria seca; σ = desvio padrão)

Quando avaliada a concentração residual dos metais em função do sexo, observou-se que Cd e Pb tiveram maior bioacumulação nos machos que em fêmeas, com valores significativos ($p < 0,05$). Quando avaliado o acúmulo dos elementos em função do peso, animais acima e abaixo de 596g, os valores de Cd e Pb foram significativamente maiores nos animais acima de 596g (Figura 38). A concentração dos elementos nos animais em função da mesoregião foram significativamente diferentes entre os grupos (Figura 39). Os elementos Mg e Zn foram significativamente maiores nos animais do Oeste de Minas (Figuras 39 A e B). O grupo das Demais Regiões teve concentrações significativamente maiores de Cd quando comparado ao grupo Oeste (Figura 39C), e de Cr quando comparado ao grupo Metropolitana (Figura 39D).

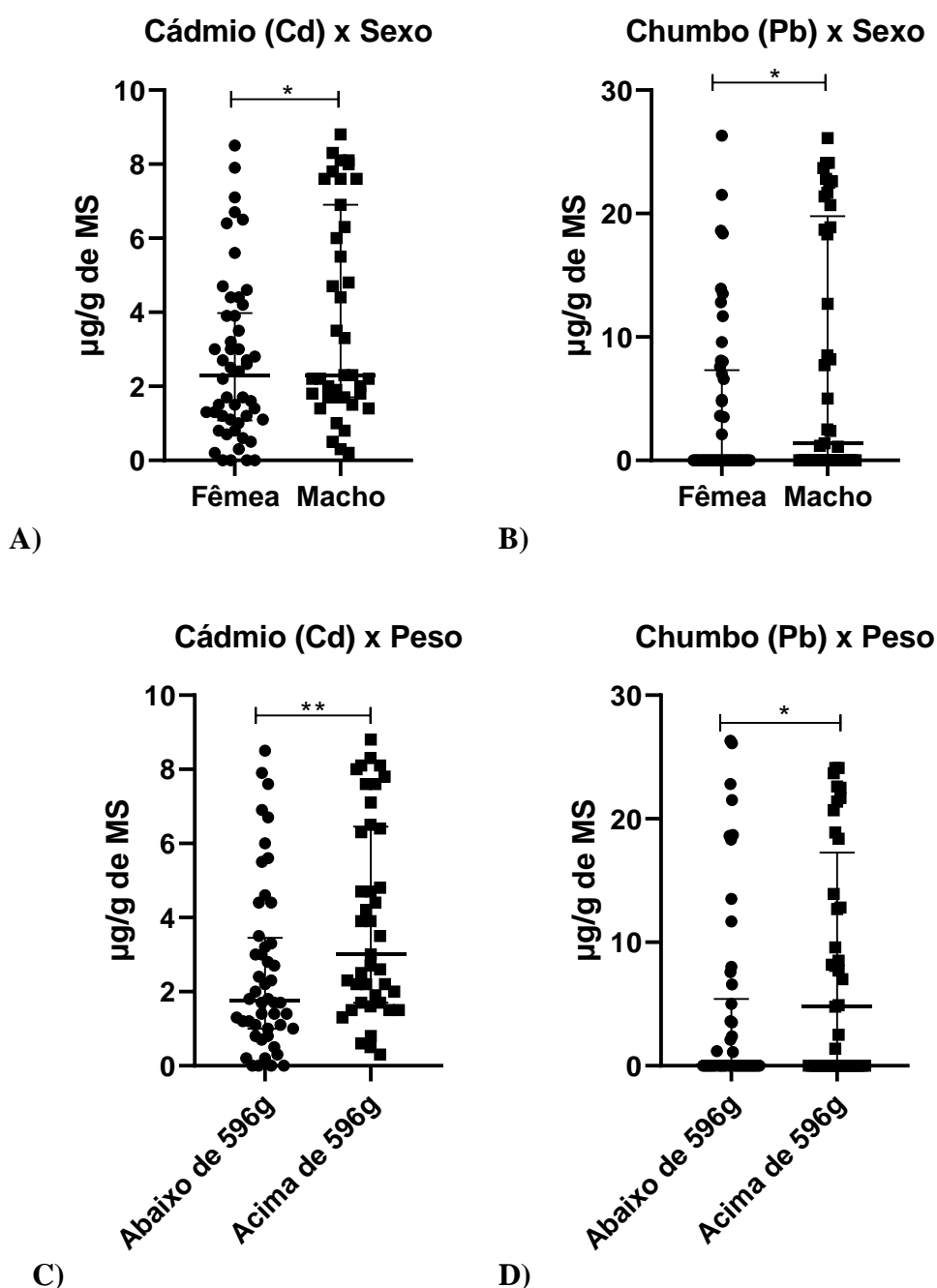


Figura 38. Concentração de metais pesados em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sexo e peso. (A) Níveis de Cd em função do sexo ($p=0,0429$). (B) Níveis de Pb em função do sexo ($p=0,0434$). (C) Níveis de Cd em função de serpentes acima e abaixo do peso médio ($p=0,0056$). (D) Níveis de Pb em função de serpentes acima e abaixo do peso médio ($p=0,0323$). Dados analisados pelo teste de Mann-Whitney e as barras dos gráficos gerados pelos valores de mediana e amplitude interquartil. (μg =micrograma, g =grama, MS =matéria seca).

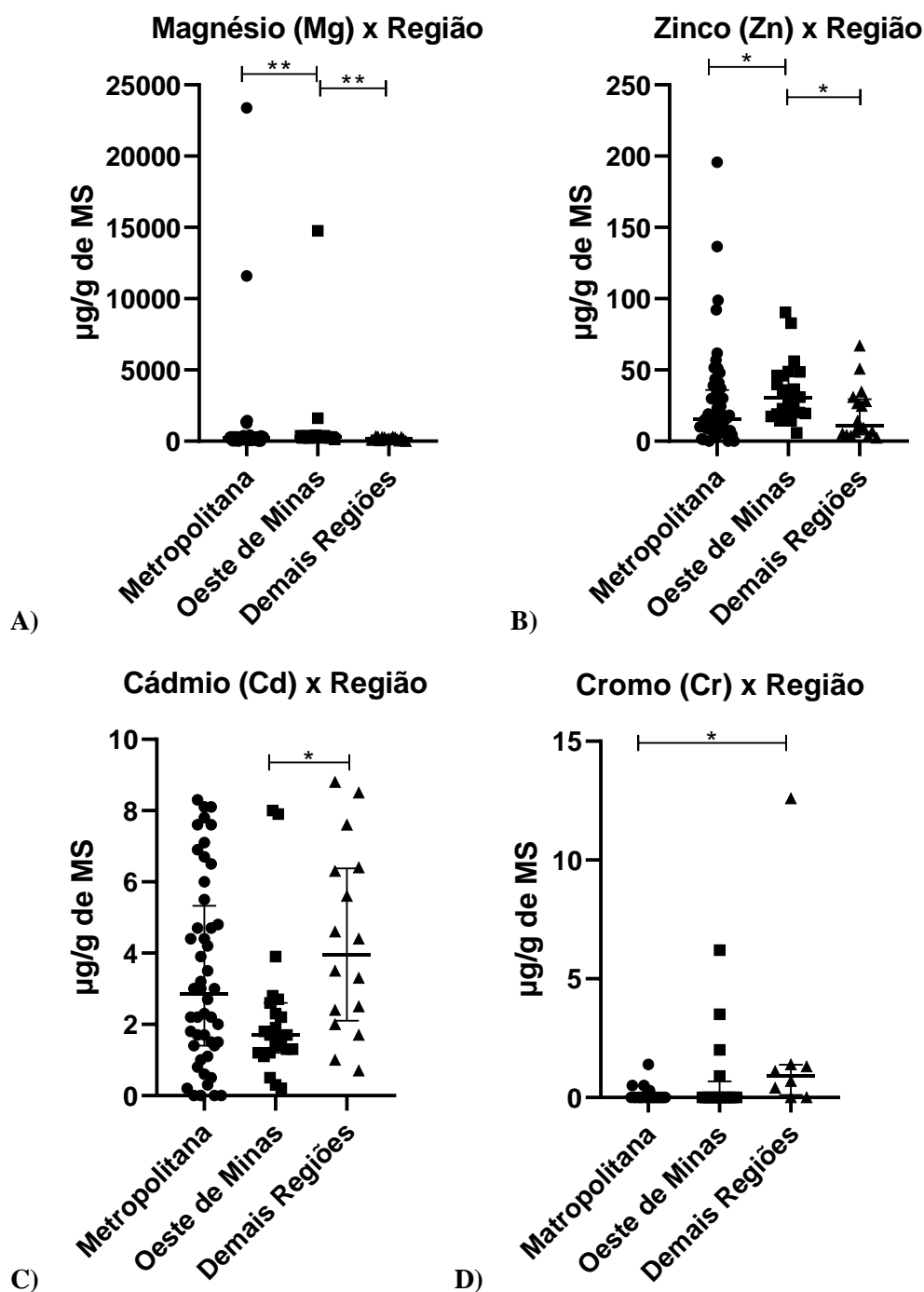


Figura 39. Concentração de metais pesados em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da mesoregião. (A) Níveis de Mg em função das mesoregiões (Oeste x Metropolitana $p=0,0071$ e Oeste x Demais $p=0,0022$). (B) Níveis de Zn em função das mesoregiões (Oeste x Metropolitana $p=0,0466$ e Oeste x Demais $p=0,0279$). (C) Níveis de Cd em função das mesoregiões ($p=0,0258$). (D) Níveis de Pb em função das mesoregiões ($p=0,0049$). Dados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por teste *post-hoc* de comparação múltipla de Dunn, com as barras dos gráficos gerados pelos valores de mediana e amplitude interquartil. (μg =micrograma, g=grama, MS=materia seca).

5.5. Avaliação hematológica e bioquímica

Das 96 amostras de sangue, 11 tiveram o sangue coagulado e não foram submetidas ao exame de hemograma. Os valores de média, mediana, mínima e máxima dos parâmetros hematológicos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil hematológico de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais (n = 85).

Parâmetros Hematológicos	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	σ	Ref.*
Proteínas plasmáticas totais	4.49	4.40	2.00	9.60	1.11	
[] de Hemácias ($10^3/\mu\text{L}$)	601.05	550.00	252.50	1610.00	228.52	423,3 \pm 94,7
Volume globular (%)	28.75	29.00	19.00	43.00	4.59	24 \pm 3,8
Volume Corpuscular Médio (fL)	518.00	527.27	217.39	822.22	130.23	588 \pm 124
[] de Leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$)	8.26	8.00	0.01	28.50	5.15	2,5 \pm 1,7
[] relativa de Progranulocitos (%)	2.00	1.00	0.00	11.00	2.00	
[] absoluta de Progranulocitos ($/\mu\text{L}$)	124.24	57.50	0.00	604.80	155.78	
[] relativa de Heterófilos (%)	13.57	11.00	0.00	59.00	12	7,4 \pm 7,4
[] absoluta de Heterófilos ($/\mu\text{L}$)	1130.31	650.00	0.00	7965.00	1415.59	
[] relativa de Basófilos (%)	1.00	0.00	0.00	9.00	1.76	0,8 \pm 1,3
[] absoluta de Basófilos ($/\mu\text{L}$)	61.95	0.00	0.00	967.50	135.37	
[] relativa de Linfócitos (%)	54.82	56.00	8.00	87.00	19.56	71,1 \pm 19,3
[] absoluta de Linfócitos ($/\mu\text{L}$)	4114.62	3117.50	0.00	14940.00	3488.2	
[] relativa de Monócitos (%)	28.85	25.00	5.00	71.00	15.45	18,3 \pm 15,4
[] absoluta de Monócitos ($/\mu\text{L}$)	2357.82	1842.50	0.00	11093.75	2289.90	

(μL = microlitro; fL = femtolitro ou 1 micrômetro cúbico; σ = desvio padrão; Ref.* = valores de referência de Grego *et al.*, 2014).

A concentração de hemácias apresentou-se aumentada em 56,4% dos animais (48/85), normal em 40% (34/85) e abaixo em apenas 3,5% (3/85). Desses três animais, todos apresentaram volume corpuscular médio aumentado. O volume globular esteve aumentado em 61% dos animais (52/85).

Em relação aos leucócitos totais, 67% apresentaram leucocitose (57/85), 31% tiveram valores normais (27/85) e apenas 2,3% apresentaram leucopenia (2/85). Ambos os animais leucopênicos não tiveram alteração morfológica nem parasitos metazoários. Heterofilia relativa foi observada em 31,7% (27/85), monocitose em 30,5% (26/85) e basofilia em 11,7% (10/85). Não foi observado linfocitose relativa nos animais, mas linfopenia ocorreu em 40% dos animais (34/85).

Dentre parâmetros bioquímicos frequentemente aumentados nos animais foram glicose, proteína e albumina, com 80% (55/68), 75,3% (52/69) e 68,1% (47/69) dos animais respectivamente. Por outro lado, os analitos frequentemente abaixo foram ácido úrico e creatinina, com 80% (60/75) e 51,4% (36/70) respectivamente. Todos os animais tiveram valores normais para ALT, FA, GGT, amilase e globulina. O perfil bioquímico em função da média, mediana, mínima, máxima e desvio padrão estão na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil bioquímico de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais.

Bioquímico (N)	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	σ	Ref.*
Ureia (71)	3.73	2.90	0.15	15.55	2.91	3,72 ± 2,69
Creatinina (70)	0.34	0.33	0.04	1.33	0.21	1,28 ± 0,95
ALT (41)	7.86	3.90	0.50	68.70	14.24	
AST (64)	23.07	14.30	0.90	106.00	23.61	7,55 ± 9,21
FA (72)	42.53	38.43	9.96	104.91	18.23	56,06 ± 77,36
GGT (46)	1.47	1.20	0.10	10.60	1.56	
Glicose (68)	52.53	44.58	1.07	285.89	36.02	21,42 ± 9,76
Amilase (68)	1385.92	1346.85	438.90	2980.00	541.17	
Proteína (69)	3.92	3.85	2.43	7.80	0.90	2,75 ± 0,63
Albumina (69)	1.61	1.62	0.20	2.89	0.36	1,13 ± 0,35
Globulina (69)	2.10	2.12	0.00	4.91	0.90	
Ácido úrico (75)	3.31	2.26	0.67	26.07	3.88	8,36 ± 4,77
Colesterol (35)	155.27	134.91	41.27	530.56	84.28	228,17 ± 66,7
Cálcio (33)	13.15	13.00	10.10	15.40	1.23	12,18 ± 2,01
Triglicerídios (35)	38.89	14.90	2.37	586.33	97.23	

ALT = alanina aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; FA = fosfatase alcalina; GGT = gamaglutamiltransferase, σ = desvio padrão; Ref.* = valores de referência de Grego *et al*, 2014).

A frequência de hemoparasitose nas serpentes foi 24% (23/96), tendo os machos 35% e fêmeas 26% de representatividade (Figura 40). A quantidade de serpentes hemoparasitadas em função da mesoregião e mês está apresentada na Figura 41. Os microorganismos foram morfológicamente compatíveis com *Hepatozoon* sp. e *Trypanossoma* sp. (Figura 42), 22 serpentes e uma serpente respectivamente.

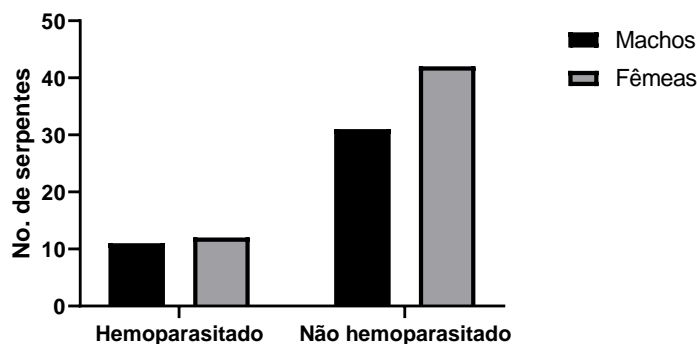


Figura 40. Frequência de hemoparasitose em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função do sexo (N=96). As frequências foram comparadas pelo teste Exato de Fisher ($P>0,05$).

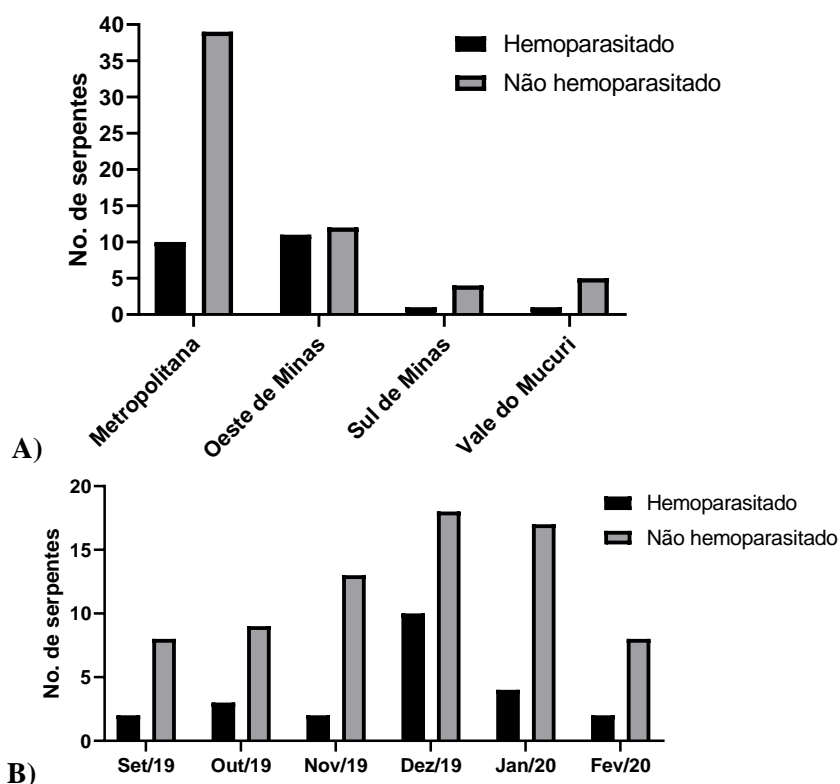


Figura 41. Frequência de hemoparasitose em *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais em função da mesoregião e mês (N=96). (A) Quantidade de serpentes hemoparasitadas ou não por mesoregião. (B) Quantidade mensal de serpentes hemoparasitadas ou não. As frequências foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($P>0,05$).

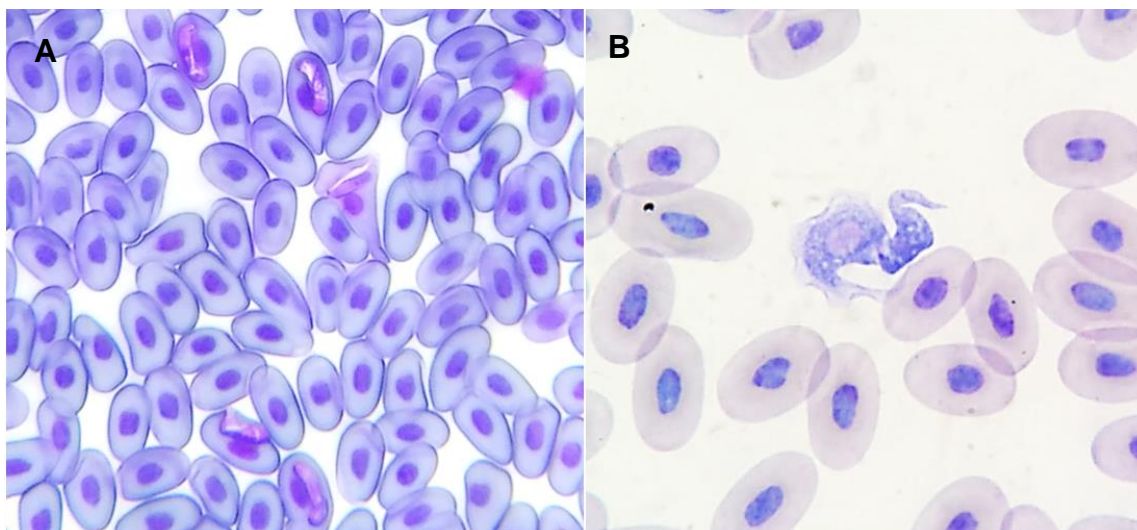


Figura 42. Esfregaço sanguíneo com hemoparasitidas de *Crotalus durissus* de vida livre no estado de Minas Gerais. (A) Microorganismos morfológicamente compatíveis com *Hepatozoon* sp. e com (B) *Trypanosoma* sp.

6. DISCUSSÃO

6.1. Considerações Gerais

A distribuição de machos e fêmeas nos diferentes grupos, seja em função da mesoregião ou mês, foi semelhante, com diferenças não significativas. A quantidade predominante de animais adultos justifica-se pelo hábito alimentar e necessidade de caça, que os fazem percorrer maiores distâncias em busca principalmente de roedores. Além disso, a urbanização descontrolada tem favorecido o encontro do homem com esses animais (Carvalho e Nogueira, 1998).

A maioria dos animais em estudo é procedente da região Metropolitana de Belo Horizonte, a mais populosa do estado e também onde se localiza a FUNED, responsável por receber animais peçonhentos de todo estado. Segundo censo de 2010, publicado pelo Governo de Minas Gerais em 2014, a região possui mais de 6 milhões de habitantes e representa aproximadamente 30% da população total do estado (Anexo 3). Tanto a densidade populacional quanto a localidade da FUNED, podem ter contribuído para a alta representatividade da região Metropolitana.

A quantidade mensal de animais necropsiados teve aumento gradativo com pico em dezembro de 2019, seguido de declive nos meses seguintes. Os meses de janeiro e fevereiro de 2020 deveriam apresentar um crescimento contínuo no número de animais

recebidos pela FUNED, pois no verão ocorre maior número de acidentes ofídicos em Minas Gerais (Bonan *et al*, 2010). Esse efeito pode estar associado às fortes chuvas que atingiram o estado no mês janeiro, fazendo com que a população humana se mantivesse abrigada. Pinho e Pereira (2001) associa os acidentes ofídicos ao trabalho no campo, tanto que os casos são representados em sua maioria pela população rural. Conforme dados do Instituto Nacional de Meteorologia, o mês de janeiro de 2020 teve um aumento de chuva de quase dez vezes maior referente a janeiro do ano anterior e um volume acumulado maior que o esperado para o ano todo de 2020 (Anexo 4).

6.2. Alterações anatomo-patológicas

6.2.1. Lesões infecciosas associadas a metazoários

A maioria das lesões associadas a metazoários observadas foram associadas aos ascaridídeos gástricos, *Ophidascaris* sp. e *Hexametra* sp. Dos 56 animais com lesão, 46 tinham gastrite granulomatosa. Essas alterações indicam uma frequência de 47,91% na população estudada (46/96). Segundo Ossiboff (2018), este é um achado comum em serpentes de vida-livre. Em animais de cativeiro, a frequência de ascarídeos pode chegar a 80% (Pinto *et al*, 2010).

Segundo Sprent (1970), as serpentes são infectadas ao ingerir o hospedeiro intermediário roedores e marsupiais, contendo os parasitos, em seguida as larvas migram para cavidade celomática e pulmão onde ocorre o terceiro estágio larvário. Essa fase pode ocasionar inflamação granulomatosa multifocal em diversos tecidos (Ossiboff, 2018). Dos 46 animais parasitados pelos ascaridídeos, 18 apresentaram serosite granulomatosa, que corresponde a uma frequência de 18,75% (18/96).

Os parasitos são observados no esôfago, estômago e intestino no quarto estágio larvário 117 dias após a infecção (Sprent, 1970). No presente estudo, os ascarídeos foram observados exclusivamente no estômago. Embora raros espécimes tenham sido encontrados no esôfago e intestino, os parasitos não estavam fixados a mucosa, tampouco desencadeando algum processo inflamatório. Nesse caso, atribuíram-se a esses achados uma provável migração *post-mortem*.

6.2.2. Lesões infecciosas associadas a protozoários

As lesões em serpentes associadas a presença de *Sarcocystes* sp. são pouco relatadas, e quando presentes tendem a ser discretas e observadas microscopicamente. No entanto, Daszak e Cunningham (1995) descrevem um caso de intenso parasitismo associado a morte por anorexia. Os autores descrevem que durante necropsia a mucosa intestinal da serpente se apresentava espessa e edemaciada.

O ciclo de vida desses coccídeos ocorre obrigatoriamente em dois hospedeiros. São encontrados principalmente na musculatura esquelética de herbívoros domésticos ou silvestres. Os predadores carnívoros são infectados após se alimentarem das presas e se tornam hospedeiros definitivos, com os zoítas migrando para o epitélio intestinal (Gardiner *et al*, 1988).

As demais infecções protozoais foram dois casos de colites necro-hemorrágicas associadas a *Cryptosporidium serpentis* e *Entamoeba invadens*. Portanto, apresentando frequência de aproximadamente 1% (1/96). Ambos os protozoários são importantes tanto em serpentes de vida-livre quanto de cativeiro, e podem resultar em doença clínica significativa e morte (Jacobson, 2007).

Em serpentes de cativeiro, *Cryptosporidium serpentis* teve prevalência de 44% (11/25), com prevalência maior em cascavéis representada por 57,14% (4/7), em amostras colhidas por lavado gástrico e examinadas por PCR (Ruggiero *et al*, 2011). Em análises fecais de 90 serpentes também de cativeiro, 13 foram positivas para *C. serpentis*, correspondendo a 14,44% (Graczyk e Cranfield, 2000). Nesse caso, o método diagnóstico utilizado é menos sensível e a pesquisa utilizou diferentes espécies de serpentes. Em estudo com colubrideos de vida-livre a prevalência chegou a 20%. Foram cinco animais sorologicamente testados para *Cryptosporidium* e apenas um animal teve resultado positivo (Knafo *et al*, 2016).

Enquanto diversos parasitos de répteis necessitam de hospedeiro intermediário, a *Entamoeba invadens* é um importante patógeno transmitido por contato direto com animais infectados. É responsável por causar enterites e hepatites necrotizantes em répteis (Jacobson, 2007). Em serpentes de cativeiro submetidos a análise de hibridização *in situ*,

de 10 cascavéis avaliadas apenas uma foi positiva para *E. invadens*, e num total de 182 serpentes, 13 foram positivas para *Entamoeba* sp. (Richter *et al*, 2008).

A temperatura parece ser um fator importante na patogenia da *E. invadens* em serpentes. Em pesquisa realizada com oito serpentes de diferentes espécies infectadas por *E. invadens*, nenhuma apresentou alteração morfológica a 13°C, e o protozoário continuou sendo isolado por cultura em todas elas. No entanto, quando em temperatura mais elevada, todas as serpentes apresentaram alterações patológicas (Barrow e Stockton, 1960). Nesse sentido, a prevalência de *E. invadens* pode ser influenciada pela sazonalidade e clima. Isso poderia justificar a baixa prevalência encontrada no estudo, considerando que o mês de janeiro de 2020 foi atípico no estado.

6.2.3. Lesões infecciosas associadas aos patógenos fúngicos

As lesões fúngicas foram observadas na pele (6/7) e músculo (1/7). Essas lesões foram encontradas em seis animais, no caso, um deles com dermatomiosite, que representa frequência de 6,25% na população estudada (6/96). Os processos inflamatórios observados foram necrotizantes e em diferentes intensidades e distribuição, acometendo escamas dorsais e ventrais da cabeça e do corpo. Em todos os casos foram observados hifas morfológicamente compatíveis com *Ophidiomyces ophiodiicola*. A doença causada por esse fungo, *Snake Fungal Disease*, foi inicialmente relatada em cascavéis norte-americanas e tem sido considerada emergente desde 2006 (Lorch *et al*, 2016). Em estudo utilizando diagnóstico por qPCR em diferentes populações de cascavéis de vida-livre, a prevalência de *Ophidiomyces* variou de 3 a 17% (Hileman *et al*, 2018).

Em infecção experimental de *O. ophiodiicola* em colubrideos, todos os animais infectados apresentaram lesões semelhantes aos relatados em serpentes de vida-livre. O início das alterações ocorre entre 4 e 8 dias após inoculação e começa com a palidez e o edemaciamento das escamas. Posteriormente, as escamas ficam amareladas e mais espessas. Em seguida as lesões se tornam escuras, irregulares e com formação de crostas (Lorch *et al*, 2015). Esses aspectos macroscópicos foram semelhantes aos encontrados nesse estudo, confirmado posteriormente nos cortes histológicos.

Micoscopicamente pode ser observado discretas áreas de necrose com infiltrado heterofílico na epiderme e derme. Nas regiões de necrose epidérmicas são encontradas

hifas de paredes paralelas, por vezes septadas, raramente ramificadas, que possuem afinidade tintorial para ácido periódico de Schiff (PAS) e metenamina de prata de Grocott (GMS). Em alguns animais, também pode se observar granulomas associados às hifas (Lorch *et al*, 2015).

As lesões associadas ao *O. ophioidiicola* foram encontradas em serpentes em praticamente todos os meses, não sendo representado apenas no mês de novembro. Segundo Lorch *et al* (2016), o *O. ophioidiicola* é o principal agente das infecções fúngicas cutâneas em serpentes de vida-livre, e que geralmente afeta animais saindo do período de hibernação.

6.2.4. Lesões infecciosas de etiologia indefinida

A serpente que apresentou gastrite ulcerativa focal apresentava um ascaridídeo livre e um roedor parcialmente digerido no estômago. Nesse sentido, suspeita-se de que a captura possa ter desencadeado a lesão, atribuída a imunossupressão por estresse e o comprometimento do processo de digestão. A migração de larvas pela parede gástrica e fixação dos *Ophidascaris* adultos na mucosa podem ocasionar infecções bacterianas secundárias (Sprent, 1970; Ossiboff, 2018). A presença do camundongo com diminuição da motilidade gástrica podem ter contribuído para proliferação de microorganismos oportunistas. A literatura também cita que os agentes protozoais *Cryptosporidium* sp. e *Entamoeba invadens* também podem causar gastrites necrotizantes e ulcerativas em répteis (Jacobson, 2007).

Dos quatro animais com miosite três eram ectoparasitados por carrapatos, e considerando que esses podem causar lesões focais nos sítios de fixação, suspeita-se de que os ectoparasitos sejam os causadores dessas lesões. Carrapatos do gênero *Amblyomma* são os mais importantes e frequentes em serpentes e, além de causarem lesões focais, podem ser vetores de hemoparasitoses (Jacobson, 2007). As espécies *A. dissimile* e *A. rotundatum* são as mais frequentes no Brasil e América do Sul (Ogrzewalska *et al*, 2018).

Dos quatro casos de dermatite de etiologia indefinida, um animal tinha ectoparasito e outros três apresentavam necrose multifocal discreta restrita ao extrato córneo. O caso do animal ectoparasitado a dermatite pode ser atribuída justamente a esta

condição. Já nas demais serpentes, suspeita-se de infecção por *O. ophioidiicola*. Embora não tenham sido observadas hifas nas lesões, as alterações observadas se assemelham etapas iniciais da infecção descritas por Lorch *et al* (2015).

6.2.5. Lesões não infecciosas

As lesões císticas hepáticas foram encontradas em animais com ascaridídeos gástricos e que tinham granulomas viscerais associadas à migração dos parasitos. Inclusive, em dois dos três casos, foi observado granulomas próximo às formações císticas. Embora não tenha sido observada colestase, suspeita-se que tenha ocorrido obstrução, mesmo que parcialmente, de algum ducto biliar. Além disso não se observou nenhuma proliferação celular que pudesse sugerir etiologia neoplásica.

Nos dois casos de fibrose pulmonar não foi encontrado nenhum processo inflamatório, ainda que discreto. No entanto, suspeita-se de que a etiologia esteja associada a alguma infecção crônica, restando apenas o tecido cicatricial. Chamou a atenção nesses casos a distribuição linear das lesões e a região do parênquima afetada, que foi exatamente oposta a abertura do brônquio, como se o que causou a lesão tivesse sido inalado (Figura 26D). Não foi observado pleomorfismo celular que pudesse sugerir processo neoplásico, nem parasitos pulmonares que pudessem sugerir uma reação hiperplásica à agressão tecidual persistente.

O processo degenerativo observado no sistema reprodutor, caracterizada por masseração fetal, foi considerada asséptica, justificado pelo fato de não ter sido observado nenhum patógeno intralesional ou inflamação que sustentasse alguma etiologia infecciosa. A retenção em serpentes é uma condição crônica frequentemente estéril, mas a ruptura do saco vitelino pode promover salpingites bacterianas (Ossiboff, 2018).

Em um caso onde houve laceração cutânea profunda, também se observou hifas fúngicas nos bordos da lesão, sendo esta considerada secundária ao traumatismo. Diferente das lesões associadas ao *O. ophioidiicola*, as hifas eram mais espessas e escuras, e a colonização era superficial e restrita as bordas da lesão. Alguns fungos oportunistas frequentemente encontrados em serpentes são *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* (Ossiboff, 2018).

6.3. Dados parasitológicos

A frequência dos resultados parasitológicos em função do sexo, mesoregião e mês, comportou-se semelhante ao dos dados anatomo-patológicos. Isso devido ao fato da maioria das lesões observadas estarem associadas ao parasitismo. O parasitismo foi mais frequente nos machos, na região metropolitana e no mês de dezembro, embora nenhuma das variáveis tenha apresentado diferença significativa.

A literatura sobre prevalência de parasitismo em cascavéis de vida-livre é escassa, esse tipo de informação também é difícil de ser encontrada para qualquer animal silvestre em seu habitat natural. Em análise morfológica de ovos em amostras de fezes de serpentes de vida-livre nos Estados Unidos, a frequência de parasitismo metazoário foi de 80% (Knafo *et al.*, 2016). No México, Carbajal-Marquéz *et al.* (2018) observou prevalência de 14% em 50 cascavéis. No entanto a amostragem incluiu tanto serpentes de vida livre quanto de cativeiro.

No presente estudo os nematodos mais frequentes foram os ascaridídeos gástricos (53/96), *Serpentirhabdias* sp. (17/96) e *Kalicephalus* spp. (7/96), com frequência de 55%, 17% e 7%, respectivamente. Em estudo comparativo dos aspectos patológicos das infecções parasitárias de *C. durissus* de vida-livre e cativeiro, os nematodos mais frequentes foram *Rhabdias velardi* e *Kalichepalus inermis* (Grego *et al.*, 2004). Em avaliação de nematodos de cascavéis encontradas mortas na natureza ou de cativeiro procedentes de diferentes estados brasileiros, 80% dos parasitos foram ascarídeos e 6,6% foram *Kalicephalus* (Pinto *et al.*, 2010).

Todos nematodos pulmonares encontrados foram fêmeas pertencentes ao gênero *Serpentirhabdias*. Esse gênero foi recentemente estabelecido por Tkach *et al.* (2014) após avaliação filogenética, morfológica e biológica. Com a reclassificação, 14 espécies de *Rhabdias* foram incluídas no novo gênero. Como o próprio nome sugere, espécimes de *Serpentirhabdias* são parasitos específicos de serpentes.

Silva *et al.* (2007) relatou que em cascavéis de vida-livre, que tiveram morte natural durante quarentena, a prevalência desses rhabditóides pulmonares foi de 44%. A

prevalência em cascavéis de cativeiro pode ser ainda maior, Silva *et al* (2001) por exemplo relata prevalência de cerca de 70%.

Não foram observadas lesões pulmonares significativas nas serpentes parasitadas pelos *Serpentirhabdias* sp. Esses fatos corroboram com Marcus (1981), ao dizer que as lesões quando presentes são discretas, e clinicamente as alterações são mínimas ou ausentes. Por outro lado, Mihalca *et al* (2010) relata lesões como degeneração do epitélio respiratório e de músculo liso, necrose e obstrução associada a presença intralesional desses nematodos.

Os nematodos intestinais mais frequentes foram representados pelo gênero *Kalicephalus*. Dos sete animais parasitados por esses parasitos, quatro tinham *K. inermis inermis* e três tinham *K. costatus costatus*. Não foi encontrado representantes das duas espécies em uma mesma serpente, nesse sentido reforça-se a suspeita de que haja competição por interferência entre elas, conforme sugerido por Anderson (2000). Em 56 serpentes de cativeiro, *Kalicephalus* sp. foi o nematodo mais prevalente com 25% de representatividade (Souza *et al*, 2014).

Não foram observadas lesões intestinais associadas ao gênero *Kalicephalus* nesse estudo. No entanto, autores relataram que esses parasitos causaram enterites tanto em serpentes de vida-livre quanto de cativeiro (Grego *et al*, 2014). Os parasitos *Kalicephalus* são os estrombilídeos de maior importância clínica em serpentes. A transmissão ocorre por via oral e de forma percutânea. Infecções secundárias por bactérias Gram-negativas podem ser desencadeadas devido lesões ulcerativas (Jacobson, 2007).

6.4. Dados toxicológicos

Foram observadas diferentes concentrações de metais pesados nas serpentes, tendo o magnésio apresentado as maiores concentrações (Tabela 2). Cádmio e chumbo apresentaram diferenças significativas em suas concentrações em função do sexo e peso das serpentes. Os machos apresentaram maiores concentrações de metais quando comparados com as fêmeas, semelhante aos achados descritos por Frossard *et al*. (2017).

Os animais com peso acima de 596g (média de peso), também apresentaram maior bioacumulação (Figura 43). Estudo experimental de Hopkins *et al*. (2001),

demonstrou que as presas possuem papel importante na bioacumulação de metais nas serpentes e que o hábito alimentar está correlacionado diretamente na bioacumulação de metais. Nesse sentido, o peso e a idade também são fatores que podem influenciar na concentração de metais nas cascavéis. O fato de os machos apresentarem maiores concentrações de alguns metais nos tecidos pode estar associado ao peso, pois os machos também tiveram média de peso significativamente maior que as fêmeas (dado não apresentado).

Os resultados obtidos nas serpentes em função das regiões apresentaram diferentes concentrações, com predomínio de um ou mais elementos em uma determinada região. A região Oeste teve maiores níveis de Mg e Zn, enquanto o grupo das Demais Regiões obteve mais concentração de Cd e Pb. A região Metropolitana teve valores intermediários em três desses quatro elementos (Figura 44). Apesar de não se conhecer a interferência da vegetação no perfil de bioacumulação de metais, percebeu-se que a região Metropolitana possui transição de mata atlântica com cerrado, enquanto Oeste de Minas possui predomínio de cerrado e as Demais Regiões predomínio de mata atlântica. Conseqüentemente, serpentes do cerrado (Oeste) apresentaram maiores níveis de Mg e Zn, enquanto serpentes de mata atlântica (Demais Regiões) demonstraram maiores níveis de Cd e Pb. Outro fator importante que necessita de maiores investigações, seria o uso do solo nessas regiões, principalmente pelo fato de que esses elementos são descartados no meio ambiente por interferência humana.

6.5. Dados hematológicos e bioquímicos

Os resultados hematológicos apontaram três animais com concentração de hemácias abaixo do valor de referência. Esses mesmos animais apresentaram volume corpuscular médio aumentado, nesse caso, sustentando o diagnóstico de anemia regenerativa. Uma das serpentes tinha ascarídeo gástrico, uma tinha *Cryptosporidium* sp. e *Hepatozoon* sp. e outra não apresentou nenhuma alteração. Definir a causa de anemia em répteis é difícil, uma vez que a reposição eritróide é lenta quando comparada aos mamíferos (Jacobson, 2007). Nesse sentido, a anemia pode persistir e ser diagnosticada sem associação etiológica.

O volume globular esteve acima da referência em 52 animais. Esse achado associado aos valores também acima de proteína e albumina nas serpentes, 52 e 49 respectivamente, sugere um diagnóstico de desidratação. Esse quadro pode ser atribuído ao transporte diurno desses animais durante o período de estudo, que envolveu meses relativamente quentes. Leucocitose foi encontrada em 57 animais, principalmente associada a heterofilia e monocitose. Esse resultado é compatível com a prevalência de lesões parasitárias granulomatosas.

Além de proteína e albumina sérica, a glicose também apresentou-se frequentemente aumentada. Atribui-se a esse resultado, tanto a desidratação, mas principalmente o estresse associado ao processo de captura. Os marcadores renais e hepáticos não se apresentaram aumentados. Sendo assim, não houve diagnóstico de intoxicação por metais devido a ausência de alterações bioquímicas e a falta de alterações morfológicas nos tecidos hepático e renal.

Considerando os dados hematológicos dos animais hemoparasitados, apenas uma serpente apresentou anemia regenerativa. Além de *Hepatozoon* sp. também apresentava colite necrotizante associada a *Cryptosporidium* sp.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado demonstrou que as serpentes *Crotalus durissus* de vida-livre no Estado de Minas Gerais estão sujeitas a doenças de etiologias distintas, e que esses animais podem servir como marcadores biológicos para os diferentes metais pesados.

No geral, a frequência de parasitos encontrados e as lesões associadas aos metazoários ocorreu de forma semelhante ao descrito na literatura. O exame microscópico mostrou-se fundamental para a realização dos diagnósticos das lesões infecciosas não metazoárias. O *pool* de amostras de tecidos hepático, renal e adiposo, apontou ser eficiente para avaliação de metais pesados em cascavéis. Os resultados hematológicos e bioquímicos, associados principalmente ao exame anátomo-patológico, confirmaram a importância do uso de exames complementares e abordagem multidisciplinar no diagnóstico das doenças. Principalmente quando se trata de animais sem histórico clínico. Importante ressaltar que todos os animais em estudo foram

eutanasiados e apesar de alguns animais apresentarem níveis elevados de determinados metais, nenhum foi diagnosticado com intoxicação.

Quanto a observação dos achados em função da mesoregião, apenas os resultados toxicológicos apresentaram-se estatisticamente significativos. Ainda assim, os resultados dos diferentes exames realizados podem ser utilizados como referência para estudos comparativos futuros.

Este tipo de pesquisa é uma ferramenta importante para o conhecimento e acompanhamento da condição sanitária das serpentes pois permite conhecer a fauna parasitária, as doenças comuns e suas prevalências, a concentração natural de metais, e por consequência, possíveis alterações ambientais que podem afetar a saúde populacional desses animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, 552p.

ALLEMAN, A. R.; JACOBSON, E. R.; RASKIN, R. E. Morphologic, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *American Journal of Veterinary Research*, v.60, n.4, p.507-514, 1999.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v.86, n.2, p.412-431, 2003.

ANDERSON, R. C. *Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission*. New York: CABI Publishing, 2000, 650p.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.31, n.4, p.759-843, 1936.

BARROW JR, J. H.; STOCKTON, J. J. The influences of temperature on the host-parasite relationships of several species of snakes infected with *Entamoeba invadens*. *Journal of Protozoology*, v.7, n.4, p.377-383, 1960.

BASTOS, E. G. M.; ARAÚJO, A. F. B.; SILVA, H. R. Records of the rattlesnakes *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti) (Serpentes, Viperidae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil: a possible case of invasion facilitated by deforestation. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.22, n.3, p.812-815, 2005.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M. M. S.; et al. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *Journal of Proteomics*, v.73, p.1758-1776, 2010.

BONAN, P. R. F.; LIMA, J. S.; MARTELLI, D. R. B.; et al. Perfil epidemiológico dos acidentes causados por serpentes venenosas no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. *Revista Médica de Minas Gerais*, v.20, n.4, p.1-8, 2010.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001, 120p.

BUCARETCHI, F.; HERRERA, S. R. F.; HYSLOP, S.; et al. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp. in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.44, n.3, p.133-138, 2002.

BURGER, J.; MURRAY, S.; GAINES, K. F.; et al. Element levels in snakes in South Carolina: Differences between a control site and exposed site on the Savannah River site. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.112, p.35-52, 2006.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America. ITHACA, Cornell University Press, 1989, 425p.

CAMPBELL, K. R.; CAMPBELL, T. S.; BURGER, J. Heavy metal concentrations in Northern water snakes (*Nerodia sipedon*) from East Fork Poplar Creek and the Little River, East Tennessee, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.49, p.239-248, 2005.

CARBAJAL-MÁRQUEZ, R. A.; GONZÁLEZ-SOLÍS, D.; CEDEÑO-VÁZQUEZ, J. R. Endoparasites of *Crotalus tzabcan* (Serpentes: Viperidae), with a checklist in rattlesnakes. *Journal of Parasitic Diseases*, v.42, p.303-314, 2018.

CARVALHO, M. A.; NOGUEIRA, F. Serpentes da área urbana de Cuiabá, Mato Grosso: aspectos ecológicos e acidentes ofídicos associados. *Caderno de Saúde Pública*, v.14, n.4, p.753-763, 1998.

CARVALHO, M. P. N.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. G. T.; MASSOCO, C. O.; et al. Flow cytometric characterization of peripheral blood leukocyte populations of 3 Neotropical snake species: *Boa constrictor*, *Bothrops jararaca*, and *Crotalus durissus*. *Veterinary Clinical Pathology*, v.45, n.2, p.271-280, 2016.

CARVALHO, M. P. N.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. G. T.; MASSOCO, C. O.; et al. Functional characterization of Neotropical snakes peripheral blood leukocytes subsets: Linking flow cytometry cell features, microscopy images and serum corticosterone levels. *Developmental and Comparative Immunology*, v.74, p.144-153, 2017.

CARVALHO, M. P. N.; SANT'ANNA, S. S.; DÍAZ-DELGADO, J.; et al. Histopathological findings in the viscera of malformed Neotropical viperids. *Journal of Comparative Pathology*, v.167, p.73-81, 2019.

DANTAS-TORRES, F.; OLIVEIRA-FILHO, E. F.; SOUZA, B. O. F.; SÁ, F. B. First record of *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) parasitizing *Crotalus durissus cascavella* (Wagler, 1824) (Squamata: Viperidae) in the State of Pernambuco, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.3, p.389-390, 2005.

DASZAK P.; CUNNINGHAM, A. A Report of intestinal sarcocystosis in the bullsnake (*Pituophis melanoleucus sayi*) and a re-evaluation of *Sarcocystis* sp. from snakes of the genus *Pituophis*. *Journal of Wildlife Diseases*, v.31, n.3, p.400-403, 1995.

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

FRANCO R. L.; ROCHA, C. C.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Snakebites in Southern Minas Gerais state, Brazil. *Journal of the Venomous Animals and Toxins*, v.7, n.1, p.1-6, 2001.

FROSSARD, A.; CARNEIRO, M. T. W. D., SILVA, E. L. F.; et al. Concentração de elementos traços em serpentes do litoral e da região serrana do Espírito Santo. *Pesquiusa Veterinária Brasileira*, v.37, n.10, p.1146-1152, 2017.

GAMBÓN-DEZA, F.; SÁNCHEZ-ESPINEL, C.; MIRETE-BACHILLER, S.; MAGADÁN-MOMPÓ, S. Snakes antibodies. *Developmental and Comparative Immunology*, v.38, p.1-9, 2012.

GARDINER, C. H., PAYER, R.; DUBEY, J. P. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. *U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook*, n.651, 1988, 83p.

GARDINER, C. H.; POYNTON, S. L. An Atlas of Metazoan Parasites in Animal Tissues. *American Registry of Pathology*, Washington, DC, 1999, 64p.

GIBBONS, L. M. Keys to the nematode parasites of vertebrates. Wallingford, CAB International. Supplementary volume, 2010, 416p.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R. *Cryptosporidium serpentis* oocysts and microsporidian spores in feces of captive snakes. *Journal of Parasitology*, v.86, n.2, p.413-414, 2000.

GRAY, C. W.; DAVIS, J.; McCARTNEY, W. G. Treatment of *Pseudomonas* infections in the snake and lizard collection at Washington Zoo. *International Zoo Yearbook*, v.6 n.1, p.278, 1966.

GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. R.; KOLESNIKOVAS, C. K. M. Squamata (Serpentes). In: CUBAS Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds), *Tratados de animais selvagens*. 2.ed. Roca, São Paulo, 2014, p.186-218.

GREGO, K. F.; GARDINER, C. H. ; CATAO-DIAS, J. L. . Comparative pathology of parasitic infections in free-ranging and captive pit vipers (*Bothrops jararac*). *Veterinary Record*, Londres, v. 154, n.18, p. 559-562, 2004.

- HILEMAN, E. T.; ALLENDER, M. C.; BRADKE, D. R.; et al. Estimation of *Ophidiomyces* prevalence to evaluate snake fungal disease risk. *The Journal of Wildlife Management*, v.82, n.1, p.173-181, 2018.
- HOPKINS, W. A.; ROE, J. H; SNODGRASS, J. W.; et al. Nondestructive indices of trace element exposure in squamate reptiles. *Environmental Pollution*, v.115, n.1, p.1-7, 2001.
- HOSER, R. A reclassification of the rattlesnakes; species formerly exclusively referred to the genera *Crotalus* and *Sistrurus*. *Australasian Journal of Herpetology*, v.6, p.1-21, 2009.
- HYNDMAN, T. H.; SHILTON, C. M.; MARSCHANG, R. E. Paramyxoviruses in reptiles: a review. *Veterinary Microbiology*, v.165, n.3-4, p.200-213, 2013.
- JACOBSON, E. R. Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text. Boca Raton: CRC Press, 2007, 736p.
- JAIN, N. C. Schalm's Veterinary Hematology. 4.ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1986, 1921p.
- KNAFO, S. E.; NORTON, T. M.; MITCHELL, M.; et al. Health and nutritional assessment of free-ranging eastern indigo snakes (*Drymarchon couperi*) in Georgia, United States. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.47, n.4, p.1000-1012, 2016.
- KOLESNIKOVAS, C. K. M.; GREGO, K. F.; ALBUQUERQUE, L. R.; et al. Ophidian paramyxovirus in Brazilian vipers (*Bothrops alternatus*). *Veterinary Record*, v. 159, p. 390-392, 2006.
- KUZMIN Y.; TKACH, V. V.; MELO, F. T. V. Description, molecular characterization and life cycle of *Serpentirhabdias mussuranae* n. sp. (Nematoda: Rhabdiasidae) from *Clelia clelia* (Reptilia: Colubroidea) in Brazil. *Journal of Helminthology*, p.1-12, 2019.
- LEMAIRE, J.; BUSTAMANTE, P.; OLIVIER, A.; et al. Determinants of mercury contamination in viperine snakes, *Natrix maura*, in Western Europe. *Science of the Total Environment*, v.635, p.20-25, 2018.

LORCH J. M.; LANKTON, J.; WERNER, K.; et al. Experimental infection of snakes with *Ophidiomyces ophiodiicola* causes pathological changes that typify snake fungal disease. *MBio*, v.6, n.6, p.1-9, 2015.

LORCH J. M.; LANKTON, J.; WERNER, K.; et al. Snake fungal disease: an emerging threat to wild snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society. B* 371: 20150457, 2016.

MARCUS, L.C. Veterinary biology and medicine of captive amphibians and reptiles. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981. p.114-174.

MARIN A. R.; PEZESHKI, S. R.; MASSCHELEN, P. H.; CHOI, H. S. Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic and photosynthesis in rice plants. *Journal of Plant Nutrition*, v.16, p.1532-4807, 1993.

MAXIE, M. G.; MILLER, M. A. Introduction to the diagnostic process. In: MAXIE, M. G. (Ed). Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 6.ed. vol.1. EUA: St Louis, 2016. p.1-15.

MECCHI, L. C.; HERRERA, H. M. Ocorrência de parasitas em serpentes peçonhentas. 2015. 74f. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais e sustentabilidade agropecuária) – Universidade Católica Dom, Campo Grande.

MIHALCA, A. D.; MICLAUS, V.; LEFKADITIS, M. Pulmonary lesions caused by the nematode *Rhabdias fuscovenosa* in a grass snake, *Natrix natrix*. *Journal of Wildlife Diseases*, v.46, n.2, p.678-681, 2010.

MONTEIRO, H. S. A.; SILVA, I. M. S. C.; MARTINS, A. M. C.; FONTELES, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.34, p.1347-1352, 2001.

NOGUEIRA, M. F.; BARRELLA, T. H.; SILVA, R. J.; et al. Isolation of an Ophidian Paramyxovirus (OPMV) in a captive rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.8, n.1, p.168-173, 2002.

OGRZEWALSKA, M.; MACHADO, C.; ROZENTAL, T.; et al. Microorganisms in the ticks *Amblyomma dissimile* Koch 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch 1844

collected from snakes in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, v.33, n.1, p.154-161, 2018.

ONOFRIO, V. C. *Revisão do gênero Amblyomma Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) no Brasil*. 2007. 221f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

ORIGGI, F. C. Reptile immunology. In: JACOBSON, E. R. (Ed). *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. Boca Raton: CRC Press, 2007, p.131-166.

OSSIBOFF, R. J. Serpentes. In: TERIO, K. A.; McALOOSE, D.; LEGER, J. S. (Eds). *Pathology of wildlife and zoo animals*. Londres: Academic Press, 2018, p.897-919.

PANIZZUTTI, M. H. M; SANTOS, L. C.; VICENTE, J. J.; et al. *Ophidascaris durissus* sp. nov. (Nematoda Ascarididae) parasitizing *Crotalus durissus* Linnaeus (Ophidia, Viperidae) in Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.20, n.1, p.9-11, 2003.

PETERS, J. A; DONOSO-BARROS, R.; OREJAS-MIRANDA, B. *Catalogue of the neotropical squamata. Parte I/v.1. Snakes*. Washington, Smithsonian Institution Press, 1970, 347p.

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

PINTO, R. M.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PANIZZUTTI, M. M. H.; NORONHA, D. Nematode parasites of the neotropical rattlesnake, *Crotalus durissus* Linnaeus, 1758 (Ophidia, viperidae) from Brazil: new records and general aspects. *Neotropical Helminthology*, v.4, n.2, p.137-147, 2010.

QUIRINO, T. F.; FERREIRA, A. J. M. G.; SILVA, M. C.; et al. New records of helminths in reptiles from five states of Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v.78, n.4, p.750-754, 2018.

RICHTER, B.; KUBBER-HEISS, A.; WEISSENBOCK, H.; SCHMIDT, P. Detection of *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. and *Monocercomonas* spp. in the gastrointestinal tract of snakes by in-situ hybridization. *Journal of Comparative Pathology*, v.138, p.63-71, 2008.

- SANTORO, M. L.; SILVA, M. C. C. S.; GONÇALVES, L. R. C.; et al. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.122, n.1, p.61-73., 1999.
- SANTOS, H. L. R.; SOUSA, J. D. B.; ALCÂNTARA, J. A.; et al. Rattlesnakes bites in the Brazilian Amazon: Clinical epidemiology, spatial distribution and ecological determinants. *Acta Tropica*, v.191, p.69-76, 2019.
- SANTOS, K. R.; TAKAHIRA, R. K.; RALL, V. L. M.; et al. Pulmonary, microbiological and hematological changes in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) parasitized by nematodes of the genus *Rhabdias* (Nematoda, Rhabdiasidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.3; p.667-674, 2008.
- SCHAD, G. A. Studies on the genus *Kalicephalus* (nematoda: diaphanocephalidae): ii. A taxonomic revision of the genus *Kalicephalus* Molin, 1861. *Canadian Journal of Zoology*, v.40, n.6, p.1035-1165, 1962.
- SILVA, R.J.; BARRELLA, T.H.; NOGUEIRA, M.F. et al. Frequency of helminths in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) in captivity. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.10, p.91-93, 2001.
- SILVA, R. J.; NOGUEIRA, M. F.; BARRELLA, T. H.; TAKAHIRA, R. K. Frequency of rhabdiasid nematodes in wild *Crotalus durissus terrificus* (serpentes, viperidae) from Botucatu region, São Paulo State, Brazil. *Journal of Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases*, v.13, n.1, p.126, 2007.
- SOUZA J. L.; BARBOSA, A. S.; VAZON, A. P.; et al. Parasitological and immunological diagnoses from feces of captive-bred snakes at Vital Brazil Institute. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.23, n.2, p.123-128, 2014.
- SPRENT, J. F. A. Studies on ascaridoid nematodes in pythons: the life history and development of *Polydelphis anoura* in Australian pythons. *Parasitology*, v.60, p.375-397, 1970.
- SPRENT J. F. A. Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Polydelphis*, *Travassosascaris* n.g. and *Hexametra*. *Journal of Helminthology*, v.52, p.355-384, 1978.
- SPRENT J. F. A. Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Ophidasca* Baylis, 1920. *Systematic Parasitology*, v.11, p.165-213, 1988.

STRIK, N. I.; ALLEMAN, A. R.; HARR, K. E. Circulating inflammatory cells. In: JACOBSON, E. R (Ed). *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. Boca Raton: CRC Press, 2007, p.167-218.

TKACH, V. V.; KUZMIN, Y.; SNYDER, S. D. Molecular insight into systematics, host associations, life cycles and geographic distribution of the nematode family Rhabdiasidae. *International Journal for Parasitology*, v.44, p. 273-284, 2014.

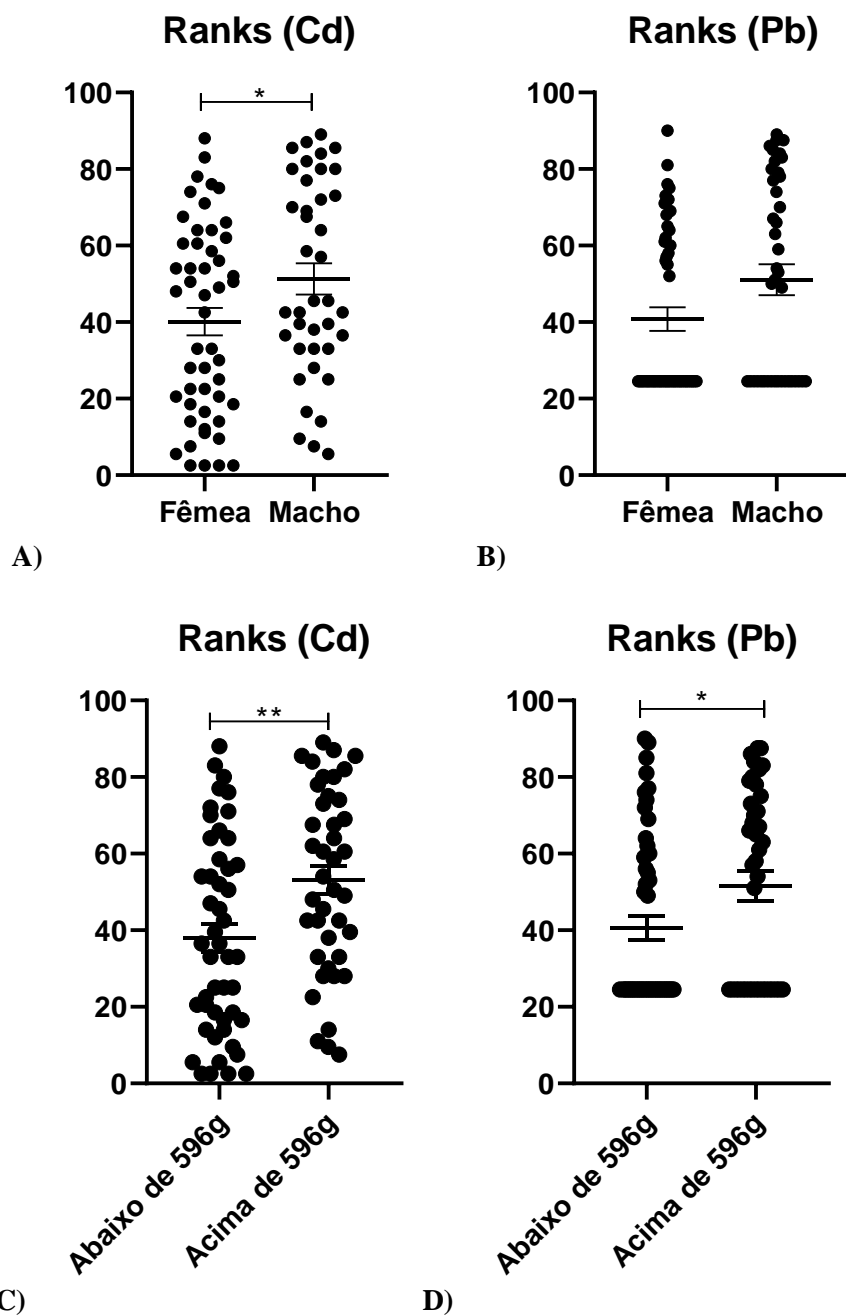
TURCHETTI, A. P.; TINOCO, H. P.; MALTA, M. C. C.; et al. Inclusion Body Disease in a *Corallus hortulanus*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.6, p.15-18, 2013.

ÚNGARI, L. P.; SANTOS, A. L. Q.; O'DWYER, L. H.; et al. Molecular characterization and identification of *Hepatozoon* species Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. *Parasitology Research*, v.117, n.12, p.3857-3865, 2018.

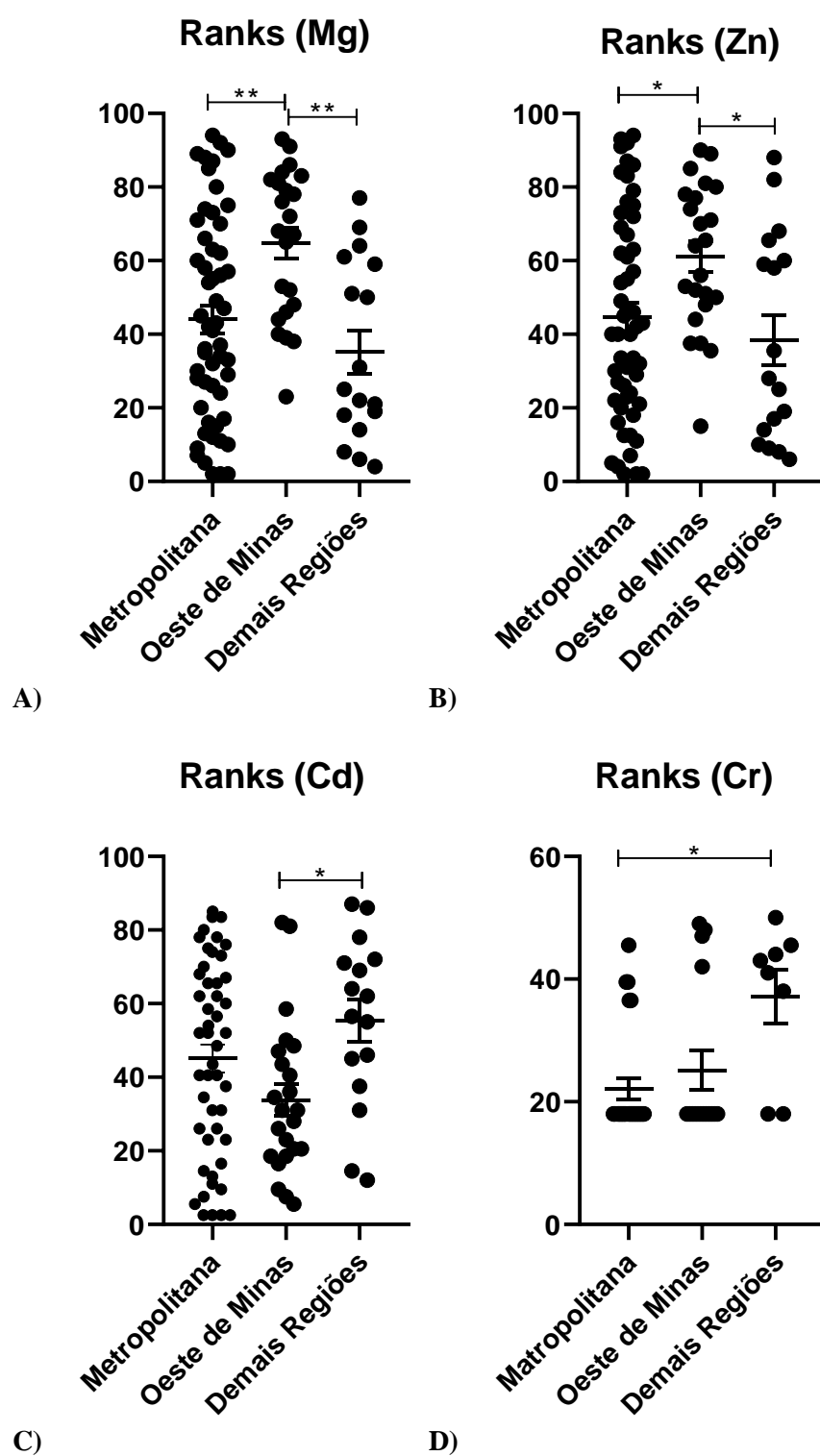
VAN DER OOST R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.13, n.2, p.57-149, 2003.

WUSTER, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A; et al. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology*, v.14, p.1095-1108, 2005.

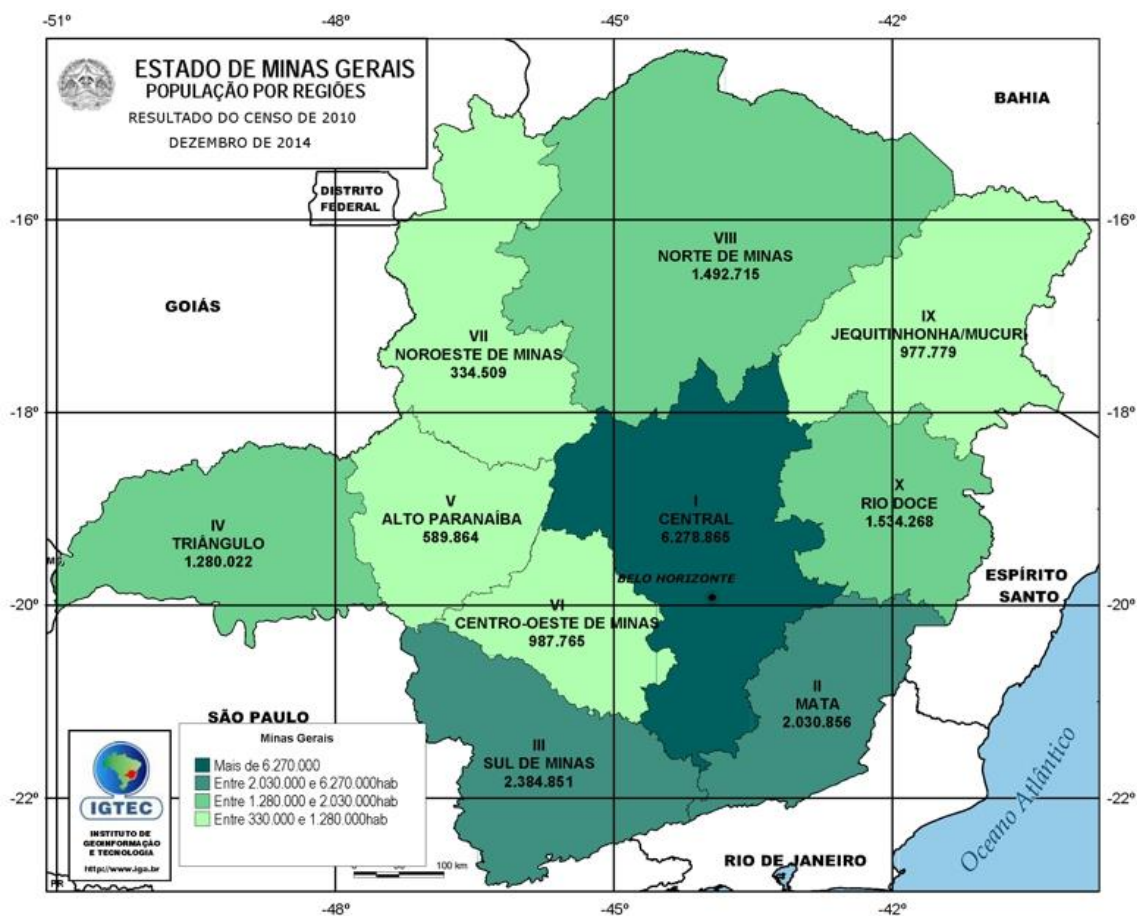
9. APÊNDICES E ANEXOS



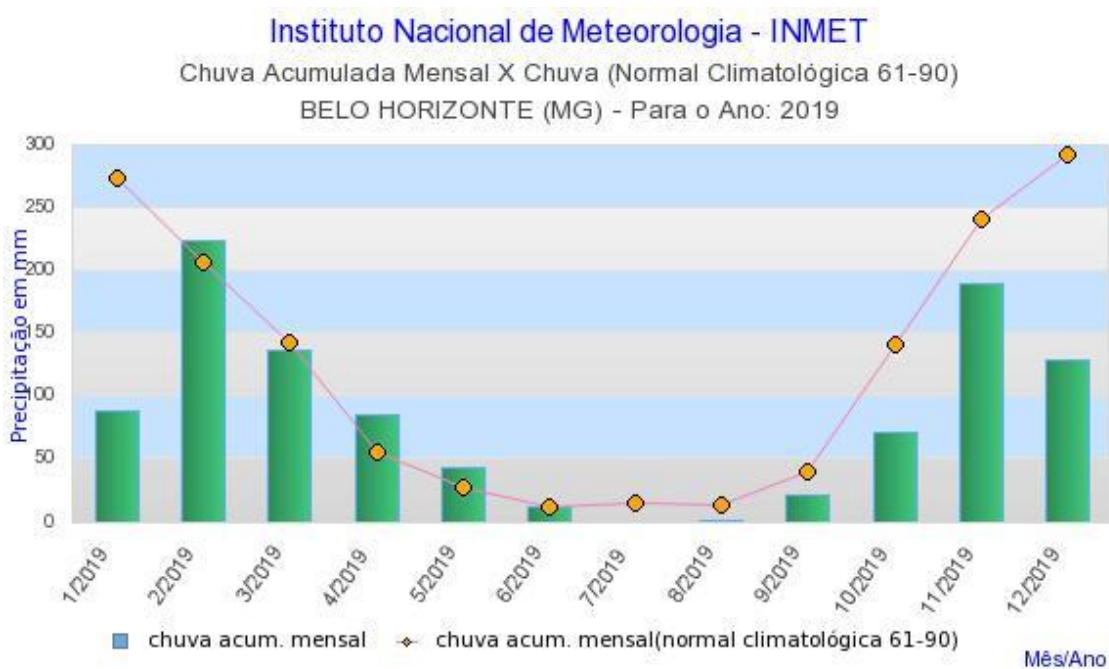
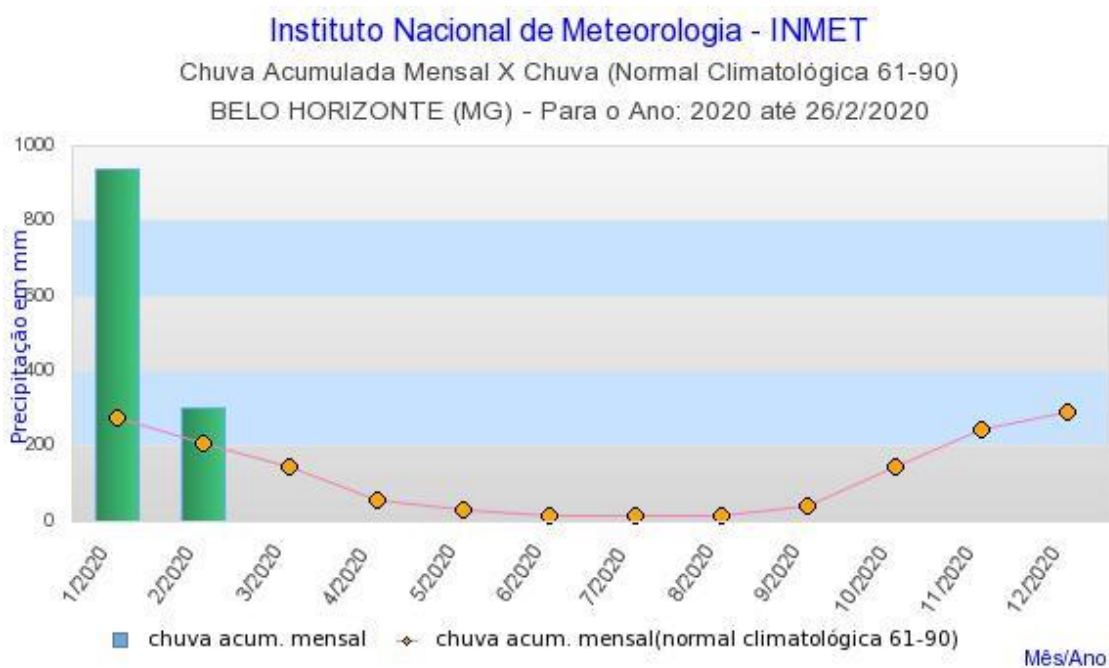
Apêndice 1. Representação dos *ranks* gerados pelos testes de Mann-Whitney. Barras representam média e erro padrão.



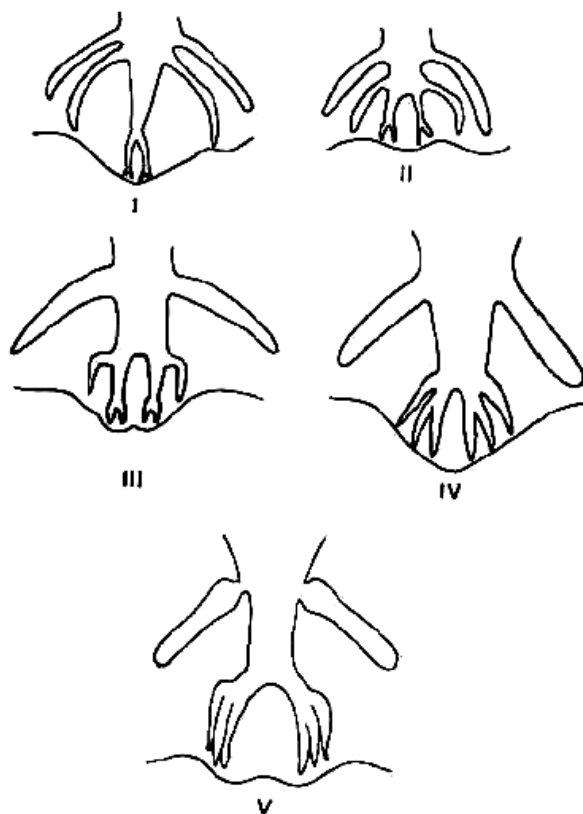
Apêndice 2. Representação dos *ranks* gerados pelos testes de Kruskal-Wallis. Barras representam média e erro padrão.



Anexo 1. Censo populacional de Minas Gerais por mesoregiões. A região I Central que abrange a região metropolitana de Belo Horizonte, representada pelo maior número de serpentes recebidas, também é a mais populosa demograficamente, com mais de 6 milhões de habitantes. Fonte: Estado de Minas Gerais e IGTEC, 2014.



Anexo 2. Volume de chuva acumulada de 2020 e 2019 no estado de Minas Gerais. Os primeiros meses de 2020, tiveram um volume de chuva de aproximadamente 10 vezes maior do que o esperado para o período. Fonte: INMET, 2020.



Anexo 3. Padrões dos raios dorsais nos ramos terminais dos machos do gênero *Kalicephalus*. Machos de *K. inermis inermis* possuem ramos terminais do raio dorsal do grupo V, e machos de *K. costatus costatus* possuem ramos terminais do raio dorsal do grupo III. Fonte: SCHAD. 1962.