



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

HELOÍSA CASTRO PEREIRA

Avaliação hematológica e histopatológica de neoplasia de oviduto em jararaca-do-norte *Bothrops atrox* de cativeiro

Uberlândia - MG
2022

HELOÍSA CASTRO PEREIRA

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE NEOPLASIA
DE OVIDUTO EM JARARACA-DO-NORTE *Bothrops atrox* DE CATIVEIRO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

Uberlândia - MG
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO PPGCVET Nº 05/2022				
Data:	26 DE OUTUBRO DE 2022	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:15
Matrícula do Discente:	11913VET007				
Nome do Discente:	HELOÍSA CASTRO PEREIRA				
Título do Trabalho:	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE NEOPLASIA DE OVITUDO EM JARARACA-DO-NORTE <i>Bothrops atrox</i> DE CATIVEIRO				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	HEMATOLOGIA CLÍNICA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA EM MEDICINA VETERINÁRIA				

Reuniu-se por videoconferência (meio eletrônico), na Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Anna Monteiro Correia Lima - UFU**; **Líria Queiroz Luz Hirano - UnB**; **José Roberto Ferreira Alves Júnior - IF Goiano**; **Sérgio Netto Vitaliano - VALO BioMedia do Brasil Produção de Ovos LTDA**; **André Luiz Quagliatto Santos - UFU**, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. **André Luiz Quagliatto Santos**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do

Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **André Luiz Quagliatto Santos, Usuário Externo**, em 26/10/2022, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anna Monteiro Correia Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/10/2022, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Netto Vitaliano, Usuário Externo**, em 26/10/2022, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **LÍRIA QUEIROZ LUZ HIRANO, Usuário Externo**, em 26/10/2022, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Ferreira Alves Junior, Usuário Externo**, em 01/11/2022, às 09:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3972413** e o código CRC **CE996C25**.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P436a Pereira, Heloísa Castro, 1987-
2022 Avaliação hematológica e histopatológica de neoplasia de oviduto
em Jararaca-do-Norte *Bothrops atrox* de cativeiro [recurso eletrônico] /
Heloísa Castro Pereira. - 2022.

Orientador: André Luiz Quagliatto Santos.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.5350>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Santos, André Luiz Quagliatto, 1961-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Glória Aparecida
Bibliotecária - CRB-6/2047

AGRADECIMENTOS

Transformação, Sabedoria e Renovação. Estes são alguns dos significados do **Arquétipo da Serpente**.

Como nada é coincidência, foi isto que vivi durante estes longos anos de doutorado. Buscando a sabedoria através da transformação na maneira de pesquisar, escrever, estudar e sobretudo, aprendizados vindos através do próprio contato com estes animais incríveis.

Agradeço infinitamente o apoio do meu Mestre dentro da medicina veterinária de animais silvestres, Professor André Luiz Quagliatto Santos. Esta conclusão de doutorado vai além de um grande título, mas sim de uma formação completa, já que esta parceria acontece desde a graduação, completando mais de quinze anos de aprendizados.

Imenso carinho e gratidão à amiga e professora Liria Queiroz Luz Hirano, a quem admiro imensamente pela conduta ética e amorosa com as pessoas e os animais.

Agradeço às colegas e parceiras que auxiliaram para que este trabalho fosse executado e redigido: Maísa e Letícia, fica meu carinho pelo auxílio de vocês.

Ao apoio da Pentapharm, local que me permite pesquisar e trabalhar com as serpentes, trazendo ânimo e propósito aos meus dias, sobretudo ao diretor Marcos Dini, pelo apoio e confiança, ao Welerson, biólogo e grande amigo e aos técnicos que cuidam dos animais com tanta dedicação: a todos minha gratidão e admiração pelo incrível trabalho.

À minha família e amigos, que sempre trazem apoio e conforto em todos os momentos. Em especial minha mãe Maria, ao meu pai Nelson - que me guia de outra dimensão, e ao meu amor, Marcos.

Que esta conclusão represente uma passagem para uma nova e gratificante etapa profissional.

Heloísa Castro Pereira.

RESUMO

A espécie *Bothrops atrox* é de grande interesse na criação comercial em cativeiro, com o objetivo de realizar pesquisas e desenvolvimento de fármacos devido às propriedades de sua peçonha. A utilização farmacêutica traz consigo a grande responsabilidade de manter padrões de saúde, segurança e qualidade desde a criação dos animais, até a purificação final deste produto. A medicina veterinária com atuação em répteis vem se desenvolvendo, e com isto surge a necessidade de maiores estudos que estabeleçam padrões nos parâmetros sanguíneos para animais saudáveis, e desta forma facilitando a identificação de alterações de saúde, mesmo antes do aparecimento de sinais clínicos. Dentre as formas de avaliação complementar na medicina veterinária, o hemograma fornece informações importantes do estado de saúde geral do paciente, é rápido de ser realizado e possui baixo custo. Além disto, nota-se em fêmeas de cativeiro, a ocorrência de neoplasia na região dos ovidutos, o que compromete a qualidade e tempo de vida. Assim, o objetivo deste trabalho foi definir parâmetros de referência para hemograma de serpentes da espécie *Bothrops atrox* saudáveis, bem como estudar as possíveis alterações destes parâmetros em fêmeas com neoplasia na região dos ovidutos. Foram colhidas amostras de sangue de 20 exemplares de *B. atrox* saudáveis e de dez exemplares identificados com neoplasia nos ovidutos, todas abrigadas no criatório comercial Pentapharm do Brasil. Os valores médios e desvio padrão encontrados para serpentes saudáveis foram: hematócrito $33,6 \pm 5,47\%$, hemoglobina $10,81 \pm 2,07\text{g/dL}$, número total de eritrócitos $0,59 \pm 0,1 \times 10^6/\text{mm}^3$, leucócitos $11387,5 \pm 3279,2/\text{mm}^3$ e trombócitos $28175 \pm 6320/\text{mm}^3$. Não foi observado diferença significativa entre machos e fêmeas e os heterófilos foram o tipo celular leucocitário predominante. Em *Bothrops atrox* com neoplasia benigna, observou-se linfopenia e trombocitopenia, e não foram visualizados eosinófilos. Também foram notadas as mesmas alterações nas duas serpentes que receberam o diagnóstico histopatológico de fibrossarcoma, além de apresentarem anemia.

Palavras-chave: hematologia, tumor, squamata, peçonhenta

ABSTRACT

The *Bothrops atrox* species is of great interest in commercial breeding in captivity, with the objective of research and development of realizations of the properties of this venom. Pharmaceutical use brings with it the great responsibility of maintaining health, safety and quality standards from the breeding of animals to the final purification of this product. Veterinary medicine comes with studies of reptiles with common practice, and with this comes patterns in blood parameters for animals, and thus having a basis for identifying major health change, even before the appearance of symptoms. Among the forms of complementary evaluation in veterinary medicine, the hemogram provides important information on the general health status of the patient, is quick to perform and has a low cost. In addition, it is noted in captive females, the occurrence of neoplasms in the oviduct region, which compromises the quality of life. Thus, the objective of this research was to define well the reference for blood count of healthy snakes of the species *Bothrops atrox*, males and females, as well as to study how possible changes in these parameters in females with neoplasia in the region of the oviducts. Blood samples were collected from 20 healthy specimens of *B. atrox*, males and females, and from ten specimens identified with neoplasia in the oviducts, all housed in the commercial breeding facility Pentapharm do Brasil. The mean values and standard deviations found for healthy *B. atrox* were: hematocrit $33.6 \pm 5.47\%$, hemoglobin $10.81 \pm 2.07\text{g/dL}$, total number of erythrocytes $0.59 \pm 0.1 \times 10^6/\text{mm}^3$, leukocytes $11387.5 \pm 3279.2/\text{mm}^3$ and thrombocytes $28175 \pm 6320/\text{mm}^3$. No significant difference was observed between males and females and heterophils were the predominant leukocyte cell type. In *Bothrops atrox* with benign neoplasm, lymphopenia and thrombocytopenia were observed, and eosinophils were not visualized. The same changes were also observed in the two snakes that received the histopathological diagnosis of fibrosarcoma, in addition to presenting anemia.

Keywords: hematology, tumor, squamata, venomous

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Exemplar jovem de <i>Bothrops atrox</i> de cativeiro (Fonte: Autora).....	15
Figura 2. Colheita de sangue em veia caudal ventral de <i>Bothrops atrox</i> (Fonte: Autora).....	17
Figura 3. Hemácias (seta fechada) e trombócitos (seta aberta) de <i>Bothrops atrox</i> . Aumento de 1000 x. (Fonte: Maisa Paschoal Rios).....	19
Figura 4. Leucócitos (setas) de <i>Bothrops atrox</i> . A: Linfócito; B: Monócito; C: Azurófilo; D: Heterófilo; E: Eosinófilo; F: Basófilo. Aumento de 1000 x (Fonte: Maisa Paschoal Rios).....	20

CAPÍTULO 2

Figura 1. Contenção física (A) e colheita de amostra sanguínea na veia da cauda (B) de <i>Bothrops atrox</i> de cativeiro (Fonte: Autora).....	33
Tabela 1. Valores de média, desvio (DP), erro padrão (EP), mediana (Med), mínimo e máximo (Mín-Máx) para hemograma de <i>B. atrox</i> (n=20) de cativeiro.....	35

CAPÍTULO 3

Figura 1. Imagem histológica de fibroma (A) e fibrossarcoma (B) em oviduto de <i>Bothrops atrox</i> de cativeiro (Fonte: Autora).....	46
Figura 2. Imagem de massa neoplásica: fibroma (Fonte: Autora).....	46
Figura 3. Imagem de massa neoplásica: fibrossarcoma (Fonte: Autora).....	47
Tabela 1. Valores de média, desvio (DP), erro padrão (EP), mediana (Med), mínimo e máximo (Mín-Máx) para hemograma de <i>B. atrox</i> (n=20) saudáveis de cativeiro e <i>B. atrox</i> com neoplasia benigna (n=8).....	48

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Jararaca do norte (<i>Bothrops atrox</i>).....	15
2.2 Colheita e armazenamento de sangue em serpentes.....	16
2.3 Hematologia de <i>Bothrops</i> sp.....	17
2.4 Neoplasia em ovário e oviduto de serpentes.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

CAPÍTULO 2

1. ARTIGO.....	30
2. INTRODUÇÃO.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4. RESULTADOS.....	34
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÕES.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

CAPÍTULO 3

1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3. RESULTADOS.....	45
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

ANEXOS

Tabela 1. Valores médios de referência de hemograma publicados para o gênero <i>Bothrops</i>	60
AUTORIZAÇÃO SISBIO	61
AUTORIZAÇÃO CEUA UFU	62
AUTORIZAÇÃO SISGEN	63
Normas de submissão – Bioscience Journal https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions	64

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Conforme a Norma Regulamentar 002/2015 do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, este capítulo foi formatado de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6021-2015 e NBR-6023-2018.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Bothrops* compreende serpentes com dentição solenóglifa que pertencem à classe Reptilia, ordem Squamata, subordem Ophidia, família Viperidae e subfamília Crotalinae (BORGES, 1999). O Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção descreve 28 espécies nativas de *Bothrops*, sendo cinco ameaçadas de extinção, que são conhecidas popularmente como jararaca, jararacuçu e caiçaca (ICMBio, 2018; DONATO et al., 2020).

Mais de 25 mil acidentes ofídicos são registrados anualmente no Brasil e a grande maioria envolve serpentes do gênero *Bothrops* (MATOS; IGNOTTI, 2020). Tais dados refletem o fato dessas espécies apresentarem ocorrência natural em praticamente todos os biomas nacionais, habitando desde florestas tropicais até pradarias, além de apresentarem comportamento agressivo (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Nesse contexto, a pesquisa com esses répteis também é de alta relevância para a saúde pública.

No Brasil, a manutenção de serpentes peçonhentas em cativeiro ocorre principalmente no âmbito de criadouros científicos e comerciais, que realizam a produção de soro antiofídico e de subprodutos da peçonha (PEREIRA et al., 2017; MONACO, 2018).

Tais instituições devem seguir normas de boas práticas de manejo, essenciais para garantir um plantel com saúde e bem-estar, aumentando a vida útil dos animais e priorizando a qualidade do produto farmacêutico (PEREIRA et al., 2017; GREGO et al., 2021).

Para garantir a saúde do plantel cativo, as instituições devem realizar monitoramento médico veterinário periódico para diagnóstico e prevenção de enfermidades. Por isso, exames laboratoriais, como o hemograma, são ferramentas interessantes por fornecerem dados qualitativos e quantitativos que auxiliam na avaliação dos animais. Além disso, a descrição de enfermidades encontradas com maior frequência nos diferentes planteis subsidiam informações relevantes na medicina da herpetofauna.

O objetivo deste primeiro capítulo é realizar uma revisão bibliográfica para contextualizar os principais temas a serem abordados nos artigos da tese, com foco na espécie *Bothrops atrox*, bem como acerca da hematologia e da ocorrência de neoplasias em oviduto de serpentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Jararaca-do-norte (*Bothrops atrox*)

A espécie *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758), conhecida popularmente como jararaca-do-norte ou jararaca-da-amazônia, é considerada primariamente endêmica da floresta Amazônica e seu estado de conservação na Lista Vermelha nacional está como menos preocupante (ICMBio, 2018). Também há registros de sua ocorrência natural no sudeste colombiano, sul e leste da Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, leste do Equador e do Peru, Panamá, norte da Bolívia e na Caatinga brasileira (LOEBMANN; HADDAD, 2010).

Com padrão de pele variada, a jararaca-do-norte apresenta o corpo em tons oliva, marrom, cinza ou amarelo, e marcações escuras nas laterais em formato trapezoide (CAMPBELL; LAMAR, 2004) (Figura 1). Ela possui hábitos noturnos, com atividade esporádica durante o dia, e comportamento menos ativo na estação seca da Amazônia Central (OLIVEIRA, MARTINS, 2001).

Figura 1. Exemplar jovem de *Bothrops atrox* de cativeiro (Fonte: Autora)



Em relação à dieta, um estudo realizado por Bisneto e Kaefer (2019), no centro e sudoeste da Amazônia, demonstrou que a espécie apresenta variação alimentar ontogenética, de forma que indivíduos menores se alimentam principalmente de presas

ectotérmicas, enquanto adultos predam espécimes endotérmicas. Os autores também descreveram a presença de dimorfismo sexual em exemplares adultos, com fêmeas de dimensões significativamente maiores do que os machos.

Por ser a serpente responsável pelo maior número de acidentes ofídicos na região norte do país (SILVA et al., 2019), a peçonha de *B. atrox* tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Pesquisas demonstraram variações intraespecíficas em sua composição entre indivíduos que habitavam área de várzea e de locais não alagadiços, provavelmente por diferença de itens alimentares consumidos (CALVETE et al., 2011; FREITAS-DESOUSA et al., 2015; SOUSA et al., 2017).

A teoria evolutiva mais aceita afirma que a peçonha de *B. atrox* originou-se de enzimas digestivas. Tal secreção não possui atividade neurotóxica e promove baixa letalidade, entretanto, seus componentes causam graves lesões teciduais locais e desencadeiam coagulopatias (SOUSA et al., 2017). Além da questão de saúde pública, a composição da peçonha tem sido estudada quanto à sua aplicação farmacológica, sobretudo ligada à ação fibrinolítica para a produção de anticoagulantes (OLIVEIRA et al., 2019).

2.2 Colheita e armazenamento de sangue em serpentes

O volume sanguíneo total em serpentes corresponde de 5 a 8% do peso corporal. Desse montante, recomenda-se como quantidade máxima a colheita de até 10%, de forma que não haja prejuízo à saúde dos animais e a amostra seja suficiente para uma triagem adequada do paciente (NARDINI et al., 2013).

A colheita de sangue em serpentes pode ser realizada por cardiocentese, punção no seio venoso occipital, na veia palatina, na veia paravertebral ou na veia caudal ventral (De CARVALHO et al., 2017; TROIANO, 2018; ALMEIDA et al., 2022). Essa última é a opção mais utilizada por ser de fácil acesso e oferecer menor risco aos profissionais envolvidos, sobretudo se tratando de espécies peçonhentas (TROIANO, 2018; ALMEIDA et al., 2022).

Para a colheita de sangue na veia caudal ventral, a serpente deve ser posicionada em decúbito dorsal, estabilizando a cauda com uma das mãos, para que ela não se movimente durante o procedimento. Pode-se utilizar um tubo de contenção de serpentes,

a fim de tornar o procedimento mais seguro e com menor estresse para os animais. A inserção da agulha acontece em um ângulo de 45° e deve ser direcionada cranialmente (Figura 2) (SYKES; KLAPHAKE; 2015; TROIANO, 2018). Um cuidado a ser observado é a possibilidade de contaminação da amostra por linfa, com diluição do conteúdo e alteração dos resultados. Caso observe-se alteração na coloração do sangue, deve-se repetir a colheita (GILLET et al., 2015).

Figura 2. Colheita de sangue em veia caudal ventral de *Bothrops atrox* (Fonte: Autora)



A heparina de lítio é o anticoagulante mais empregado para amostras hematológicas de répteis, sobretudo em Testudines (CAMPBELL, 2015). Entretanto, um estudo com a serpente *Drymarchon couperi* comparou a contagem diferencial em lâmina de amostras com diferentes anticoagulantes e relatou que o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) foi o que apresentou valores mais próximos ao esfregaço de sangue recém-colhido e a nitidez das células foi superior à heparina de lítio, sendo o mais recomendado pelos autores, assim como previamente citado em outras pesquisas com Squamatas (SALAKIJ et al., 2002; HANLEY et al., 2004; BOGAN et al., 2020).

2.3 Hematologia de *Bothrops* sp.

A análise hematológica é uma importante ferramenta para avaliação da saúde dos animais em cativeiro. Para tanto, valores de referência das diversas espécies são

cruciais para a correta interpretação dos exames. Além da padronização por espécie, é importante obter valores de referência para condições específicas, uma vez que além das enfermidades, os padrões podem ser alterados pela idade, origem, fase reprodutiva, época do ano, tipo de alimentação e sexo (GREGO et al., 2006; CALVETE et al., 2011; FREITAS-DESOUSA et al., 2015; SOUSA et al., 2017).

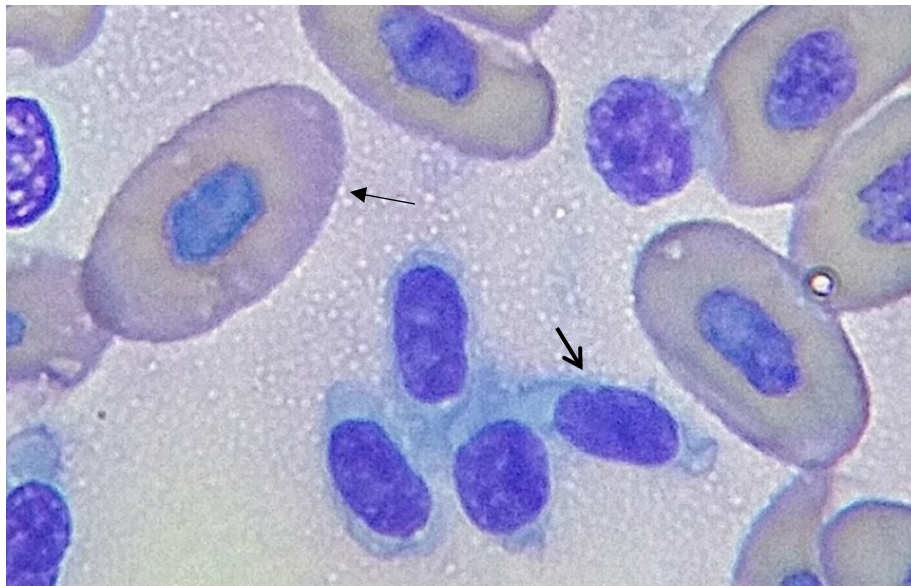
Apesar da importância na rotina profilática do plantel, ainda há escassez de informações científicas acerca da hematologia e bioquímica sanguínea de serpentes peçonhentas correlacionadas a condições clínicas. É considerável o número de publicações com padrões de referência hematológica para répteis de interesse biomédicos como é o caso dos viperídeos, entretanto, ainda faltam valores para algumas espécies, como a *Bothrops atrox* (TROIANO et al., 1999; 2000; GREGO et al., 2006; GÓMEZ et al., 2016; CHANG-CASTILLO et al., 2021).

Para exemplares do gênero *Bothrops*, foram encontradas publicações de padrão hematológico para as espécies *B. asper*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi diporus*, *B. leucurus* e *B. ammodytoides* (TROIANO et al., 1999; 2000; GREGO et al., 2006; GÓMEZ et al., 2016). No ANEXO 1 deste documento foram disponibilizados os valores de tais referências, para fins de comparação.

As células sanguíneas em répteis são representadas pelas hemácias, leucócitos e trombócitos. As hemácias das serpentes possuem formato oval com presença de um núcleo central de borda irregular (Figura 3). Sobretudo em exemplares de vida livre, frequentemente são identificados parasitas intraeritrocitários, como o *Hepatozoon* sp., que quando em situação de homeostase, não representam relevância clínica, porém em condições de alto parasitismo e imunossupressão, podem desencadear anemias graves e óbitos (FRYE, 1991; GREGO et al., 2006). Os trombócitos são células pequenas, com um núcleo basofílico central, citoplasma claro e com função análoga às plaquetas dos mamíferos (CAMPBELL, 2006; ARIKAN; ÇIÇEK, 2014).

No caso dos leucócitos, a contagem diferencial em serpentes é bastante divergente. Por exemplo, Alleman et al. (1999) citam a presença apenas de linfócitos, azurófilos, heterófilos e basófilos. Nesse contexto, os eosinófilos, reconhecidos como célula sanguínea para a maior parte dos répteis, muitas vezes são considerados inexistentes no sangue ofídico (CAMPBELL, 1996; ALLEMAN et al., 1999; GREGO et al., 2006).

Figura 3. Hemácias (seta fechada) e trombócitos (seta aberta) de *Bothrops atrox*. Aumento de 1000 x. (Fonte: Maísa Paschoal Rios)



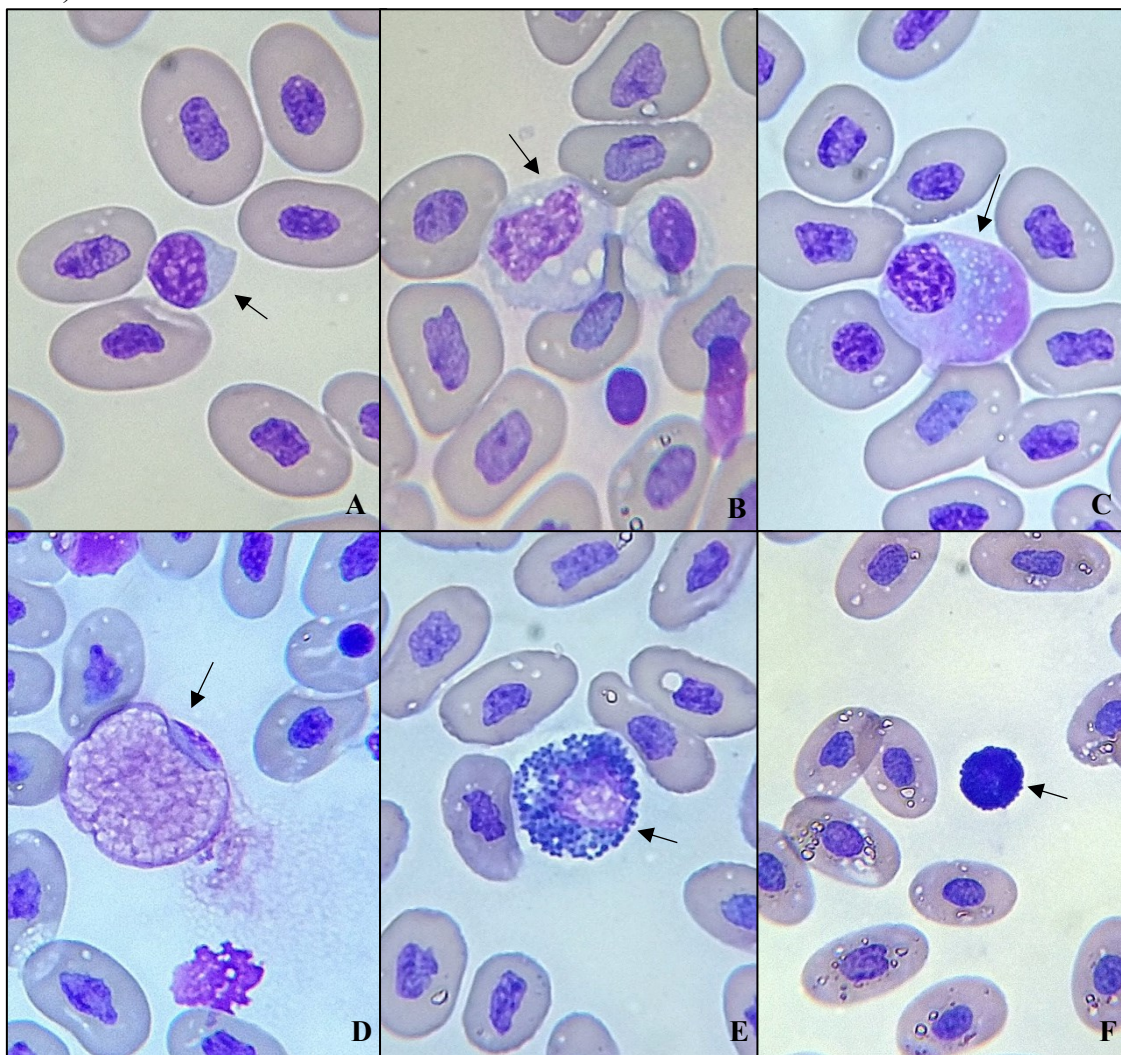
No caso do gênero *Bothrops*, a maior parte dos estudos de hematologia considera que o diferencial de leucócitos é dividido em células mononucleares, representadas pelos linfócitos, monócitos e azurófilos, e em granulócitos, que correspondem aos heterófilos, basófilos e eosinófilos (Figura 4) (TROIANO et al., 1999; 2000; GÓMEZ et al., 2016). Apesar de algumas espécies de serpentes apresentarem azurófilos e heterófilos como leucócitos predominantes (SANO-MARTINS, 1978; DOTSON; RAMSAY, 1995; BOUNOUS et al., 1996), na maioria das espécies ofídicas estudadas, inclusive nas do gênero *Bothrops*, os linfócitos representam percentual maior a 50% (TROIANO et al., 2000; CHANG-CASTILLO et al., 2021).

Os linfócitos possuem características semelhantes aos dos mamíferos, com tamanho variado, citoplasma basofílico e a presença de um núcleo único com menor padrão de cromatina densa. O aumento linfocítico na circulação está relacionado a processos inflamatórios, presença de corpos estranhos, processos de cicatrização, parasitemia e doenças virais (FRYE, 1991; CAMPBELL, 2006; LENTINI et al., 2011). Por outro lado, a linfopenia está relacionada à má-nutrição e excesso de corticoide endógeno ou exógeno (THRALL et al., 2012; CAMPBELL, 2015).

Os monócitos de serpentes também se assemelham aos dos mamíferos e geralmente são células de maior dimensão no sangue dos animais (CAMPBELL, 2006).

A monocitose geralmente está associada a quadros crônicos de infecção e presença de granuloma (LENTINI et al., 2011).

Figura 4. Leucócitos (setas) de *Bothrops atrox*. A: Linfócito; B: Monócito; C: Azurófilo; D: Heterófilo; E: Eosinófilo; F: Basófilo. Aumento de 1000 x (Fonte: Maísa Paschoal Rios)



No caso dos azurófilos, esse tipo celular é exclusivo de répteis e possui funções semelhantes aos neutrófilos de mamíferos, com aumento de circulação sobretudo em quadros crônicos de infecção. Nas serpentes, essas células possuem grânulos finos no citoplasma vacuolizado e um núcleo redondo (ALLEMAN et al., 1999).

Os eosinófilos de serpentes podem ser semelhantes aos heterófilos, pois também apresentam núcleo marginal, entretanto, seus grânulos citoplasmáticos eosinofílicos são circulares (FRYE, 1991; WILKINSON, 2004; STRIK et al., 2007). Apesar de algumas vezes serem citados com as mesmas funções dos eosinófilos de mamíferos, essas células

ainda não têm seu papel bem compreendido nos répteis, mas está ligado a fagocitose de imunocomplexos, e geralmente associada a presença de infecções por parasitas. (THRALL et al., 2012; CAMPBELL, 2015).

Os heterófilos são os leucócitos granulocíticos mais abundantes em répteis, também sendo considerados análogos aos neutrófilos de mamíferos. Trata-se de células arredondadas, com citoplasma claro, núcleo redondo, excêntrico e potencialmente bilobado, com grande quantidade de grânulos eosinofílicos alongados. A heterofilia em serpentes geralmente está ligada a processos inflamatórios agudos. Algumas neoplasias podem gerar heterofilia também, sobretudo a leucemia mieloide (LENTINI et al., 2011; TROIANO, 2018).

Por fim, os basófilos são células pequenas e esféricas, com grande número de grânulos basofílicos no citoplasma. Sua função em serpentes, provavelmente é a mesma que nos mamíferos, pois elas possuem imunoglobulinas na superfície e liberam histamina na degranulação (FRYE, 1991). Os basófilos podem aumentar na presença de corpos estranhos, de microparasitas sanguíneos e infecções virais (LENTINI et al., 2011; THRALL et al., 2012; CAMPBELL, 2015).

2.4 Neoplasia em ovário e oviduto de serpentes

As neoplasias estão entre as mais importantes causas de doença e mortalidade de animais sob cuidados humanos (MOULTON, 1990). Christman et al. (2017) afirmam que há diversas descrições que abordam oncologia na classe Reptilia, entretanto, a maior parte se trata de relatos de casos isolados e ainda são necessários estudos que avaliem a ocorrência de diferentes tumores em uma única espécie ou de um tipo de tumor em espécies diferentes.

A origem neoplásica em répteis é predominantemente espontânea, assim como ocorre em outros grupos de animais, entretanto, diversos vírus foram identificados como potencialmente carcinogênicos nesses animais, como é o caso do herpesvirus causador de fibropapilomatose em tartarugas marinhas (ESPINOZA et al., 2020). Também foi levantada como possibilidade, a origem viral de tumores presentes em quatro exemplares de *Python molurus bivittatus* de um criadouro, em que foram encontradas partículas retrovirais (CHANDRA et al., 2001).

Em um levantamento bibliográfico, Christman et al. (2017) citam que os sistemas mais acometidos por neoplasias em répteis são o hematopoiético (14,9%), hepatobiliar (1301%) e tegumentar (12,3%). De toda a literatura referenciada, a maior parte das publicações envolvem casos oncológicos em sistema hematopoiético, seguido por neoplasias de origem epitelial em serpentes (RAMSAY et al., 1996; CATÃO-DIAS; NICKOLS, 1999, CHRISTMAN et al., 2017).

Em relação a tumores em sistema reprodutor de répteis, Mauldin e Done (2006) consideram que neoplasias reprodutivas são comuns em serpentes, com relatos de hemangioma, carcinoma e tumores de células da granulosa acometendo ovário, e leiomiossarcoma com ocorrência em oviduto. Além desses, também são relatados na literatura casos de adenocarcinoma ovariano (PEREIRA; VINER, 2008) e hemangiossarcoma (GARNER; JACOBSON, 2021). Garner e Jacobson (2021) citam a ocorrência de fibroma em uma viperídea norte americana da espécie *Agkistrodon piscivorus*, entretanto, faltam dados dessa neoplasia para espécies nativas brasileiras e não foram encontradas citações de fibrossarcoma em sistema reprodutor de ofídios.

O fibroma é uma formação tumoral mesenquimal capaz de surgir em qualquer local do corpo e se apresenta normalmente como tumefações em formato de esfera, limites bastante definidos e circundados por uma cápsula consistente. Devido ao fato de não apresentarem morfologias celulares incomuns, possuem pouca ou nenhuma figura de mitose e por não haver anaplasia, o fibroma é considerado benigno (ROBBINS, 1996). Entretanto, seu equivalente maligno, o fibrossarcoma, tem como características lesões desiguais, massas volumosas pouco definidas com tendência a ulcerar e com a epiderme bem aderida (REAVILL, 2004). Santos, et al. (2015), descreveram fibrossarcoma em cavidade oral na espécie *Bothrops pubescens*.

Na literatura faltam dados sobre parâmetros hematológicos para espécie *Bothrops atrox* saudáveis, bem como relatos de caso de neoplasias para esta espécie, e possíveis alterações dos valores de hemograma em caso de fibroma e fibrossarcoma em ovidutos de *B. atrox*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**. Schaumburg, v. 60, n. 4, p. 507-514, 1999.

ALMEIDA, D.; KENNEDY, M.; WENDT-HORNICKLE, E. Snake Sedation and Anesthesia. **The veterinary clinics of North America**. Exotic animal practice, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 97-112, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2021.08.003>

ARIKAN, H.; ÇİÇEK, K. Haematology of amphibians and reptiles: a review. **North-Western Journal of Zoology**, Oradea, v. 10, n. 1, p. 190-209, 2014.

BISNETO, P. F.; KAEFER, I. L. Reproductive and feeding biology of the common lancehead *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae) from central and southwestern Brazilian Amazonia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 49, n. 2, p. 105-113, 2019.
<https://doi.org/10.1590/1809-4392201802371>

BOGAN JR, J. E.; ANTONIO, F.; ZACHARIAH, T. T.; STACY, N. I. Comparison of the effects of three anticoagulants on hematological analytes in the eastern indigo snake (*Drymarchon couperi*). **The Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, Mt. Juliet, v. 30, n. 2, p. 96–100, 2020.
<https://doi.org/10.5818/17-07-118.2>

BORGES, R. C. **Serpentes Peçonhentas Brasileiras**, São Paulo: Atheneu, 1999. 152 p.

BOUNOUS, D. I.; DOTSON, T. K.; BROOKS, R. L.; RAMSAY, C. Cytochemical staining and ultrastructural characteristic of peripheral blood leucocytes from the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). **Comparative Haematology International**, London, v. 6, n. 1, p. 86-91, 1996.
<https://doi.org/10.1007/BF00426047>

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H. V.; FURTADO, M. F. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 4, p. 510-527, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003>

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: Cornell University Press, 2004. 528 p.

CAMPBELL, T. W. Clinical pathology. In: MADER, D. R. (ed.). **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 248-257.

CAMPBELL, T. W. Clinical pathology of reptiles. In: MADER, D. R. (ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2. Ed. Saint Louis: Saunders; 2006. p. 453-470.

<https://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50032-8>

CAMPBELL, T. W. **Exotic animal hematology and cytology**. 4. Ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2015. 432 p.

<https://doi.org/10.1002/9781118993705>

CATÃO-DIAS, J. L.; NICHOLS, D. K. Neoplasia in snakes at the National Zoological Park, Washington, DC (1978–1997). **Journal of comparative pathology**, London, v. 120, n. 1, p. 89-951, 1999.

<https://doi.org/10.1053/jcpa.1998.0253>

CHANDRA, A. M. S.; JACOBSON, E. R.; MUNN, R. J. Retroviral particles in neoplasms of burmese pythons (*Python molurus bivittatus*). **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 38, n. 5, p. 561-564, 2001.

<https://doi.org/10.1354/vp.38-5-561>

CHANG-CASTILLO, A.; ARGUEDAS, R.; CHACÓN, D.; CORRALES, G.; GÓMEZ, A. Hematological parameters and globulin profile of *Bothrops asper* and *Crotalus simus* snakes (Serpentes: Viperidae), after the main venom gland removal. **Cuadernos de Herpetología**, Buenos Aires, v. 35, n. 1, p. 121-130, 2021.

CHRISTMAN J.; DEVAU M.; WILSON-ROBLES H.; HOPPE S, RECH R.; RUSSEL K. E.; HEATLEY J. J. Oncology of Reptiles: Diseases, Diagnosis and Treatment. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**. V.20, n.1. p.87–110. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2016.07.003>

DE CARVALHO, M. P. N.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. G.; MASSOCO, C. O.; SANT'ANNA, S. S.; LOURENÇO, M. M.; LEVIN, G. L.; SOGAYAR, M. C.; GREGO, K. F.; CATÃO-DIAS, J. L. Functional characterization of neotropical snakes peripheral blood leukocytes subsets: Linking flow cytometry cell features, microscopy images and serum corticosterone levels. **Developmental & Comparative Immunology**, Tarrytown, v. 74, n. 1, p. 144-153, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.04.007>

DEBIEN, Y. V. **Influência de variáveis ambientais e geográficas na estruturação da comunidade de répteis squamata em florestas de várzea e terra firme na região do médio rio Solimões, Amazonas, Brasil**. 2014. 53 f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade da Amazônia, Manaus, 2014.

DONATO, M. F.; BEZERRA, C. M.; LIMA, L.; PESSÔA, H. L. F. P.; DINIZ, M. F. F. M. **Bioprospecção e inovação tecnológica de produtos naturais e derivados de plantas e animais**. João Pessoa: Editora UFPB, 2020. 549 p.

DOTSON, T. K.; RAMSAY, E. A color atlas of the blood cells of the yellow rat snake. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, Yardley, v. 17, n. 8, p.1013-1017, 1995.

ESPINOZA, J.; HERNÁNDEZ, E.; LARA-UC, M. M.; RESÉNDIZ, E.; ALFARO-NÚÑEZ, A.; HORI-OSHIMA, S.; MEDINA-BASULTO, G. Genetic analysis of

chelonid Herpesvirus 5 in marine turtles from baja California Peninsula, **EcoHealth**, London, v. 17, n. 1.; p. 258–263, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s10393-020-01482-z>

FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; AMAZONAS, D. R.; SOUSA, L. F.; SANT'ANNA, S. S.; NISHIYAMA JR, M Y.; SERRANO, S. M. T.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOURÃO, R. H. V. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. **Biochimie**, Paris, v. 118, n. 1, p. 60-70, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.006>

FRYE, F. L. Hematology as applies to clinical reptile medicine. In: FRYE, F. L. (ed.). **Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry**. 2. ed. Malabar: Krieger Publishing Co, 1991. p. 209–79

GARNER, M. M.; JACOBSON, E. R. **Noninfectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text**. New York: Productivity Press, 2021. 1564 p.
<https://doi.org/10.1201/9780429154317>

GILLET, A. K.; FLINT, M.; HULSE, L.; HANGER, J.; MILLS, P.C. Haematological and biochemical reference intervals for three species of hydrophiine sea snakes (*Hydrophis curtus*, *H. elegans* and *H. peronii*) in Australia. **The Veterinay Journal**, London, v. 204, n. 3, p. 275-281, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.008>

GÓMEZ, A.; ARROYO, C.; ASTORGA, W.; CHACÓN, D.; RODRÍGUEZ, S.; JIMÉNEZ, M. Hematological and biochemical reference intervals for *Bothrops asper* and *Crotalus simus* (Serpentes: Viperidae), maintained in captivity for venom extraction. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 25, n. 1, p. 615–623, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s00580-016-2240-2>

GREGO, K. F.; ALVES, J. A. S.; RAMEH DE ALBUQUERQUE, L. C.; FERNANDES, W. Referências hematológicas para a jararaca de rabo branco (*Bothrops leucurus*) recém capturadas da natureza. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1240-1243, 2006.
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000600040>

GREGO, K. F.; VIEIRA, S. E. M.; VIDUEIROS, J. P.; SERAPICOS, E. O.; BARBARINI, C. C.; DA SILVEIRA, G. P. M.; RODRIGUES, F. S.; ALVES, L. C. F.; STUGINSKI, D. R.; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L. C.; FURTADO, M. F. D.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; MORAIS-ZANI, K.; DA ROCHA, M. M. T.; FERNANDES, W.; SANT'ANNA, S. S. Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present: a scoping history. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2021.

HANLEY, C. S.; HERNANDEZ-DIVERS, S. J.; BUSH, S.; LATIMER, K. S. Comparison of the effect of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium

heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 35, n. 3, p. 328–332, 2004.

<https://doi.org/10.1638/03-057>

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: ICMBio/MMA, 2018. 492 p.

LENTINI, A. M.; CRAWSHAW, G. J.; LICHT, L. E.; MCLELLAND, D. J. Pathologic and hematologic responses to surgically implanted transmitters in Eastern massasauga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus catenatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 47, n. 1, p. 107-125, 2011.

<https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.107>

Loebmann, D. & C. F. B. Haddad 2010: Amphibians and reptiles from a highly diverse area of the Caatinga domain: composition and conservation implications. – **Biota Neotropica**, v.10, p.227–256. 2010.

<https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000300026>

MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3.ed. Berkeley: University of California, 1990.672p.

MONACO, L. M. **Soros e vacinas do Butantan**. São Paulo: Instituto Butantan, 2018. 24 p.

MATOS, R. R.; IGNOTTI, E. Incidência de acidentes ofídicos por gêneros de serpentes nos biomas brasileiros. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 7, p. 2837-2846, 2020.

<https://doi.org/10.1590/1413-81232020257.31462018>

MAULDIN, G. N.; DONE, L. B. Oncology. In: MADER, D. R (ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2. ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 299–322.

<https://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50023-7>

NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. **The veterinary clinics of North America**. Exotic animal practice, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 1-30, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.09.001>

OLIVEIRA, M. E.; MARTINS, M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in Central Amazonia, Brazil **Herpetological Natural History**, Riverside, v. 8, n. 2, p. 101-110, 2001.

OLIVEIRA, L. S.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; ALVARENGA, V. G.; VIVAS-RUIZ, D. E.; YARLEQUE, A.; LIMA, A. M.; CAVACO, A.; EBLE, J. A.; SANCHEZ, E. F. Atroxlysin-III, A metalloproteinase from the venom of the Peruvian pit viper snake.

Molecules, Basel, v. 24, n. 19, p. 3489, 2019.

<https://doi.org/10.3390/molecules24193489>

PEREIRA, H. C.; GOMES, D. O.; HIRANO, L. Q. L.; SANTOS, A. L. Q.; PEREIRA, A. M. C. Aerobic bacteria in oral cavity of Lancehead snakes (*Bothrops atrox*) with stomatitis. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, Maringá, v. 39, n. 3, p. 331-334, 2017.

<https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v39i3.34625>

PEREIRA, M.E.; VINER, T. C. Oviduct adenocarcinoma in some species of captive snakes. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, n. 45, v. 5, p. 693-697, 2008.

<https://doi.org/10.1354/vp.45-5-693>

RAMSAY, E. C.; MUNSON, L.; LOWENSTINE, L.; FOWLER, M. E. A retrospective study of neoplasia in a collection of captive snakes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 27, n. 1, p. 28-34, 1996.

REAVILL, D. R. Tumors of pet birds. **The Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 7, n. 3, p.537-560, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2004.04.008>

ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 97-131.

RODASKI, S; PIEKARZ, C. H. Epidemiologia e Etiologia do Câncer. In: DARLECK, C. R.; DE NARDE, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 1-23.

SALAKIJ, C.; SALAKIJ, J.; APIBAL, S.; NARKKONG, N.A.; CHANHOM, L.; ROCHANAPAT, N. Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*).

Veterinary clinical pathology, Baton Rouge, v. 31, n. 3, p. 116–126, 2002.

<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2002.tb00290.x>

SANO-MARTINS, I. S. **Hematologia comparada de serpentes *Bothrops jararaca* e *Waglerophis merremii***. 1978. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

SANTOS, E. D.; SILVA-FILHO, J. R.; MACHADO, T. P.; DAU, S. L.; RODRIGUEZ, R.; MOTTA, A. C. Oral fibrosarcoma in jararaca (*Bothrops pubescens*): anatomopathological and immunohistochemical aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 7, p. 664-670, 2015.

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000700011>

SILVA, A. M.; MONTEIRO, W. M.; BERNARDE, P. S. Popular names for bushmaster (*Lachesis muta*) and lancehead (*Bothrops atrox*) snakes in the Alto Juruá region: repercussions for clinical-epidemiological diagnosis and surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 52, 2019.

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0140-2018>

SOUSA, L. F.; PORTES-JUNIOR, J. A.; NICOLAU, C. A.; BERNARDONI, J. L.; NISHIYAMA JR, M. Y.; AMAZONAS, D. R.; FREITAS-DE-SOUSA, L. A.;

MOURÃO, R. H. V.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 32-46, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003>

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.

<https://doi.org/10.1201/9781420004038.ch3>

SYKES, J. S.; KLAPHAKE, E. Reptile Hematology. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 35, n. 3, p. 661-680, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.014>

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; CAMPBELL, T. W. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; CAMPBELL, T. (eds). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2. Ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. p 259-276.

TROIANO, J.C. **Doenças dos répteis**. São Paulo: MedVet, 2018. 300 p.

TROIANO, J. C.; VIDAL, J. C.; GOULD, E. F.; HEKER, J.; GOULD, J.; VOGT, A. U.; SIMONCINI, C.; AMANTINIA, E.; ROODT, A. Hematological values of some *Bothrops* species (Ophidia - Crotalidae) in captivity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2000.

<https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000200005>

TROIANO, J. C.; VIDAL, J. C.; GOULD, E. F.; MALINSKAS, G.; GOULD, J.; SCAGLIONE, M.; SCAGLIONE, L.; HEKER, J. J.; SIMONCINI, C.; DINAPOLI, A. Haematological and blood chemical values from *Bothrops ammodytoides* (Ophidia–Crotalidae) in captivity. **Comparative Haematology International**, London, v. 9, n. 1, p. 31-35, 1999.

<https://doi.org/10.1007/BF02585519>

WILKINSON, R. Clinical pathology. In: MCARTHUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. (eds.). **Medicine and surgery of tortoises and turtles**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 141–86.






<https://doi.org/10.1002/9780470698877.ch7>

**CAPÍTULO 2 - HEMATOLOGIC PARAMETERS OF CAPTIVE *Bothrops atrox*
(SQUAMATA: VIPERIDAE)**

Artigo redigido conforme normas da revista Bioscience Journal.

Publicado em 30/09/2022.

HEMATOLOGIC PARAMETERS OF CAPTIVE *Bothrops atrox* (SQUAMATA: VIPERIDAE)

Heloísa Castro PEREIRA¹ , Leticia Prata Juliano Dimatteu TELLES² , Líria Queiroz Luz HIRANO² ,
Maísa Paschoal RIOS¹ , André Luiz Quagliatto SANTOS¹ 

¹ Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

² Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil.

Corresponding author:

Heloísa Castro PEREIRA
helo_ca@hotmail.com

How to cite: PEREIRA, H.C., et al. Hematologic parameters of captive *Bothrops atrox* (Squamata: Viperidae). *Bioscience Journal*. 2022, **38**, e38089. <https://doi.org/10.14393/BJ-v38n0a2022-62653>

Abstract

The breeding of venomous snakes in captivity for research purposes and mainly as a source of pharmaceutical products highlights the need to determine hematological parameters for monitoring and ensuring a healthy breeding population. The complete blood count is used to help diagnose alterations such as anemia, inflammatory diseases, parasitemia, hematopoietic disorders, hemostatic and toxicological changes, as well as bacterial and viral inclusions. Thus, the objective of this study was to define reference parameters for complete blood count in *Bothrops atrox* snakes. Blood samples were collected from 20 specimens of *B. atrox* from the Pentapharm do Brasil commercial breeding facility for laboratory examination. Mean values and standard deviation were: hematocrit $33.6 \pm 5.47\%$, hemoglobin $10.81 \pm 2.07\text{g/dL}$, total number of erythrocytes $0.59 \pm 0.1 \times 10^6/\text{mm}^3$, leukocytes $11387.5 \pm 3279.2/\text{mm}^3$ and thrombocytes $28175 \pm 6320/\text{mm}^3$. No significant difference was observed between males and females and heterophils were the predominant leukocyte cell type.

Keywords: Blood Count. Clinical Pathology. Leukogram. Reptile.

1. Introduction

The snake *Bothrops atrox* Linnaeus 1758, popularly known as the common lancehead, is bred in captivity for extraction of its venom. Such byproduct is used in the global pharmaceutical industry as raw material for drugs to treat cardiovascular disorders (Sajevic et al. 2011; Jacob-Ferreira et al. 2017). This species of snake belongs to the class Reptilia, order Squamata, suborder Ophidia, family Viperidae and subfamily Crotalinae (Bernarde 2011; Costa and Bérnills 2018).

The interest in captive breeding of snakes has increased worldwide. However, specialized veterinarians often encounter difficulties in obtaining laboratory reference values for the prophylactic management of diseases in these reptiles. In the literature, there is little information on the hematological, biochemical and clinical parameters of the species *B. atrox*, and the characterization of such data is important in the evaluation of the health of the breeding population, diagnosis and therapeutic follow-up (Trujillo et al. 2016; Kindlovits et al. 2017; Troiano, 2018).

In members of the Reptilia class, the total blood volume is estimated to be between 5 and 8% of body weight, and most animals can efficiently tolerate acute blood loss of up to 10% of this amount (Nardini et al. 2013). In addition, the lymphatic vessels of reptiles are more superficial and closer to the

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE *Bothrops atrox* DE CATIVEIRO (SQUAMATA: VIPERIDAE)

Heloísa Castro PEREIRA¹; Letícia Prata Juliano Dimatteu TELLES²; Líria Queiroz Luz HIRANO³; Maísa Paschoal RIOS⁴; André Luiz Quagliatto SANTOS⁵

¹Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. Avenida Mato Grosso, CEP 38 405-314. Author for correspondence: helo_ca@hotmail.com. ORCID: 0000-0001-8349-3098.

²Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil. Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal, Brazil, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, .70910-900. E-mail: leticia.dimatteu@aluno.unb.br. ORCID: 0000-0001-6130-0283.

³Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil. Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, Universidade de Brasília (UnB), Distrito Federal, Brazil, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, .70910-900. E-mail: liriahirano@unb.br. ORCID: 0000-0002-9438-7538.

⁴Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. Avenida Mato Grosso, CEP 38 405-314 E-mail: maisapaschoal@hotmail.com. ORCID: 0000-0002-5640-5619.

⁵Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnics, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. Avenida Mato Grosso, CEP 38 405-314 E-mail: quagliatto.andre@gmail.com. ORCID: 0000-0002-2807-4592.

HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF CAPTIVE *Bothrops atrox* (SQUAMATA: VIPERIDAE)

ABSTRACT

Breeding venomous snakes in captivity for research purposes and mainly as a source of pharmaceutical products highlights the need to determine hematological parameters for monitoring and ensuring a healthy breeding population. The complete blood count is used to help diagnose alterations such as anemia, inflammatory diseases, parasitemia, hematopoietic disorders, hemostatic and toxicological changes, and bacterial and viral inclusions. Thus, this study aimed to define complete blood count reference parameters in *Bothrops atrox* snakes. Blood samples were collected from 20 specimens of *B. atrox* from Pentapharm do Brasil commercial breeding facility for laboratory examination. Mean and standard deviation values were hematocrit 33.6±5.47%, hemoglobin 10.81±2.07g/dL, total number of erythrocytes 0.59±0.1x10⁶/mm³, leukocytes 11387.5±3279.2/mm³, and thrombocytes 28175±6320/mm³. There was no significant difference between males and females, and heterophils were the predominant leukocyte cell type.

Keywords: Blood count. Clinical pathology. Leukogram. Reptile.

INTRODUCTION

The *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) snake, popularly known as the common lancehead, is bred in captivity for venom extraction. Such by-product is used in the global pharmaceutical industry as raw material for drugs to treat cardiovascular disorders (Sajevic et al. 2011; Jacob-Ferreira et al. 2017). This snake species belongs to the Reptilia class, Squamata order, Ophidia suborder, Viperidae family, and Crotalinae subfamily (Bernarde 2011; Costa and Bérnills 2018).

The interest in the captive breeding of snakes has increased worldwide. However, specialized veterinarians often encounter difficulties obtaining laboratory reference values for the prophylactic management of diseases in these reptiles. The literature offers little information on the hematological, biochemical, and clinical parameters of the *B. atrox* species, and the characterization of such data is important to evaluate the health of the breeding population, diagnosis, and therapeutic follow-up (Trujillo et al. 2016; Kindlovits et al. 2017; Troiano, 2018).

In members of the Reptilia class, the total blood volume is estimated between 5 and 8% of body weight, and most animals can efficiently tolerate acute blood loss of up to 10% of this amount (Nardini et al. 2013). Moreover, the lymphatic vessels of reptiles are more superficial and closer to blood circulation, which may cause puncture errors that lead to the dilution of the blood sample with lymph and the need to obtain a new one (Nardini et al. 2013; Heatley and Russel 2019).

The anticoagulants most commonly used in animal blood processing are lithium heparin and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The former is the first choice for some reptile species because of the hemolysis seen with EDTA, which is common in Testudines. Conversely, heparin can promote leukocyte and thrombocyte aggregation, with blue staining in the smear zone. Thus, blood smears without anticoagulants are recommended whenever possible (Nardini et al. 2013; Campbell 2015).

The blood cells of reptiles include erythrocytes, nucleated thrombocytes, heterophils, eosinophils, basophils, monocytes, lymphocytes, and azurophils (Campbell 2014; Heatley & Russel 2019). According to Heatley & Russel (2019), eosinophils are rare or absent in most snakes, and their presence is controversial, although it has been described in recent studies such as by Kindlovits et al. (2017) with the genus *Bothrops* (*B. atrox* and *B. jararacussu*) and *Corallus hortulanus*, and the research by Quadrini et al. (2018) with *Python bivittatus*. Reptile erythrocytes are ellipsoid, permanently nucleated, and larger than those of birds and mammals (Campbell 2014).

The complete blood count (CBC) is used to help diagnose alterations such as anemia, inflammatory diseases, parasitemia, hematopoietic disorders, hemostatic and toxicological changes, and bacterial and viral inclusions (Nardini et al. 2013; Campbell 2014). Some examples of parasites found in snake blood are from the *Haemogregarina*, *Hepatozoon*, and *Serpentoplasma* genera (Nardini et al. 2013). The detection and causes of anemia in these reptiles are similar to mammals and birds, with regeneration markers characterized by basophilic cytoplasmic stippling, polychromasia, binucleation, and increased anisocytosis and erythroid precursors (Heatley and Russel 2019). In snakes, increased azurophils have been associated with acute cases of inflammation and infectious disease (Heatley and Russel 2019).

To ensure the success in the prophylactic management of snakes and focus on maintaining a healthy breeding population with a longer life span and welfare, reference laboratory data are important regarding several variables such as species, age, origin, housing characteristics, and study regions. Therefore, this study aimed to define blood count reference parameters in the *Bothrops atrox* species.

MATERIAL AND METHODS

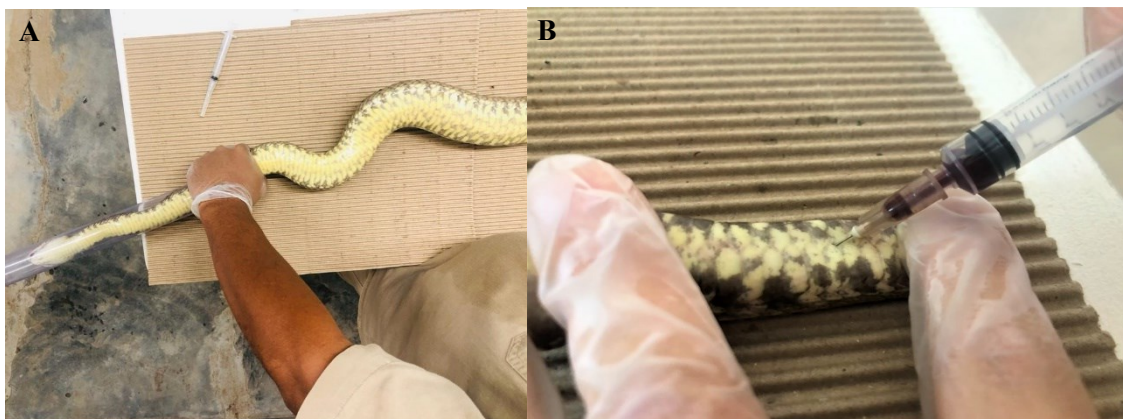
Samples were collected from snakes from Pentapharm do Brasil commercial breeding facility in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, with registration number 4.644.776 at the Brazilian Institute for Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA). The research was authorized by the Authorization and Information System on Biodiversity (SISBIO), number 69416-2, National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen), registration AF8A99F. It also had a favorable opinion number 040/19 from the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Uberlândia.

This study used 20 adult *Bothrops atrox* born in captivity. Ten (50%) were male and 10 (50%) were female, with an approximate age of six years, housed in vivariums in pairs, in an environment of controlled temperature and humidity between 25 to 30°C and 60 to 80%, respectively, and a photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of dark. The animals were fed mice every 21 days, and water was available *ad libitum*. The animals were clinically healthy.

Blood was collected in March 2019. Snakes were physically restrained with a hook and a clear plastic tube to avoid direct contact with the head of the animal. Samples of approximately 0.5 mL of blood were collected, punctured in the caudal vein with disposable 3-mL syringes and disposable 13x0.3-mm (30G) hypodermic needles, which were packed in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Troiano 2018). When obtaining the blood samples, blood smears were also made without anticoagulants.

The snakes did not experience routine changes, and the samples were collected along with the routine procedures of the breeding center, which follows all animal welfare, biosafety, and federal laws. The samples were transported in a Styrofoam box to a clinical pathology laboratory and processed within four hours after collection.

Figure 1. Physical restraint (A) and blood collection in the ventral caudal vein (B) of *Bothrops atrox* in captivity (Source: Author)



Hematocrit was determined with a microhematocrit centrifuge. The concentration of hemoglobin was determined with the hemoglobin cyanide (HiCN) method in a semi-automatic biochemical analyzer model BIO-200™. The hemoglobin kit and standard used were from Labtest Diagnóstica™, and the methodology was performed according to the manufacturer's instructions (Troiano 2018).

To determine the total number of erythrocytes, leukocytes, and thrombocytes, a 1:100 dilution was performed (10 µl of blood to 1 mL of Natt-Herrick solution) with cytological counting in a mirrored Neubauer hemocytometer, under a microscope at 400x magnification. The total numbers of each cell (erythrocytes, leukocytes, and thrombocytes) in the 25 central quadrants were obtained and this value was multiplied by a factor of 1000. The following formula determined the factor: % counted (1/1) x dilution (1:100) x constant (10) (Almosny et al. 2000). The hematimetric indices were calculated according to the original formulas of Wintrobe (1993).

Differential leukocyte count was performed on blood smears stained with Fast Panoptic™, viewed on an optical microscope for observation at 1000x magnification, with immersion oil. A total of 100 cells were counted, determining the percentage of each one (relative value) for subsequently determining their absolute value. The absolute value was found by multiplying the relative value by the number of total leukocytes and dividing by 100. This was done for each blood cell.

The nomenclature proposed by Hawkey and Dennet (1989) was used due to terminology inconsistency. Thus, leukocytes were described as mononuclear cells (lymphocytes, monocytes, and azurophils) or granulocytes (heterophils, basophils, and eosinophils).

Statistics were performed with the Biostat 5.0 software (AYRES et al., 2007). Initially, the normality pattern of data distribution was evaluated with the Shapiro-Wilk test and the occurrence of extreme values based on deviations. The data were subjected to descriptive statistics and, in cases of normal distribution, the lower and upper 95% confidence limits for the mean were determined. For values without normal distribution, the Bootstrap method was applied, with 1000 simulations and a 95% confidence interval. Additionally, the results with normal distribution were between men and women by the Analysis of Variance Tukey's T-Test, at a significance level of $p < 0.05$. In the case of non-parametric data, the Mann Whitney test was used also at a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS

There was no significant difference ($p > 0.05$) in the mean comparisons of blood count parameters between males and females (Table 1).

The results with normal distribution were the total number of red blood cells ($p = 0.66$), hemoglobin ($p = 0.65$), hematocrit ($p = 0.95$), mean hemoglobin concentration (MHC; $p = 0.49$), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC; $p = 0.19$), relative heterophils ($p = 0.08$), absolute ($p = 0.30$) and relative ($p = 0.08$) azurophils, absolute ($p = 0.16$) and relative ($p = 0.33$) monocytes, absolute ($p = 0.39$) and relative ($p = 0.21$) lymphocytes, and platelets ($p = 0.12$). In contrast, mean corpuscular volume (MCV; $p = 0.009$), total leukocytes ($p = 0.049$), absolute heterophils ($p = 0.03$), absolute ($p = 0.009$)

and relative ($p=0.009$) eosinophils, and relative azurophils ($p=0.048$) did not show normal distribution patterns.

In the analysis of extreme values, only one piece of data from MCV ($n=538$ fL) was considered an outlier, as well as two data from the relative azurophil count ($n=0$ and $n=20\%$). All extreme results were disregarded in the descriptive analysis.

Table 1. Mean, standard deviation (SD), standard error (SE), median (Med), minimum and maximum (Min-Max) values for the blood count of male (M) and female (F) captive *B. atrox* ($n=20$).

Parameter		Mean	SD	EP	Med	Min-Max	IC (95%) ^a	p (MxF)
Erythrocytes (millions/mm ³)	M ^a	0.6	0.11	0.02	0.61	0.45-0.83	0.53-0.65	0.6593
	F ^a	0.58	0.09	0.02	0.59	0.37-0.69	0.51-0.62	
Hemoglobin (g/dL)	M ^a	11.26	2.53	0.57	11.65	7.90 – 15.6	9.8-12.5	0.6544
	F ^a	10.36	1.47	0.33	10.15	7.4-12.4	9.5-11.1	
Hematocrit (%)	M ^a	34.5	6.08	1.36	34.5	26 – 46	31.1-37.5	0.5167
	F ^a	32.7	4.95	1.11	33	22-38	29.7-35	
MCV (fl)	M ^a	574	19.75	4.42	580	547-596	561.5-584.1	0.5815 ^a
	F ^b	566.5	18.11	4.05	555.5	549-595	556.3-575.9	0.5340 ^b
MCH (pg)	M ^a	186.94	14.75	3.3	190.90	157.7 – 201.8	177.8-193.6	0.2096
	F ^a	179.87	8.98	2.01	179.05	167.2-200	175.1-184.4	
MCHC (%)	M ^b	32.39	2.33	0.52	33.75	27.9-34.7	30.9-33.5	0.5276 ^a
	F ^a	31.76	1.31	0.29	31.9	29.5-33.6	31-32.3	0.1405 ^b
Total Leukocytes	M ^a	12175	3242.62	725.42	11500	8750-19500	10450.7-13850.9	0.2953
	F ^a	10600	3287.6	735.48	9250	6750-17750	8851-12300.6	
Absolut Leukogram (/mm ³)								
Heterophiles	M ^a	5125	2600.84	581.84	4665	2082-10140	3740.1-6479.1	0.2134
	F ^a	3900	1229.77	275.12	4275	1980-5390	8875.2-12300.6	
Eosinophils	M ^b	63	90.90	20.33	0	0-230	10.5-110	0.1616 ^a
	F ^a	125	100.23	22.42	97.5	0-285	3142.8-4529.7	0.1736 ^b
Basophils	M	0	-	-	0	0-0	-	-
	F	0	-	-	0	0-0	-	
Azurophiles	M ^a	1336.67	418.51	93.85	1265	700-2050	1078.4-1550.1	0.8372
	F ^a	1264.5	549.18	122.86	1062.5	666-2280	964.1-1551.2	
Monocytes	M ^a	522.5	335.02	74.95	548.75	0-1040	326.8-689.8	0.5253
	F ^a	420.56	154.92	34.66	437.5	180-630	325.3-499.7	
Lymphocytes	M ^a	4729	1475.96	330.19	4380	2340-7020	3872.2-5479.3	0.6092
	F ^a	4211.75	1456.87	325.92	4005	2640-6840	3391.4-4918.5	
Relative Leukogram (%)								
Heterophils	M ^a	41.6	14.73	3.3	47.5	16-57	32.4-48.7	0.9296
	F ^a	41.1	10.84	2.42	42	22-54	34.6-46.3	
Eosinophils	M ^b	0.6	0.84	0.19	0	0-2	0.1-1	0.0950 ^a
	F ^a	1.3	0.95	0.21	1	0-3	0.8-1.7	0.1124 ^b
Basophils	M	0	-	-	0	0-0	-	-
	F	0	-	-	0	0-0	-	
Azurophils	M ^a	10.2	5.03	1.13	9.5	0-20	7.2-12.6	0.5828
	F ^a	11.7	2.58	0.58	11.5	8-16	10.2-13	
Monocytes	M ^a	4.4	2.63	0.59	4	0-8	2.8-5.7	0.7675
	F ^a	4.7	1.83	0.41	4.5	2-8	3.7-5.5	
Lymphocytes	M ^a	38.8	7.73	1.73	37	26-54	34.2-42.8	0.7148
	F ^a	40.4	11.2	2.5	38	29-64	34.5-46.1	
Thrombocytes (/mm ³)	M ^a	30900	6458.41	1444.84	28500	23500-44500	27427-34226.8	0.0660
	F ^a	25450	5110.99	1143.4	25250	16000-36000	22526-28002	

: Not evaluated. ^a: Data with normal distribution by the Shapiro-Wilk test (Analysis of Variance and Tukey's t-test, $p<0.05$); ^b: Data without normal distribution by the Shapiro-Wilk test (Mann-Whitney test, $p<0.05$); MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration; MCH: Mean corpuscular hemoglobin; MCV: Mean corpuscular volume; n: sample number. *CI (95%): for data with normal distribution, it represents the lower and upper bounds of the 95% confidence interval of the mean. Data without normal distribution used the Bootstrap method. p: p-value of the Analysis of Variance and Tukey's t-test (parametric data) or the Mann-Whitney test (non-parametric data). Significance level of $p<0.05$.

DISCUSSION

Snake blood is usually collected from the caudal vein because it is a safer and easier method, especially for venomous animals. However, it is prudent to verify the

possibility of contamination of the sample by lymph (Gillett et al. 2015), which dilutes the content, leaving it clearer and altering the results (Troiano et al. 2000). The present study did not find this occurrence, which was prevented by firmly immobilizing the post-cloacal region of the animals and introducing the needle through the ventral aspect of the body.

Lithium heparin is an anticoagulant extensively used in reptile hematological samples, especially in Testudines (Campbell 2015). The research by Harr et al. (2005) with *Python molurus bivittatus* showed minimal differences in hemogram results performed with EDTA and lithium heparin. The present study made the smears at the time of collection without any anticoagulant in the sample. However, the authors indicate that, in previous experiences with the species, EDTA provided better quality smears for differential counting because heparin staining results in dysmorphic and unclear cells.

The erythrocyte count of *B. atrox* was close to the results of Troiano et al. (1999) for *Bothrops jararacussu* ($642.3 \pm 4.23 \times 10^9/L$) and *B. moojeni* ($543.1 \pm 9.2 \times 10^9/L$) and Trujillo et al. (2016) for *B. atrox* ($555.42 \pm 1.62 \times 10^3/\mu L$). Hemoglobin concentration was similar to that reported by Troiano et al. (1997) for *Crotalus durissus terrificus* (11.5 ± 4.3 g/dL) and Trujillo et al. (2016) for *B. atrox* (7.48 ± 1.1 g/dL). However, hematocrit values were higher than those reported in previous studies by Glaser et al. (2013) and Gomez et al. (2016) for *B. jararacussu* ($24.71 \pm 9.55\%$) and *Bothrops jararaca* ($23.12 \pm 5.99\%$), and *B. asper* ($22 \pm 7\%$) and *Crotalus simus* ($27 \pm 6\%$), respectively.

The number of total leukocytes was close to the values found for the *Crotalus durissus terrificus*, *B. ammodytoides*, and *B. leucurus* species (Troiano et al. 1997; 1999; Grego et al. 2006). However, it was higher than *B. jararacussu* and *B. moojeni*, (Troiano et al. 2000), and lower than *B. alternatus*, *B. neuwiedi diporus*, *B. asper*, and *C. simus* (Troiano et al. 2000; Gomez et al. 2016).

Heterophils were the most commonly found leukocyte cell type in this study, followed by lymphocytes, azurophils, monocytes, eosinophils, and basophils. However, lymphocytes were the predominant cell group in studies with the *C. durissus terrificus* ($56.25 \pm 12.25\%$), *B. ammodytoides* ($52.2 \pm 6.87\%$), *B. alternatus* ($51.4 \pm 6.75\%$), *B. jararacussu* ($50.6 \pm 3.27\%$), *B. moojeni* ($51.05 \pm 8.21\%$), *B. neuwiedi diporus* ($52 \pm 6.85\%$), *B. leucurus* ($4.35 \pm 2.58 \times 10^3/mm^3$ for females and $7.49 \pm 56 \times 10^3/mm^3$ for males), *B. asper* ($66 \pm 11\%$) and *C. simus* ($70 \pm 14\%$) species (Troiano et al. 1997; 1999; 2000; Gomez et al. 2016; Grego et al. 2006).

The second predominant cell type varied among studies. Azurophils followed lymphocytes for *C. durissus terrificus* ($18.05 \pm 3.5\%$) and *B. leucurus* ($1.57 \pm 1.28 \times 10^3/mm^3$ for females and $2.36 \pm 2.75 \times 10^3/mm^3$ for males) in the studies by Troiano et al. (2006). Eosinophils were the second predominant cell group for *B. ammodytoides* ($16.3 \pm 1.85\%$), *B. alternatus* ($15.2 \pm 2.01\%$), *B. jararacussu* ($16.5 \pm 0.95\%$), *B. moojeni* ($15.7 \pm 2.1\%$), and *B. neuwiedi diporus* ($14.95 \pm 3.01\%$) in the studies by Troiano et al. (1999; 2000). The study by Gomez et al. (2006) with *B. asper* ($25 \pm 11\%$) and *C. simus* ($14 \pm 7\%$) showed a prevalence of monocytes, but the second most predominant type were lymphocytes followed by azurophils.

Although basophils were not found, these cells have been reported in small numbers in other snake species. Studies have shown the presence of this cell type in *C. durissus terrificus* ($1.5 \pm 0.8\%$), *B. ammodytoides* ($1 \pm 0.3\%$), *B. alternatus* ($1 \pm 0.3\%$), *B.*

jararacussu ($0.5 \pm 0.2\%$), *B. moojeni* ($0.9 \pm 0.2\%$), *B. newiedi diporus* ($0.75 \pm 0.1\%$), *B. leucurus* ($0.49 \pm 0.63 \times 10^3/\text{mm}^3$ for females and $0.46 \pm 0.31 \times 10^3/\text{mm}^3$ for males), *B. asper* (3.4%), and *C. simus* ($1 \pm 1\%$) (Troiano et al. 1997; 1999; 2000; Grego et al. 2006; Gomez et al. 2016).

The study by Trujillo et al. (2016), also conducted with *B. atrox*, selected 24 adult snakes maintained in captivity at the Instituto Nacional de Salud (INS) and the Oswaldo Meneses Serpenterium (UNMSM) in Lima, Peru. Thirteen specimens were male and 11 were female. These samples were collected from November to December 2008 and packaged in sodium heparin bottles. The values found by Trujillo et al. (2016) in the erythrogram ($495.70 - 639.00$ $10^3/\text{ul}$ erythrocytes, $6.40 - 9.00$ g/dl hemoglobin, $18.14 - 25.00$ hematocrit) were similar to those of the present research. However, in the leukogram, the snakes from Peru had the lowest number of total leukocytes ($4.45 \times 10^3/\text{uL}$). Lymphocytes ($75.04 \pm 7.45\%$) were the predominant cell group of white cells found by Trujillo et al. (2016), followed by azurophils ($12.5 \pm 6.82\%$), heterophils ($5.63 \pm 3.82\%$), eosinophils ($2.96 \pm 1.99\%$), monocytes ($1.96 \pm 1.4\%$), and basophils ($1.63 \pm 1.5\%$), differing from the present study. These variations show the importance of performing reference parameters for the same species from other sites, especially for reptiles, which environmental factor is a strong determinant in their metabolism.

In Brazil, Kindlovits et al. (2017) investigated the cytochemical and morphological aspects of blood cells of snakes of the *Bothrops* and *Crotalus* genera. Blood was collected from 50 captive animals from Instituto Vital Brasil, and eight specimens of the *B. atrox* species showed parasites of the *Hepatozoon* genus, which did not occur in this study. Although *B. atrox* is present in Brazilian breeding centers and extensively used in research on the properties of its venom for the pharmaceutical industry (Sajevic et al. 2011; Jacob-Ferreira et al. 2017), there are few studies on hematological parameters that can inform the physiological state of this species (Troiano et al. 2000; Trujillo et al. 2016). Likewise the study by Trujillo et al. (2016) and the present one, eosinophils were found in the specimens of *B. atrox* in small quantities. There is great difficulty in establishing hematological parameters for reptiles because they are ectothermic animals and are influenced by intrinsic and environmental factors (Nardini et al. 2013).

Thus, it is important to characterize regional values and evaluate environmental and seasonal aspects, nutritional status, housing characteristics, age, and animal origin (Almosny 2014). Gomez et al. (2016) found a statistical difference in the number of heterophils in *B. asper* and eosinophils, lymphocytes, and monocytes in *C. simus*, between free-living and captive animals. The study by Troiano et al. (1997) with *C. durissus terrificus* did not show significant variations between male and female parameters, but there was an influence of seasonal variations, which were not evaluated in the present study.

CONCLUSIONS

There was no significant difference in hematological values between males and females of *Bothrops atrox*. Mean and standard deviation values for hematocrit ($33.6 \pm 5.47\%$), hemoglobin (10.81 ± 2.07 g/dL), the total number of erythrocytes ($0.59 \pm 0.1 \times 10^6/\text{mm}^3$), leukocytes ($11387.5 \pm 3279.2/\text{mm}^3$), and thrombocytes ($28175 \pm 6320/\text{mm}^3$) were determined, with results were close to those reported for

other Viperids species. However, the predominant leukocyte cell types differed from other studies, showing a higher number of heterophils ($45.5 \pm 13.72\%$), followed by lymphocytes ($38.63 \pm 8.39\%$), azurophils ($11.202 \pm 3.61\%$), monocytes ($4.89 \pm 2.68\%$), eosinophils ($1 \pm 1.02\%$), and basophils ($0 \pm 0\%$).

REFERENCES

- ALMOSNY, N.R.P.. 2014. Patologia Clínica em Vertebrados Exotérmicos. In: Z.S. CUBAS, J.C.R. SILVA and J.L. CATÃO-DIAS, eds. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*, São Paulo: Roca, pp. 1597-1623.
- ALMOSNY, N. R. P.; SANTOS, L. C. Laboratory in wild animals. 2000. In: FOWLER, M. Biology medicine and surgery of South American wild animals. Ames: Iowa State University, pp.300-320.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L. and SANTOS, A.A. *Bioestat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém: Ong Mamiraua, 2007. Bernarde, P.S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. *Gazeta Médica da Bahia*. 2011, 81(jan-jun), 60-69. <http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/view/1141/1076>
- CAMPBELL, T.W., 2014. Clinical Pathology. In: D.R. MADER and S.J. DIVERS, eds. *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery*, Missouri: Elsevier Saunders, pp.70-92. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0893-2.00008-9>
- CAMPBELL, T.W., 2015. Blood sample collection and preparation in reptiles. In: T.W. CAMPBELL, ed. *Exotic Animal Hematology and Cytology*. Iowa: Wiley Blackwell, pp.173-180. <https://doi.org/10.1002/9781118993705.ch10>
- COSTA, H.C. and BERNILS, R.S. Répteis do Brasil e suas unidades federativas: lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*. 2018, 7(1), 11-57. <http://public.sbherpetologia.org.br/assets/Documentos/2016/10/lista-de-repteis-2018-2.pdf>
- GILLET, A.K., FLINT, M., HULSE, L., HANGER, J. and MILLS, P.C. Haematological and biochemical reference intervals for three species of hydrophiine sea snakes (*Hydrophis curtus*, *H. elegans* and *H. peronii*) in Australia. *The Veterinary Journal*. 2015, 204 (3), 275-281. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.008>
- GLASER, V., BONL, A.P., PITZ, H.S., ALBUQUERQUE, C.A.C. and ZENI A.L.B. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Bothropoides jararaca* e *Bothrops jararacussu* (Ophidia-Viperidae) mantidas em cativeiro. *Archives of Veterinary Science*. 2013, 18(3), 68-74. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v18i3.30088>
- GOMEZ, A., ARROYO, C., ASTORGA, W., CHACÓN, D., RODRÍGUEZ, S. and JIMÉNEZ, M. Hematological and biochemical reference intervals for *Bothrops asper* and *Crotalus simus* (Serpentes: Viperidae), maintained in captivity for venom extraction. *Comparative Clinical Pathology*. 2016, 25(3), 615-623. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2240-2>
- GREGO, K.F., ALVES, J.A.S., RAMEH DE ALBUQUERQUE, L.C. and FERNANDES, W. Referências hematológicas para a jararaca de rabo branco (*Bothrops leucurus*) recém capturadas da natureza. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2006, 58(6), 1240-1243. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000600040>
- HARR, K.E., RASKIN, R.E. and HEARD, D.J. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from

- macaws and Burmese pythons. *Veterinary Clinical Pathology*. 2005, 34(4), 383-388. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00065.x>
- HAWKEY, C.M. and DENNET, T.B. *A colour atlas of comparative haematology*. Ipswich: Wolfe Medical, 1989.
- HEATLEY, J.J. and RUSSELL, K.E., 2019. Hematology. In: S.J. DIVERS, S.J. and S.J. STAHL, eds. *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*. Missouri: Elsevier, pp. 301-318.
- JACOB-FERREIRA, A.L., MENALDO, D.L., SARTIM, M.A., RIUL, T.B., DIAS-BARUFFI, M. and SAMPAIO, S.V. Antithrombotic activity of Batroxase, a metalloprotease from *Bothrops atrox* venom, in a model of venous thrombosis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 95(1), 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.063>
- KINDLOVITS, L.M., TEMOCHE, L.F.C., MACHADO, C. and ALMOSNY, N.R.P. Aspectos citoquímicos e morfológicos de elementos sanguíneos das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* mantidas em cativeiro no serpentário do Instituto Vital Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2017, 69(3), 667-675. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9072>
- NARDINI, G., LEOPARDI, S. and BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 2013, 16(1), 1-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2012.09.001>
- QUADRINI, A.E., GARCIA, V.C., FREIRE, B.C. and MARTINS, M.F.M. Haematological reference of snakes: amazon tree boa (*Corallus hortulanus*, Linnaeus, 1758) and Burmese Python (*Python bivittatus*, Kuhl, 1820) in captive. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2018, 70(4), 1172-1178. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9865>
- SAJEVIC, T., LEONARDI, A. & KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. 2011, 57(5), 627-645. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.006>
- TROIANO, J.C. Doenças dos répteis. São Paulo: MedVet, 2018.
- TROIANO, J.C., VIDAL, J.C., GOULD, J. and GOULD, E. Haematological reference intervals of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) in Captivity. *Comparative Haematology International*. 1997, 1(7), 109-112. <https://doi.org/10.1007/BF02652577>
- TROIANO, J.C., VIDAL, J.C., GOULD, E.F., MALINSKAS, G., GOULD, J. SCAGLIONE, M., SCAGLIONE, L., HEKER, J.J., SIMONCINI, C. and DINÁPOLIS, H. Haematological and blood chemical values from *Bothrops ammodytoides* (Ophidia–Crotalidae) in captivity. *Comparative Haematology International*. 1999, 9(1), 31-35. <https://doi.org/10.1007/BF02585519>
- TROIANO, J.C., VIDAL, J.C., GOULD, E.F., HEKER, J., GOULD, J., VOGT, A.U., SIMONCINI, C., AMANTINI, E. and DE ROODT, A. Hematological values of some *Bothrops* species (Ophidia - Crotalidae) in captivity. *The Journal Venomous Animals and Toxins*. 2000, 6(2), 1-8. <https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000200005>
- TRUJILLO, E., ELIAS, R., SILVA, W. and MONTES, D. Valores hematológicos de *Bothrops atrox* mantenidos en cautiverio en la ciudad de Lima. *Salud y tecnologia veterinaria*. 2016, 4(2), 44-52. <https://doi.org/10.20453/stv.v4i2.3246>
- WINTROBE, R. Variations in size and hemoglobin concentration of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologie*. 1933, 51, 32-49.

**CAPÍTULO 3 - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE *Bothrops atrox* DE
CATIVEIRO COM NEOPLASIA EM OVIDUTO (SQUAMATA: VIPERIDAE)**

Conforme a Norma Regulamentar 002/2015 do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, este capítulo foi formatado de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6021-2015 e NBR-6023-2018.

ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS DE *Bothrops atrox* (SQUAMATA: VIPERIDAE) DE CATIVEIRO COM NEOPLASIA EM OVIDUTO

HEMATOLOGICAL CHANGES OF *Bothrops atrox* (SQUAMATA: VIPERIDAE) FROM CAPTIVITY WITH OVIDUCT NEOPLASIA

RESUMO

A criação de serpentes do gênero *Bothrops*, com o objetivo de obter subprodutos farmacêuticos da peçonha, demanda métodos para garantir a saúde do plantel. Os dados do hemograma fornecem informações importantes sobre o estado de saúde geral dos animais e, nesse sentido, é válido correlacionar tais resultados a diferentes diagnósticos de enfermidades. Além disto, com o aumento de vida útil em cativeiro, os médicos veterinários se deparam mais frequentemente com casos de neoplasias em serpentes, sobretudo em sistema reprodutor das fêmeas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar possíveis alterações em valores hematológicos, em decorrência de neoplasia em oviduto de *Bothrops atrox* provenientes de criação comercial. Foram colhidas amostras de sangue de dez exemplares de *B. atrox*, bem como amostras de tecidos tumorais para avaliação histopatológica. Em *Bothrops atrox* com neoplasia benigna, observou-se linfopenia e trombocitopenia, e não foram visualizados eosinófilos. Também foram notadas as mesmas alterações nas duas serpentes que receberam o diagnóstico histopatológico de fibrosarcoma, além de apresentarem anemia.

Palavras-chaves: Squamata. Patologia Clínica. Hematologia. Réptil.

ABSTRACT

The breeding of *Bothrops* snakes, with the objective of obtaining pharmaceutical by-products from the venom, demands methods to guarantee the health of the herd. The blood count data provide important information about the general health status of the animals and, in this sense, it is valid to correlate such results with different diagnoses of diseases. In addition, with the increase in lifespan in captivity, veterinarians are more often faced with cases of neoplasms in snakes, especially in the female reproductive system. The aim of this research was to evaluate possible alterations in hematological values, due to neoplasia in the *Bothrops atrox* oviduct from commercial breeding. Blood samples were

collected from ten specimens of *B. Atrox*, as well as tumor tissue samples for histopathological evaluation. In *Bothrops atrox* with benign neoplasia, lymphopenia and thrombocytopenia were observed, and eosinophils were not visualized. The same changes were also observed in the two snakes that received the histopathological diagnosis of fibrosarcoma.

Keywords: Squamate. Clinical pathology. Hematology. Reptile.

INTRODUÇÃO

A medicina veterinária de animais silvestres está em constante busca por novos conhecimentos visando constante aperfeiçoamento na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças. Nesse contexto, as serpentes do gênero *Bohtrops* são criadas e mantidas em sistema intensivo, pois a peçonha desses répteis pode fornecer ingredientes ativos para fabricação de medicamentos empregados principalmente no tratamento de distúrbios cardiovasculares (SAJEVIC et al., 2011; JACOB-FERREIRA et al., 2017; PEREIRA et al., 2017).

Melgarejo-Giménez (2002) afirma que a correta manutenção de serpentes peçonhentas em cativeiro requer uma estrutura especializada, com equipe multiprofissional altamente qualificada e programas permanentes de vigilância, revisão e aperfeiçoamento nos procedimentos de manejo. A espécie *Bothrops atrox* (LINNAEUS, 1758), conhecida popularmente como jararaca-do-norte, é criada em cativeiro para extração de peçonha. Essa espécie pertence à classe Reptilia, ordem Squamata, subordem Ophidia, família Viperidae e subfamília Crotalinae (BERNARDE, 2011; COSTA & BÉRNILS, 2018).

Casos de prolapso em serpentes, sobretudo fêmeas, não são raros e podem estar relacionados com alguma enfermidade nos ovidutos, inclusive de origem neoplásica. Um dos fatores que pode predispor tal ocorrência em exemplares de cativeiro é o espaço do recinto não ser suficiente para o animal se esticar completamente para defecar e expulsar ovos ou filhotes com maior facilidade, além de possíveis fatores genéticos que podem aumentar a ocorrência em algumas espécies (PEREIRA et al., 2017).

Os casos de neoplasias em répteis são descritos e há um aumento de relatos associados a óbitos em coleções de zoológicos. Os órgãos mais relatados por esse tipo de acometimento na literatura são a pele, o fígado, o sistema musculoesquelético e o

hematopoiético. Algumas das neoplasias em répteis são associadas à presença de vírus, como o caso de herpesvírus, papilomavírus e poxvírus. Para um diagnóstico preciso da neoplasia em serpentes, sugere-se uma avaliação física e laboratorial completa do animal acometido (TROIANO, 2018).

Os dados obtidos através da análise do hemograma permitem uma maior clareza quanto ao diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. Eles podem apresentar alterações que auxiliam na avaliação nos casos de anemias, doenças inflamatórias, neoplasias, parasitemia, distúrbios hematopoiéticos, alterações hemostáticas e toxicológicas, como inclusões bacterianas e virais (NARDINI et al., 2013; CAMPBELL, 2014).

A colheita de sangue em serpentes pode ser realizada com eficiência na veia ventral caudal, bem como no seio venoso vertebral, mas deve-se ter cuidado com a possibilidade de contaminação da amostra por linfa (GILLETT et al., 2015), que dilui o conteúdo, deixando-o mais claro e alterando os resultados encontrados. O recomendado para colheita com segurança à saúde do animal é de até 10% do volume total de sangue (TROIANO et al., 2000).

O objetivo desta pesquisa foi avaliar as possíveis alterações nos valores hematológicos em *Bothrops atrox* provenientes de criação comercial, com diagnóstico de neoplasia em oviduto.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram colhidas de animais do criatório comercial Pentapharm do Brasil, Uberlândia, Minas Gerais, com número de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) 4.644.776. Essa pesquisa foi realizada mediante autorizações do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), número 69416-1 e Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Uberlândia, 040/19, bem como registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), AF8A99F.

Foram utilizadas dez serpentes fêmeas de *Bothrops atrox*, todas nascidas em cativeiro, com seis anos de idade, que haviam sido avaliadas pela equipe de profissionais que cuidam dos animais, tendo a médica veterinária constatado a presença de massa na

cavidade celomática à palpação. Os répteis foram encaminhados para procedimento cirúrgico para exérese dos tumores de oviduto, com posterior avaliação histopatológica. Fragmentos de aproximadamente 1,5cm³ das massas tumorais foram armazenados em potes plásticos com solução de formaldeído 10% (TROIANO, 2018).

Foram colhidas amostras de sangue para análise hematológica antes do procedimento cirúrgico. As dez serpentes apresentavam escore corporal satisfatório e eram mantidas em viveiros. Todas as serpentes são marcadas com microchip e monitoradas individualmente. O ambiente tinha temperatura e umidade controladas, entre 25 a 30°C e 60 a 80%, respectivamente, e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os animais eram alimentados com camundongos a cada 21 dias, e tinham disponibilidade de água *ad libitum*.

As colheitas de sangue foram realizadas no mês de março de 2019. As serpentes foram contidas fisicamente utilizando gancho e tubo plástico transparente, para evitar o contato direto do manipulador com a cabeça do animal. Foram colhidas amostras de aproximadamente 0,5 mL de sangue, puncionado na veia caudal ventral, com seringas descartáveis de 3 mL e agulha hipodérmica descartáveis de 13 x 0,3 mm, que foram acondicionadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (TROIANO et al., 2018). No momento da obtenção das amostras de sangue também foram confeccionados esfregaços sanguíneos sem anticoagulante e as amostras foram processadas no mesmo dia da colheita. Como parâmetros de referência foi utilizado os resultados previamente publicados para fêmeas da espécie *Bothrops atrox* por Pereira et al. (2022).

O hematócrito foi determinado por meio de centrifuga de microhematócrito. A dosagem de hemoglobina foi feita pelo método de cianeto de hemoglobina (HiCN) no analisador bioquímico semiautomático modelo BIO-200®. O kit de hemoglobina e o padrão utilizados foram da Labtest Diagnóstica® e a metodologia foi realizada conforme instruções de uso do fabricante.

Para a determinação do número total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foi realizada a diluição de 1:100 (10 µL de sangue para 1 mL da solução de Natt-Herrick), com contagem citológica em câmara de Neubauer espelhada, em microscópio com aumento de 400x. Foram obtidos os números totais de eritrócitos, leucócitos e trombócitos dos 25 quadrantes centrais e multiplicou-se o valor encontrado pelo fator 1000. A fórmula para obtenção do fator é: % contada (1/1) x diluição (1:100) x constante

(10) (ALMOSNY et al., 2014). Os índices hematimétricos foram calculados de acordo com as fórmulas originais do Wintrobe (1933).

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada nos esfregaços de sangue corados com Panótico Rápido[®], visualizados em microscópio óptico para observação em aumento de 1000x, com óleo de imersão. Foram contadas 100 células no total, determinando a porcentagem de cada uma (valor relativo), para posterior determinação do valor absoluto de cada. Devido à variabilidade existente na nomenclatura, foi empregada a proposta por Hawkey & Dennet (1989). Assim, os tipos de leucócitos foram descritos como células mononucleares (linfócitos, monócitos e azurófilos) ou como granulócitos (heterófilos, basófilos e eosinófilos).

O material para análise histopatológica foi colhido dias após a colheita de sangue, e cortado em fragmentos de aproximadamente 1 x 1 cm, e abrigado em cassetes histológicos. Para o processamento, o material passou por uma bateria gradual de álcool e xilol, e então foi incluído em parafina líquida. Foram realizados cortes histológicos a 5µm e o material foi corado em Hematoxilina e Eosina. Por fim, a lâmina foi montada com uma lamínula para a leitura em microscopia óptica em microscópio Opticam[®] 0300s (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

Os resultados do hemograma das serpentes foram tabelados em planilhas do Microsoft Excel 365 para avaliação estatística da frequência de alterações presentes, conforme referência previamente publicada para a espécie (PEREIRA et al., 2022).

RESULTADOS

Das dez serpentes, em oito foi constatada neoplasia benigna em oviduto, com diagnóstico de fibroma (Figuras 1A e 2) e nas outras duas fêmeas, foi diagnosticado fibrossarcoma (Figuras 1B e 3), também em oviduto. Os valores de resultados de hemograma de *B. atrox*, estão representados na Tabela 1.

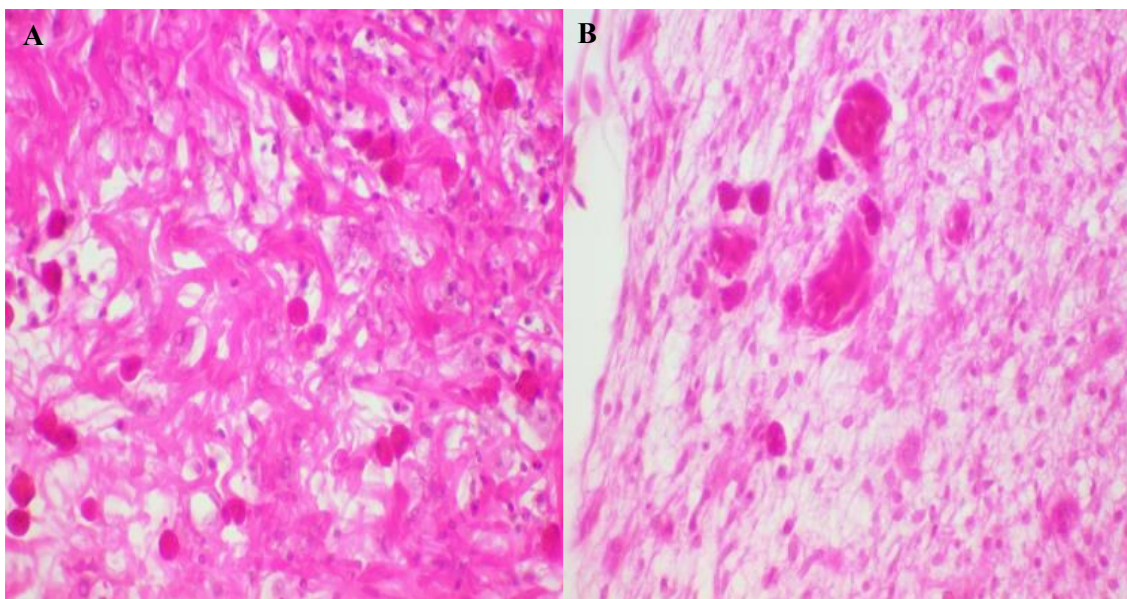


Figura 1. Imagem histológica de fibroma (A), aumento de 40 X, e fibrossarcoma (B) em oviduto de *Bothrops atrox* de cativo, aumento de 20 X. (Fonte: Autora).



Figura 2. Imagem de massa neoplásica: fibroma (Fonte: Autora).

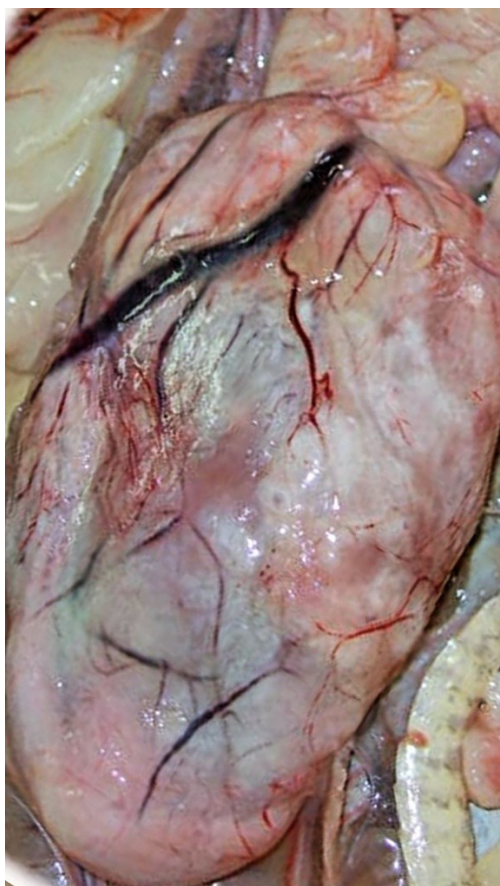


Figura 3. Imagem de massa neoplásica: fibrossarcoma (Fonte: Autora).

Tabela 1. Resultados de hemograma de *B. atrox* com fibroma (1 a 8) e fibrossarcoma (9 e 10)

	FIBROMA								FIBROSSARCOMA		REFERÊNCIA¹
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
He (milhões/mm³)	0,82	0,44	0,84	1,49	0,37	0,63	0,55	0,28	0,26	0,31	0,37-0,69
Hb (g/dL)	11,6	7,4	12,2	18,8	7,3	9,4	7,5	5,5	5,2	4,3	7,4-12,4
HCT (%)	35	22	37	56	22	28	25	16	17	14	22-38
VCM (fL)	427	500	440	376	595	444	455	571	654	452	549-595
HCM (pg)	141,5	168,2	145,2	126,2	197,3	149,2	136,4	196,4	200	138,7	167,2-200
CHCM (%)	33,1	33,6	33	33,6	33,2	33,6	30	34,4	30,6	30,7	29,5-33,6
LEUCOGRAMA (/mm³)											
Leucócitos	6500	18500	7000	14000	7500	5000	2300	7500	9500	8000	6750-17750
Heterófilos	2990	10730	3640	5180	5250	3100	1426	4500	6080	3520	1980-5390
Eosinófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0-285
Basófilos	0	0	0	0	0	200	46	225	0	0	0-0
Azurófilos	1820	3515	1330	2940	450	400	92	525	570	2240	666-2280
Monócitos	130	1295	210	140	750	300	184	525	760	480	180-630
Linfócitos	1560	2960	1820	5740	1050	950	552	1725	1900	1760	2640-6840
Trombócitosx10³	10700	8500	10500	21500	8000	9000	7000	9000	10500	5000	16000-360000
CITOLOGIA	HT; TA	TA; HePN	-	HD; HePN; TA	-	-	-	-	-	HePN; HD; TA	-

¹Fonte: Pereira et al. (2022).

Legenda: -: Sem dados; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; Hb: Hemoglobina; HCM: Hemoglobina corpuscular média; HCT: Hematócrito; HD: heterófilos degranulados; He: Hemácias; HePN: Hemácias com pleomorfismo nuclear; HT: Heterófilos tóxicos; TA: Trombócitos ativados; VCM: Volume corpuscular médio.

DISCUSSÃO

As condições de temperatura ambiente que as serpentes são abrigadas, bem como para o armazenamento dos frascos contendo as amostras de sangue, pode influenciar nos resultados obtidos, sendo indicado manter os recintos em temperatura de 20 a 32 °C. Ao colher as amostras sanguíneas, essas devem ser armazenadas em tubos com anticoagulantes a 4 °C (TROIANO, 2018). No criatório comercial aonde se procedeu as colheitas de sangue, há monitoramento de temperatura nas salas de criação, sendo a temperatura controlada entre 25 e 30 °C, tendo aquecedores automáticos, caso esta temperatura mínima abaixe do limite descrito. As amostras foram colhidas e armazenadas a 4 °C e processadas no mesmo dia para evitar erros pré-analíticos.

Os anticoagulantes mais usados no processamento sanguíneo de animais são a heparina de lítio e o ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA). O primeiro é o de eleição para algumas espécies de répteis, devido à hemólise observada com o emprego do EDTA em testudines. Quanto à heparina, ela pode promover agregação de leucócitos e trombócitos, com coloração azulada no esfregaço. Desse modo, sempre que possível, recomenda-se a realização de esfregaços sanguíneos sem anticoagulante (HARR et al., 2005; NARDINI et al., 2013; CAMPBELL, 2015). Isto foi realizado para as dez amostras colhidas, procedendo os esfregaços sanguíneos antes de conservar as amostras sanguíneas em tubos com EDTA, sem observação de hemólise com o emprego desse anticoagulante.

As células sanguíneas encontradas em serpentes incluem eritrócitos nucleados e leucócitos que se dividem nas categorias: heterófilos, eosinófilos, basófilos, e eosinófilos, como granulócitos e monócitos, linfócitos, trombócitos e azurófilos, como mononucleares (GLASER, et al., 2013; CAMPBELL, 2014; HEATLEY & RUSSEL, 2019).

O interesse pela criação de serpentes em cativeiro tem aumentado mundialmente, e na literatura há poucas informações sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e clínicos da espécie *B. atrox*, e a caracterização de tais dados é importante na avaliação da saúde do plantel (TROIANO, 2018). Assim como há escassez de dados provenientes de serpentes saudáveis, entender a relação entre neoplasias e alteração de parâmetros sanguíneos é um desafio e tem suma importância aos médicos veterinários que trabalham com estes animais. Recentes pesquisas tem mostrado o potencial da peçonha botrópica para tratamento de algumas doenças, incluindo a leishmaniose e a inibição do

vírus causador da pandemia covid-19, SARS-COV-2 (CASTILHOS et. Al., 2011; GOUDA & MÉGARBANE, 2021).

As causas de anemia em serpentes são semelhantes às de mamíferos, aves, e outros répteis, com marcadores de regeneração caracterizados pela presença de pontilhado citoplasmático basofílico, policromasia, binucleação, aumento de anisocitose e de precursores eritroides (HEATLEY & RUSSEL, 2019). Alguns exemplos de hemoparasitoses em serpentes são as dos gêneros *Haemogregarina*, *Hepatozoon* e *Serpentoplasma* (NARDINI et al., 2013). Que nem sempre estão associadas à anemia, podendo manifestar esta sintomatologia apenas quando a presença destes parasitos no sangue é muito acentuada. Nas amostras de *Bothrops atrox* não foram identificados hemoparasitas, porém observou-se anemia em uma amostra de serpente com fibroma e nas duas amostras de animais com fibrossarcoma (PEREIRA et al., 2022). Durante o procedimento cirúrgico para colheita das amostras, notou-se intensa vascularização nas duas massas identificadas posteriormente como fibrossarcoma.

Em animais com eritrócitos nucleados, como anfíbios, peixes, aves e répteis, estas células enquanto jovens, são menores do que os eritrócitos já maduros, o que caracteriza a microcitose como anemia regenerativa para estes grupos de animais. Nas *Bothrops atrox* avaliadas, em uma delas ocorreu anemia regenerativa, já em outra amostra, houve macrocitose, o que se relaciona a provável alteração hidroeletrolítica (ALMOSNY, 2014).

Notou-se eritrocitose em três das amostras de *Bothrops atrox* com neoplasia benigna, porém quando se comparado ao padrão estabelecido para machos da mesma espécie no mesmo estudo de Pereira, et al. (2022) esta eritrocitose persiste em apenas duas serpentes e quando comparado com os parâmetros verificados por Trulijo et al. (2016), apenas uma das fêmeas continua com o número de hemácias acima do valor máximo verificado. Não há relatos clínicos de associação de neoplasia com eritrocitose na literatura para esta espécie.

Segundo Heatley & Russel (2019), os eosinófilos são raros ou ausentes na maioria das serpentes e sua presença é controversa, porém há descrição em trabalhos recentes como o de Klindovits et al. (2017) com o gênero *Bothrops* (*B. atrox* e *B. jararacussu*) e *Corallus hortulanus*. A presença deste tipo de leucócitos vem associada à presença de infecções por parasitas, já que sua função relaciona-se com fagocitose de

imunocomplexos. Não foram visualizados eosinófilos em serpentes com neoplasia no presente estudo.

Em serpentes, o aumento de azurófilos tem sido associado a casos agudos de inflamações e doenças infecciosas (GOMEZ, et al., 2016; HEATLEY & RUSSEL, 2019). Neste estudo, ao avaliar as amostras sanguíneas das *Bothrops atrox* com neoplasia benigna e maligna, na maioria encontrou-se valores dentro dos parâmetros para a espécie (PEREIRA et al., 2022).

Os trombócitos estão associados ao sistema hemostático e, segundo alguns autores, podem também ter capacidade de fagocitar bactérias (GREGO, et al., 2006; TROIANO, 2018). Para *Bothrops atrox* com neoplasia benigna e maligna, foi notado valor menor, tanto para referência mínima quanto máxima, em comparação às serpentes saudáveis. Apenas uma das amostras se manteve dentro dos parâmetros. Esse achado pode indicar que o fibroma está associado a uma trombocitopenia nesta espécie (PEREIRA et al., 2022).

Observou-se uma linfopenia nas *Bothrops atrox* com neoplasia benigna, assim como também foi identificado um valor mínimo e máximo abaixo do padrão de referência para a espécie de *Bothrops* nos dois exemplares que apresentaram fibrossarcoma, sendo indicativo de *B. atrox* com tais neoplasias terem os valores de linfócitos reduzidos na análise hematológica da série branca. Sabe-se que os linfócitos em maior ou menor número, associam-se a processos inflamatórios, cicatriciais, doenças virais e parasitárias, quando estão reduzidos associa-se à desnutrição ou imunossupressão (TROIANO, 2018).

O número total de leucócitos esteve abaixo dos parâmetros definidos para a espécie em três das amostras de serpentes com neoplasia benigna, e em apenas uma amostra houve leucocitose. Os heterófilos são associados à infecções bacterianas, leucemias mieloides e algumas neoplasias. Houve variação dos valores dos heterófilos para acima dos parâmetros descritos em duas das amostras, e em uma delas ocorreu heteropenia, quando comparada a valores em serpentes saudáveis (PEREIRA et al., 2022).

A basofilia está presente em infecções virais ou parasitárias e a monocitose associa-se a diversas doenças crônicas, neoplasias, doenças inflamatórias, sobretudo as granulomatosas (TROIANO, 2018). Neste estudo verificou-se basofilia em três das amostras de serpentes com neoplasia benigna, e ocorreu monocitose em três amostras e

monocitopenia em duas delas, demonstrando falta de padrão na alteração destes leucócitos em caso de fibroma e fibrossarcoma (PEREIRA et al., 2022).

Os casos de neoplasias em serpentes, muitas vezes são subdiagnosticados, por isto os dados sobre prevalência e incidência são escassos, e torna-se cada vez mais necessário o incentivo de pesquisas na área, uma vez que tais afecções, sobretudo do tipo malignas, podem reduzir o tempo de vida em cativeiro. Há relatos sobre hamangiossarcoma, carcinoma, lipoma, fibroma, fibrossarcoma, entre outros, em variadas espécies de serpentes (BRAZ, 2018).

Foi diagnosticado fibrossarcoma na cavidade oral em dois espécimes de *Bothrops moojeni*, com quatro anos de idade, de cativeiro, com recidiva após a exérese. Histologicamente, as duas amostras consistiam massa altamente celular, composta por células anaplásicas fusiformes organizadas em feixes entrelaçados e distribuídos por toda extensão tecidual e, ocasionalmente, células poligonais arranjadas em fascículos irregulares (SANTOS et al., 2015).

Outro relato, também em *Bothrops moojeni* de cativeiro, se tratando de cinco serpentes, com idade superior a onze anos, foram diagnosticadas pela análise citológica e histopatológica, com lipoma. Lipoma é a neoplasia benigna mais frequente de origem mesenquimal observada em humanos e em cães, enquanto em outras espécies é relativamente raro, talvez pela falta de registros e divulgação (CASSALI et al., 2004).

Uma das dificuldades em se estabelecer parâmetros hematológicos para répteis é que condições de temperatura ambiental pode influenciar e alterar os valores hematológicos encontrados nas amostras (NARDINI et al., 2013). Por isto, é importante a caracterização de valores regionais e a avaliação de aspectos ambientais, sazonais, o estado nutricional, manejo, idade e origem do animal durante a avaliação (ALMOSNY, 2014). Em qualquer alteração no estado de saúde das serpentes de criação, faz-se necessário analisar também estes parâmetros, e entender quais as modificações hematológicas são notadas nas diferentes doenças, inclusive as neoplásicas, que se tornam mais comuns, devido ao aumento da longevidade das serpentes de cativeiro.

CONCLUSÕES

Foram encontradas alterações em algumas células sanguíneas para *Bothrops atrox* com fibroma ou fibrossarcoma, quando comparadas aos parâmetros para serpentes

saudáveis da mesma espécie, alojadas no mesmo criatório comercial. Nestes animais, observou-se linfopenia e trombocitopenia na maioria das amostras, e não foram visualizados eosinófilos. Três, das 10 serpentes apresentaram anemia e em três foram encontradas basofilia.

Pode-se sugerir que nas fêmeas de *B.atrox* alterações hematológicas observadas como linfopenia e trombocitopenia, devem ser um sinal de alerta para possível presença de neoplasia na região dos ovidutos.

Se torna fundamental fazer análise hematológica em serpentes *B.atrox* saudáveis, bem como associar a avaliação do exame de hemograma em animais que apresentem qualquer alteração de saúde nesta espécie de serpente, incluindo casos neoplásicos, contribuindo para a avaliação profilática em *Bothrops atrox* de criação comercial.

REFERÊNCIAS

- ALMOSNY, N.R.P. Patologia Clínica em Vertebrados Ectotérmicos. In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R. & CATÃO-DIAS J.L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Brasil. Roca. Cap. 84, 2014. p.1597-1623.
- BERNARDE, P.S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gazeta Médica da Bahia**, v.81, p.60-69. 2011.
- BRAZ, V. E. D. **Ocorrência de neoplasias em animais selvagens no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia**. 27f. Trabalho de conclusão de curso em medicina veterinária – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais. 2018.
- CAMPBELL, T.W. Clinical Pathology. In: Mader, D.R. & Divers, S.J. **Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery**. 1 ed. Missouri: USA. Elsevier Saunders. 2014. p. 70-92.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0893-2.00008-9>
- CAMPBELL, T.W. (2015). Blood Sample Collection and Preparation in Reptiles. In: CAMPBELL, T.W. **Exotic Animal Hematology and Cytology**. Iowa: USA. 4 ed. Wiley Blackwell. 10, 2015, p.173-180.
<https://doi.org/10.1002/9781118993705.ch10>
- CASSALI, G. D., AMARAL, V. F., SILVA, A. E., MACRI, I., MACIEL, R. Cytological and histopathological aspects of lipomas in *Bothrops moojeni*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.6, p.799-801, 2004.
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000600017>
- CASTILHOS P., PEREIRA C. G., SILVA A. L. N., NAPOLITANO D. R., OLIVEIRA F., SOUZA M. A. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. V. 17, n. 2. 2011. p. 150-158.
<https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000200005>

COSTA, H.C & BÉRNILS, R.S. Répteis do Brasil e suas unidades federativas: lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**. V.7 n. 1. 2018. p.11-57.

GILLET, A.K., FLINT, M., HULSE, L., HANGER, J. & MILLS, P.C. Haematological and biochemical reference intervals for three species of hydrophiine sea snakes (*Hydrophis curtus*, *H. elegans* and *H. peronii*) in Australia. **The Veterinary Journal**. V. 204, n.3, p. 275-281. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.008>

GLASER, V. BONL, A.P., PITZ, H.S., ALBUQUERQUE, C.A.C. & ZENI A.L.B. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Bothropoides jararaca* e *Bothrops jararacussu* (Ophidia-Viperidae) mantidas em cativeiro. **Archives of Veterinary Science**. V.18 , n.3, p.68-74.2013.

<https://doi.org/10.5380/avs.v18i3.30088>

GOMEZ, A., ARROYO, C., ASTORGA, W., CHACÓN, D., RODRÍGUEZ, S. & JIMÉNEZ, M. Hematological and biochemical reference intervals for *Bothrops asper* and *Crotalus simus* (Serpentes: Viperidae), maintained in captivity for venom extraction.

Comparative Clinical Pathology. V.25, n.3, p.615-623. 2016.

<https://doi.org/10.1007/s00580-016-2240-2>

GOUDA AS, MÉGARBANE B. Snake venom-derived bradykinin-potentiating peptides: A promising therapy for COVID-19? **Drug Dev Res**. V. 82, p.38–48. 2021.

<https://doi.org/10.1002/ddr.21732>

GREGO, K.F., ALVES, J.A.S., RAMEH DE ALBUQUERQUE, L.C. & FERNANDES, W. Referências hematológicas para a jararaca de rabo branco (*Bothrops leucurus*) recém capturadas da natureza. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.58, n.6, p.1240-1243. 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000600040>

HARR, K.E., RASKIN, R.E. & HEARD, D.J. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. **Veterinary Clinical Pathology**. V.34, n.4, p. 383-388. 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00065.x>

HAWKEY, C.M. & DENNET, T.B. A colour atlas of comparative haematology. Ipswich: **Wolfe Medical**. 1989. 192 p.

HEATLEY, J.J. & RUSSELL, K.E. Hematology. In: DIVERS, S.J. & STAHL, S.J. **Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery**. Missouri: USA. 3 ed. Elsevier. cap. 33, 2019. p. 301-318.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48253-0.00033-7>

JACOB-FERREIRA, A.L., MENALDO, D.L., SARTIM, M.A., RIUL, T.B., DIAS-BARUFFI, M. & SAMPAIO, S.V. Antithrombotic activity of Batroxase, a metalloprotease from *Bothrops atrox* venom, in a model of venous thrombosis. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 95, n.1, p. 263-267. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.063>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2017. 568p.

KINDLOVITS, L.M., TEMOCHE, L.F.C., MACHADO, C. & ALMOSNY, N.R.P. Aspectos citoquímicos e morfológicos de elementos sanguíneos das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* mantidas em cativeiro no serpentário do Instituto Vital Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.69, n.3, p. 667-675. 2017.

<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9072>

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Criação e manejo de serpentes. IN: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.

NARDINI, G., LEOPARDI, S. & BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**. V.16, n.1, p. 1-30. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.09.001>

PEREIRA, H. C., GOMES, D. O., HIRANO, L. Q. L., SANTOS, A. L. Q., LIMA, A. M. C. Aerobic bacteria in oral cavity of Lancehead snakes (*Bothrops atrox*) with stomatitis **Acta Scientiarum**. Biological Sciences Maringá, v. 39, n. 3, p. 331-334, 2017.

<https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v39i3.34625>

PEREIRA, H.C., TELLE, L. P. J. D.; HIRANO, L. Q. L.; RIOS, M. P.; SANTOS, A. L. Q. Hematologic parameters of captive *Bothrops atrox* (Squamata: viperidae). **Bioscience Journal [online]**, v.38, pp. e38089. 2022 DOI 10.14393/BJ-v38n0a2022-62653. Available from: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/62653>.

<https://doi.org/10.14393/BJ-v38n0a2022-62653>

QUADRINI, A.E., GARCIA, V.C., FREIRE, B.C. & MARTINS, M.F.M. Haematological reference of snakes: amazon tree boa (*Corallus hortulanus*, Linnaeus, 1758) and Burmese Python (*Python bivittatus*, Kuhl, 1820) in captive. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 70, n.4, p.1172-1178. 2018.

<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9865>

SAJEVIC, T., LEONARDI, A. & KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**. V.57, n.5, p. 627-645. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.006>

SANTOS, E. D., FILHO, J. R., MACHADO, T. P., DAU, S. L., RODRIGUEZ, R., DA MOTTA, A. C. Oral fibrosarcoma in jararaca (*Bothrops pubescens*): anatomopathological and immunohistochemical aspects. **Pesq. Vet. Bras**. v. 35, n. 7, p. 664 – 670, 2015.

<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000700011>

TROIANO, J.C. **Doenças dos répteis**. São Paulo: MedVet. 2018. 300p.

TROIANO, J.C., VIDAL, J.C., GOULD, E.F., HEKER, J., GOULD, J., VOGT, A.U., SIMONCINI, C., AMANTINI, E. & DE ROODT, A. Hematological values of some *Bothrops* species (Ophidia - Crotalidae) in captivity. **The Journal Venomous Animals and Toxins**. V.6, n.2, p.1-8. 2000.

<https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000200005>

TRUJILLO, E., ELIAS, R., SILVA, W. & MONTES, D. Valores hematológicos de *Bothrops atrox* mantenidos en cautiverio en la ciudad de Lima. **Salud y tecnología veterinaria**. V.4, n.2, p.44-52. 2016.

<https://doi.org/10.20453/stv.v4i2.3246>

WINTROBE, R. Variations in size and hemoglobin concentration of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologie**. Teil 51, 1933. p.32-49.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 1. Valores médios de referência de hemograma publicados para o gênero *Bothrops*

	<i>B. asper</i> (n=32)	<i>B. alternatus</i> (n = 50)	<i>B. jararacuçu</i> (n = 50)	<i>B. moojeni</i> (n = 50)	<i>B. neuwiedi</i> (n = 50)	<i>B. leucurus</i> (n=29)	<i>B. ammodytoides</i> (n = 50)
Hemácias (10 ³ /mm ³)	640	660	642,3	543,1	667,3	402	489,4
Hemoglobina (g/dL)	6	10,01	12,13	11,88	12,16	6,73	8,2
Hematócrito (%)	22	20,85	21,89	22,38	22,78	22	19,11
VCM (fL)	-	315,9	340,88	412,07	341,37	615,27	391
CHCM (%)	-	48,09	55,38	53,08	53,38	29,73	43,22
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	31	12,05	10,64	10,06	13,52	7,26	9,42
Linfócitos (%)	66	51,4	50,6	51,05	52	59,9	52,2
Monócitos (%)	25	10,3	11,2	10,85	11,9	0	8,2
Azurófilos (%)	0	9,8	8,5	8,6	9,25	21,6	9,8
Heterófilos (%)	4	12	13,1	12,8	11,85	7,71	12,2
Eosinófilos (%)	3	15,2	16,5	15,7	14,95	0	16,3
Basófilos (%)	3	1,3	0,5	0,9	0,75	6,75	1
Trombócitos (10 ³ /mm ³)	10	5,68	5,2	4,91	6,14	8,17	4,6
Referência	Gómez et al. (2016)	Troiano et al. (2000)	Troiano et al. (2000)	Troiano et al. (2000)	Troiano et al. (2000)	Grego et al. (2006)	Troiano et al. (1999)

-: Valores não citados; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; n: número amostral; VCM: Volume corpuscular médio.

ANEXO 2



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 69416-1	Data da Emissão: 28/11/2019 12:27:35	Data da Revalidação*: 28/11/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: HELOISA CASTRO PEREIRA	CPF: 370.225.978-39
Título do Projeto: Pesquisa viral e avaliação hematológica, bioquímica e histopatológica em Jaraná-do-norte Bothrops atrox.	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.648.387/0001-18

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Preparação e Qualificação. Apresentação da tese de doutorado	11/2021	04/2022
2	Processamento e análise de dados	04/2020	01/2021
3	Colheita de material: sangue e fragmentos para análise histopatológica	01/2020	12/2020
4	Revisão de literatura	09/2019	01/2020
5	Redação da tese: resultados, discussão e conclusões	01/2021	11/2021

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	ANA CAROLINA GOMES JARDIM	Professora coordenadora do laboratório de Virologia UFU	221.474.668-40	Brasileira
2	Giulia Magalhães Ferreira	Aluna de pós graduação responsável pela pesquisa viral	441.818.868-16	Brasileira
3	Maisa Paschoal Rios	Médica Veterinária patologista clínica - hematologia	026.683.021-88	Brasileira
4	PAULO VINICIUS ROCHA PEREIRA	Responsável por executar a análise bioquímica do sangue	074.050.556-48	Brasileira
5	VICTORIA RIQUENA GROSCHKE	Auxílio na pesquisa viral das amostras	406.512.258-92	Brasileira
6	André Luiz Quagliatto Santos	Orientador da pesquisa de Doutorado	028.478.228-95	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0694160120191128

Página 1/4

ANEXO 3



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –




CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Pesquisa viral e avaliação hematológica, bioquímica e histopatológica em Jararaca-do-norte *Bothrops atrox*.", protocolo nº 040/19, sob a responsabilidade de **Heloísa Castro Pereira** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **06 de Setembro de 2019**.

(We certify that the project entitled "Pesquisa viral e avaliação hematológica, bioquímica e histopatológica em Jararaca-do-norte *Bothrops atrox*.", protocol 040/19, under the responsibility of **Heloísa Castro Pereira** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 06th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 15/09/2019 Término: 01/08/2022
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Réptil
Número de animais	50
Peso / Idade	1,5kg/ 5 anos
Sexo	Macho e Fêmea
Origem / Local	Criatório Comercial Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação LTDA (grupo DSM)
Local onde serão mantidos os animais:	Criatório Comercial Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação LTDA (grupo DSM)

Uberlândia, 09 de Setembro de 2019.


Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU
Coordenador da CEUA
Portaria Nº 542 DE 10 DE MAIO DE 2019

ANEXO 4



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AF8A99F

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	AF8A99F
Usuário:	Heloisa
CPF/CNPJ:	370.225.978-39
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Bothrops atrox

Título da Atividade: **Pesquisa viral e avaliação hematológica, bioquímica e histopatológica em Jararaca-do-norte Bothrops atrox.**

Equipe

Heloisa	UFU
André Luiz Quagliatto Santos	UFU
Giulia Magalhães Ferreira	UFU
Victória Riquena Grosche	UFU
Ana Carolina Gomes Jardim	UFU
Maisa Paschoal Rios	Autônoma -parceira UFU
Paulo Vinicius Rocha Pereira	Autônomo - parceiro UFU
Líria Queiroz Luz Hirano	Universidade de Brasília
Leticia Prata Juliano Dimatteu Telles	Universidade de Brasília
Jéssica Santos Queiroz	Universidade Federal de Uberlândia

Parceiras Nacionais

25.648.387/0001-18 / Fundação Universidade Federal de Uberlândia

Parceiras no Exterior

Universidade de Nottingham

Data do Cadastro: **08/01/2020 08:58:50**

Situação do Cadastro: **Concluído**

ANEXO 5

Normas de submissão – Bioscience Journal

<https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions>

Bioscience Journal

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

- Submissions must be made through the link below, and only submissions that are strictly within the Bioscience Journal's standards will be considered for evaluation:

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions>
- The text is justified, typed in Calibri font, size 12, with a 1.0 line spacing and a margin of 2.54 cm.
- Both the citation in the text and in the "References" item follow the ISO 690:2010(E) style adapted.
- Where appropriate, URL/doi for the references are provided.
- All mandatory documents were prepared in accordance with the Author Guidelines available below.
- Figures and tables must be saved and submitted as their own files separate from the main document.
- After review process, a publication fee will be charged to the amount of R\$ 50.00 (fifty reais) per published page of the approved articles to national authors and \$ 50 (fifty US dollars) for foreign authors.
- In the case of article approval, changes in the names of authors and co-authors in the original version won't be allowed under any circumstances.
- All of the items above are basic requirements for the submission of an article and the authors are encouraged to read the Author Guidelines for further instructions.
- If the article does not comply with the Journal's standards, or if the metadata are not filled out correctly, the submission will NOT be considered for review and publication.

Author Guidelines

The Bioscience Journal is an interdisciplinary and open-access electronic journal that publishes scientific articles in a continuous flow in the areas of Agricultural Sciences, Biological Sciences and Health Sciences. Before submitting an article to the Bioscience Journal, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

ARTICLE TYPES

The following types of articles will be accepted: research articles (clinical studies, laboratory studies, cohort studies, case-control studies, ecological studies, and cross-sectional studies), and systematic reviews with or without meta-analysis. Bioscience Journal does NOT accept narrative or critical reviews, case reports, case series, short communications, letters to the Editor, and opinion articles.

REPORTING GUIDELINES

For all manuscripts reporting data from health research, authors must follow the reporting guidelines specific to the type of research: CONSORT for randomized trials, STROBE for observational studies, PRISMA for systematic reviews, STARD for studies of diagnostic accuracy, SRQR for qualitative research, and ARRIVE for animal pre-clinical studies. Authors can consult the reporting guidelines and also other resources relevant to research reporting at the EQUATOR Network website (<https://www.equator-network.org>). A **Reporting Guidelines Checklist** should be submitted along with the manuscript as a supplementary file in the submission process.

ETHICAL PRINCIPLES

Manuscripts involving research on human beings, animals and systematic reviews are accepted for publication if they have received an identification number from one of their public registration databases and/or if research has been reviewed and approved by an appropriate institutional review board (IRB) or ethics committee. Articles describing clinical trials must provide the protocol registration number in ClinicalTrials.gov (<https://www.clinicaltrials.gov>) and/or REBEC (<https://ensaiosclinicos.gov.br>) and/or the World Health Organization (<https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform>); the options are stated at <http://www.icmje.org/recommendations/browse/publishing-and-editorial-issues/clinical-trial-registration.html>. Articles describing animal research must provide the protocol registration number in the Animal Research Ethics Committee. Articles describing systematic reviews must provide the protocol registration number in the PROSPERO (<https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>) database. Manuscripts presenting clinical trials, animal research or systematic reviews without registration protocols will be promptly rejected without peer review. State the registry and registry number in the "Material and Methods" and "Ethics Approval" sections. In addition, a **Certificate of Ethical Approval** for research with human beings or animals should be sent as a supplementary file in the submission process, if applicable. If a recognizable photograph or any potential identifiable material of a patient will be used, a signed **Statement of Informed Consent** must be sent as a supplementary file in the submission process, for every patient. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

COPYRIGHT STATEMENT

Submitted manuscripts must represent original research not previously published nor being considered for publication elsewhere. The Editors of Bioscience Journal combat plagiarism, double publication, and scientific misconduct with the software CrossCheck (<https://www.crossref.org/services/similarity-check/>) powered by iThenticate (<https://www.ithenticate.com>). Your manuscript may be subject to an investigation and retraction if plagiarism is suspected. Upon publication of an article, all rights are held by the publishers, including the rights to reproduce all or part of any publication. The reproduction of articles or illustrations without prior consent from the publisher is prohibited.

All manuscripts must be submitted with a **Copyright Form** ([download here](#)) signed by all authors. The form must contain the following three essential items relating to the manuscript: (1) a statement of responsibility, whereby the authors declare responsibility for the content of the manuscript and agree to disclose all sources of funding and declare all potential conflicts of interest. Authors must also ensure that the article is original and is not under consideration by any other journal. (2) a copyright statement, whereby the authors declare that, in the case of acceptance of the manuscript, the Bioscience Journal shall be the owner of the copyrights relating to same, which will become the sole property of the Journal. (3) a statement of ethics, whereby the authors declare that the study protocol has received an identification number from a public registration database (in the case of articles describing clinical trials and systematic reviews) and/or was endorsed by an institutional review board (IRB) or ethics committee (in the case of research with human beings or animals).

REGISTRATION IN ORCID

As a form of standardization of authorship, the Bioscience Journal made it mandatory to include the iD of the **ORCID** at the time of submission. After the first review, before forwarding for evaluation, the manuscripts that do not have the ORCID informed in the system will be notified for the inclusion of the identifier registration, and should contain at the time of registration, information on academic background and employment (employment, if any).

The **ORCID** identifier can be obtained free of charge at: <https://orcid.org/register>.

You must accept the standards for submitting **ORCID iD**, and include the full URL, accompanied by the expression "http://" (for example: <https://orcid.org/0000-0002-1825-0097>). See here for the registration tutorial. **ORCID** registration is mandatory for all authors. On the platform you can directly enter the **ORCID** connection, thus allowing your connection to be validated by the system.

GENERAL GUIDELINES

- Only original and unpublished articles, written in English, will be accepted.
- The article must not be under evaluation for publication by another journal.
- The article must be submitted correctly to one of the following corresponding areas: Agricultural Sciences, Biological Sciences and Health Sciences.

- **Cover Letter** is mandatory and should contain information about the manuscript relevance, the main findings, and also its suitability within the scope of the Bioscience Journal.
- Authors are responsible for all opinions, results and conclusions contained in articles.
- All accepted articles become the property of Bioscience Journal, and their subsequent publication in other media is NOT allowed.
- In the case of article approval, changes in the names of authors and co-authors in the original version won't be allowed under any circumstances.
- Submissions must be made through the link:

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions>

- Consult the "SUBMISSION CHECKLIST" section of this guideline to ensure that you are ready to submit your manuscript.
- A publication fee will be charged to the amount of R\$ 50.00 (fifty reais) per published (formatted) page of the approved articles to national authors and \$ 50 (fifty US dollars) for foreign authors (form of payment will be informed later). The Bioscience Journal does NOT charge a fee for submitting articles.

MANUSCRIPT FORMAT

All documents should be created using Microsoft Word. The text should be justified, typed in Calibri font, font size 12, with a 1.0 line spacing and a margin of 2.54 cm throughout the entire document.

Title Page

- Title Page: must list the article title (up to 35 words and should mention the study design), the author's full name, ORCID identification number (as obtained from orcid.org), institutional affiliation, and the corresponding author's e-mail address. Institutional affiliation must contain the department (if professor or undergraduate student) or name of the postgraduate program (if postgraduate student) or private clinic for example (if you have no institutional affiliation), followed by full name of the institution (do not include the acronym or abbreviation of the institution's name), city, state, and country. Do not include the degree/title of the authors.
- Acknowledgments: grants and any other financial support for the study should be acknowledged, always with the funding agency name, and with the protocol number whenever possible. Donation of materials used in the research can and should be acknowledged too. This section should also be used to acknowledge any other contributions from individuals or professionals who have helped in producing or reviewing the study, and whose contributions to the publication do not constitute authorship.
- Authors' Contributions: the Bioscience Journal supports the position taken by the ICMJE (<http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>) regarding authorship. Each author must have made at least one of the following contributions

to the completion of the manuscript: 1) conception and design, 2) acquisition of data, 3) analysis and interpretation of data, 4) drafting the article, 5) critical review of important intellectual content. In addition, all authors must have made the following contribution: 6) final approval of the version to be published. A **Declaration of Authorship Contributions** signed by all authors must be sent as a supplementary file in the submission process. Up to 6 authors are accepted without need for justification. In the case of a specific and detailed justification of the role of every author, more than 6 authors may be mentioned. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

- Ethics Approval: manuscripts involving research on human beings, animals and systematic reviews should state the public registration database and/or the institutional review board (IRB) or ethics committee and the registry number in this section (see the "ETHICAL PRINCIPLES" section). In addition, a **Certificate of Ethical Approval** for research with human beings or animals should be sent as a supplementary file in the submission process, if applicable.
- Conflicts of Interest: the Bioscience Journal supports the position taken by the ICMJE (<http://www.icmje.org/about-icmje/faqs/conflict-of-interest-disclosure-forms/>) regarding potential conflicts of interest. In this section, authors are required to describe any financial or non-financial conflicts of interest that may exist regarding the research or the publication of the article. A conflict of interest exists if authors or their institutions have financial or personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their actions. Types of conflicts include: consulting, royalties, research support, institutional support, ownership, stock/options, speakers bureau, and fellowship support. Any commercial entity whose products are described, reviewed, evaluated, or compared in the manuscript, except for those disclosed in the Acknowledgments section, are potential conflicts. If there are no conflicts of interest, authors should state that. Failure to disclose any conflicts of interest is a form of misconduct. The existence and declaration of conflicts of interest is not an impediment to publication at all. Each author must download the **Conflicts of Interest Form** (<http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>), save it, fill it out and send it as a supplementary file in the submission process.

Main Document

- Title: must contain the article title with up to 35 words and should mention the study design.
- Abstract: must contain an unstructured text with up to 250 words including objectives, methods, results and conclusions. References and credits to suppliers and manufacturers of products or equipment must NOT be cited in this section.
- Keywords: must have three to six MeSH or DeCS terms that the authors think express the main article themes, in alphabetical order, separated by a period and starting with a capital letter. These keywords should be different from the words already used in the title and abstract, so that to improve the discoverability of the article by readers doing a search in PubMed or other databases. Please, check your keywords at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> and/or <https://decs.bvsalud.org>
- Main Text: must contain Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusions. Please, do NOT combine the topics of Results and Discussion, they must always be presented separately. Abbreviations and acronyms should be avoided and

when necessary they should be defined the first time they are used in the text. Credit suppliers and manufacturers of equipment, drugs, and other brand-name material mentioned in the manuscript within parentheses, giving the company name and primary location (city and country). The authors can and should use short subheadings, especially those concerning the reporting guideline items. As needed, use italic, superscript and subscript, but do NOT use boldface. Do NOT insert page or section breaks.

- Figures and Tables: must be sent separately from the main document, marked by their order number in Arabic numerals. A maximum of 6 figures/tables may be included in each document. Use TIFF or JPG format for figures (black-and-white or color art) with a minimum resolution of 300 dpi and maximum width of 16 cm. In the case of a figure with multiple graphs or photographs, they must be identified by capital letters in the upper left corner. Create tables using the Table function in Microsoft Word and save each one in a separate file. All the figures and tables must be cited in the text. Data given in tables should be commented on but not repeated in the text. A short descriptive title must be provided for each figure/table. All information contained inside the figures and tables must be in Calibri font, font size 12, line spacing 1.0. Figures and tables already published are NOT accepted, even if legal authorization has been obtained; they must have been prepared by the authors themselves.
- References: the Bioscience Journal uses the ISO 690:2010(E) style adapted. The authors should list up to 40 (research articles) or 60 references (systematic reviews), and at least 70% of them must be from the last five years. Bioscience Journal does NOT accept references of theses, dissertations, monographs, and conference abstracts. Authors should also avoid books and book chapters. Follow the instructions and examples below for the format and/or at <https://dominiodelasciencias.com/ojs/documentos/ISO690-2010.pdf> for further instructions.

CITATION IN TEXT

The citation must be presented in author-data format between parentheses before periods/full stops or commas in sentences. All authors must be listed if there are up to and including two authors, as in the following example: (Santos and Cunha 2015); for works with three or more authors, the first author must be cited, followed by the expression "et al.", as in the example: (Silva et al. 2012). If the authors' name occurs naturally in the text, the year follows in parentheses. In citations to particular parts of an information resource, the location of that part (e.g. page number) may be given after the year within the parentheses. If two or more information resources have the same author and year, they are distinguished by lower-case letters (a, b, c, etc.), following the year within the parentheses.

Example: The notion of an invisible college has been explored in the sciences (Crane 1972). Its absence among historians is noted by Stieg (1981b, p. 556). It may be, as Burchard (1965) points out, that they have no assistants, or are reluctant to delegate (Smith 1980; Chapman 1981).

CITATION IN LIST OF REFERENCES

All references must be ordered alphabetically and the authors must be listed if there are up to three authors; if there are four or more, the first author must be cited, followed by the expression "et al." At the end of each reference, please insert the "DOI" number if available. For this, authors must search the metadata for references on the Crossref website (<https://doi.crossref.org/simpleTextQuery>) and copy the DOI whenever available.

Citing an online journal article

Structure: AUTHORS, INITIALS. Title of the article. *Journal Title*. Year, **Vol.**(No.), series of pages. Available from: URL or doi

Example: GUNERHAN, H., HEPBASLI, A. and GIRESUNLU, U. Environmental impacts from the solar energy systems. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*. 2008, **31**(2), 131-138. <https://doi.org/10.1080/15567030701512733>

Citing a printed journal article

Structure: AUTHORS, INITIALS. Title of the article. *Journal Title*. Year, **Vol.**(No.), series of pages. ISSN.

Example: AHMED, M. and BOISVERT, C.M. Using computers as visual aids to enhance communication in therapy. *Computers in Human Behavior*. 2006, **22**(5), 847-855. ISSN 0747-5632.

Citing a chapter in a book

Structure: AUTHORS, INITIALS., Year. Title of the chapter. In: Editors, eds. *Title of the book*, Place of publication: Publisher, pp. series of pages.

Example: CARDOSO, H.L. and OLIVEIRA, R., 2005. Virtual enterprise normative framework within electronic institutions. In: M-P. GLEIZES, A. OMICINI and F. ZAMBONELLI, eds. *Engineering societies in the agents world V*, Heidelberg: Springer, pp. 14-32.

Citing a book

Structure: AUTHORS, INITIALS. *Title of the book*. Edition. Place of publication: Publisher, Year.

Example: SOMMERVILLE, I. *Software engineering*. 9th ed. Boston: Pearson, 2011.

Citing a chapter in an e-book

Structure: AUTHORS, INITIALS., Year. Title of the chapter. In: Editors, eds. *Title of the e-book*, Place of publication: Publisher, pp. series of pages. Available from: URL or doi

Example: STACHOWIAK, G.W. and BATCHELOR, A.W., 2014. Computational hydrodynamics. In: G.W. STACHOWIAK and A.W. BATCHELOR, eds. *Engineering tribology*, Amsterdam: Elsevier, pp. 211-265. Available from: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpETE00005/engineering-tribology/engineering-tribology>

Citing an e-book

Structure: AUTHORS, INITIALS. *Title of the e-book*. Edition. Place of publication: Publisher, Year. Available from: URL or doi

Example: WATTON, J. *Fundamentals of fluid power control*. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. Available from: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFFPC0002/fundamentals-fluid-power/fundamentals-fluid-power>

DOCUMENTS CHECKLIST

- **Cover Letter** to the Editor signed by the corresponding author (see the "GENERAL GUIDELINES" section).
- **Title Page** containing the Title Page, and the items Acknowledgments, Authors' Contributions, Ethics Approval, and Conflicts of Interest (see the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- **Main Document** containing the article Title, Abstract, Keywords, Main Text, and References (see the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- **Figures** (see the "Figures and Tables" item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- **Tables** (see the "Figures and Tables" item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- **Copyright Form** signed by all authors (see the "COPYRIGHT STATEMENT" section).
- **Declaration of Authorship Contributions** (see the "Authors' Contributions" item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- **Conflicts of Interest Form** (see the "Conflicts of Interest" item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- **Reporting Guidelines Checklist**, if applicable (see the "REPORTING GUIDELINES" section).
- **Certificate of Ethical Approval**, if applicable (see the "ETHICAL PRINCIPLES" section and the "Ethics Approval" item in the "MANUSCRIPT FORMAT" section).
- **Statement of Informed Consent**, if applicable (see the "ETHICAL PRINCIPLES" section).

PEER REVIEW POLICY AND PROCEDURES

After receipt of the article through the electronic submission system, it will be read by the Editorial Team, who will check whether the text complies with the Journal's submission guidelines regarding format. The Bioscience Journal has adopted the CrossRef Similarity Check system for identifying plagiarism and any text that has been plagiarized, in whole or in part, will be promptly returned to the author who must justify the similarity and/or rewrite the text, or the article will be promptly rejected. Self-plagiarism will also be monitored.

When the general format of the manuscript is deemed acceptable and fully compliant with the submission guidelines, and only then, the Editorial Team will submit the article to the Editor-in-Chief, who will firstly evaluate its scope. If the Editor finds that the topic is of interest for publication, he will assign at least two reviewers/referees with expertise in the theme, to evaluate the quality of the study. After a period varying from one to several weeks, the

authors will then receive the reviewers' evaluations and will be required to provide all further information requested and the corrections that may be necessary for publication. A certificate of English review made by a company specializing in English proofreading services can be requested if there are misspelling and/or grammatical errors throughout the manuscript.

The modified article must be resubmitted accompanied by a letter answering the reviewers' comments, point by point. The modified article and the response letter are presented to the Editorial Team and reviewers, who will verify whether the problems have been resolved adequately. The text and the reviewers' final evaluations, along with the response letter, will then be sent to the Editor-in-Chief for a decision.

PRODUCTION PROCEDURE

Manuscripts that are found to be suitable for publication through their scientific merit will be considered "provisionally accepted". At this stage, the authors will receive a Template for formatting the manuscript in the style of publication of the Bioscience Journal. Only after sending the article in the format of this Template, the manuscript will be considered "definitely accepted". The Editorial Team will then provide page proofs for the authors to review and approve. The Journal reserves the right to make changes as to rules, spelling and grammar in the original, in order to maintain the standard patterns of the language, while respecting the style of the authors. The final proofs will be sent to the authors, together with the payment slip for publication. All authors should review and approve the proof, although the Journal asks the corresponding author to give final approval. No reprints will be provided. The articles will be available for printing in PDF format on the Journal website.

Copyright Notice



The **Bioscience Journal** uses the [Creative Commons \(CC\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license, thus preserving the integrity of the articles in an open-access environment and ensuring the rights of the authors:

Privacy Statement

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.