

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

JÉSSICA SANTOS QUEIROZ

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE
HEMOGLOBINA E SUA ESTABILIDADE ANALÍTICA EM TRÊS TEMPOS EM
Bothrops atrox (LINNAEUS, 1758) (OPHIDIA, VIPERIDAE) MANTIDAS EM
CATIVEIRO**

Uberlândia - MG

2022

JÉSSICA SANTOS QUEIROZ

Comparação de métodos de determinação da concentração de hemoglobina e sua estabilidade analítica em três tempos em *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Ophidia, Viperidae) mantidas em cativeiro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

Co-orientadora: Dra. Mariluce F. Romão

Uberlândia - MG

2022

JÉSSICA SANTOS QUEIROZ

Comparação de métodos de determinação da concentração de hemoglobina e sua estabilidade analítica em três tempos em *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Ophidia, Viperidae) mantidas em cativeiro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Médica Veterinária.

Uberlândia, 31 de março de 2022

Banca Examinadora:

Dra. Líria Queiroz Luz Hirano (UNB)

Me. Heloísa Castro Pereira

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador da vida e amigo, o Prof. André Luiz Quagliatto Santos, que foi o principal responsável por me apaixonar pela área de animais selvagens, me apoiou, aconselhou e participou ativamente em todos os períodos da faculdade.

Ao meu marido que aguentou todos os obstáculos nesse período de faculdade, me apoiou sempre e me incentivava a ser uma pessoa melhor.

A família que me adotou, Ana, Caca e Carlos, por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

A minha família que mesmo de longe sempre me apoiaram e oraram por mim, inclusive neste momento importante da minha vida.

Aos meus amigos e colegas, em especial Caroline Vieira, Maria Eduarda Pereira e Gabriella Faria, que me ajudaram a superar todos os problemas, alegraram meus dias e me apoiaram incondicionalmente.

A Thais Aparecida, em quem eu encontrei a amizade e pareceria em todas as viagens de campo, atividades acadêmicas e que participou ativamente na coleta das amostras deste trabalho.

A Heloisa C. Pereira por ter me disponibilizado seu tempo me ajudando nessa pesquisa, que foi essencial para a realização desse experimento.

A Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação LTDA (grupo DSM), Uberlândia, por disponibilizar os animais que foram fundamentais para que este estudo acontecesse.

Ao Laboratório Clínico Veterinário (LCVET) e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), por ceder o espaço, instrumentos e equipamentos necessários para essa pesquisa.

Às inúmeras pessoas que passaram pela minha vida ao longo desses anos de graduação, que me ensinaram, incentivaram e que certamente impactaram positivamente minha formação profissional.

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se comparar métodos alternativos para a dosagem de hemoglobina plasmática (Hematoclin 2.8 VET, $Hb = Hc/3$ e calculada por regressão linear) com a metodologia da cianometahemoglobina, considerada padrão ouro para répteis; verificar a estabilidade analítica dessa mensuração em amostras armazenadas a 4°C; inferir se o anticoagulante possui influência nos achados e propor uma expressão matemática capaz de estimar a concentração de hemoglobina plasmática em indivíduos adultos da espécie *Bothrops atrox*. Para este fim, 16 indivíduos hígidos adultos de jararaca-do-norte (*Bothrops atrox*) foram analisados. Para a dosagem de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina, adicionou-se 10 µl de sangue total com EDTA ou com heparina sódica, à 2,5 ml de solução de Drabkin, centrifugou-se a diluição e 300 µl do sobrenadante foi transferido para microplacas, lidas em 540 nanômetros. Esse processo foi repetido em 24h, 48h e 72h. Além disso, o analisador hematológico Hematoclin 2.8 VET foi usado para leitura de amostras acondicionadas com EDTA K2. Os métodos de cianometahemoglobina e a calculada por regressão linear foram estatisticamente diferentes da hemoglobina calculada $Hb = Hc/3$ e pelo Hematoclin 2.8 VET ($p < 0,0001$). Apesar disso, apresentaram forte correlação positiva constatada pelos coeficientes de correlação 0,9564, 0,9371 e 0,9371, com $p < 0,0001$. A regressão linear para correção dos valores obtidos pelo analisador hematológico foi representada pela fórmula $Hb_C (g/dL) = 0,8370 \times Hb_H + 0,5708$ ($r^2 = 0,8781$). A relação hematócrito versus concentração hemoglobínica plasmática foi significativa ($r^2 = 0,8781$), por isso, o presente estudo propôs a expressão $Hb_C = 0,2459 \times Hc + 1,266$ como técnica para estimar a hemoglobina (g/dL) nessa espécie. As médias para cada anticoagulante não diferiram entre si ($p = 0,0831$) e as resultantes dos tempos amostrais foram estatisticamente iguais (EDTA K2, $p = 0,6598$; heparina sódica, $p = 0,0589$). Os dados sugerem que a fórmula convencional não apresenta validade científica para a espécie e para evitar a utilização de metodologias tóxicas e demoradas, as fórmulas propostas podem ser utilizadas para estimar a concentração hemoglobínica plasmática em *Bothrops atrox*.

Palavras-chave: Serpentes. Jararaca-do-norte. Sangue. Hemograma. Eritrograma. Hematologia de répteis. Método de cianometahemoglobina. Analisador Hematológico. Hematócrito. Volume Globular.

ABSTRACT

This study aimed to compare alternative methods for measuring plasma hemoglobin (Hematoclin 2.8 VET, $Hb=Hc/3$ and calculated by linear regression) with the cyanomethemoglobin methodology, considered the gold standard for reptiles; verify the analytical stability of this measurement in samples stored at 4°C; infer whether the anticoagulant has an influence on the findings and propose a mathematical expression capable of estimating the plasma hemoglobin concentration in adult individuals of the *Bothrops atrox* species. For this purpose, 16 healthy adult northern jararaca (*Bothrops atrox*) were analyzed. For the measurement of hemoglobin by the cyanomethemoglobin method, 10 µl of whole blood with EDTA or sodium heparin was added to 2.5 ml of Drabkin's solution, the dilution was centrifuged and 300 µl of the supernatant was transferred to microplates, read at 540 nanometers. This process was repeated at 24h, 48h and 72h. In addition, the Hematoclin 2.8 VET hematology analyzer was used to read samples packed with EDTA K2. Cyanomethemoglobin and linear regression methods were statistically different from calculated hemoglobin $Hb=Hc/3$ and Hematoclin 2.8 VET ($p < 0.0001$). Despite that, they showed a strong positive correlation verified by the correlation coefficients 0.9564, 0.9371 and 0.9371, with $p < 0.0001$. Linear regression to correct the values obtained by the hematological analyzer was represented by the formula $Hb_C \text{ (g/dL)} = 0.8370 \times Hb_H + 0.5708$ ($r^2 = 0.8781$). The hematocrit versus plasma hemoglobin concentration ratio was significant ($r^2 = 0.8781$), so the present study proposed the expression $Hb_C = 0.2459 \times Hc + 1.266$ as a technique to estimate hemoglobin (g/dL) in this species. The means for each anticoagulant did not differ ($p = 0.0831$) and those resulting from the sampling times were statistically equal (EDTA K2, $p = 0.6598$; heparin sodium, $p = 0.0589$). The data suggest that the conventional formula does not present scientific validity for the species and to avoid the use of toxic and time-consuming methodologies, the proposed formulas can be used to estimate the plasma hemoglobin concentration in *Bothrops atrox*.

Keywords: Snakes. Common lancehead. Blood. Blood count. Erythrogram. Reptile hematology. Cyanomethemoglobin method. Hematological Analyzer. Hematocrit. Packed Cell Volume.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Répteis	7
2.1.1 Squamata	7
2.1.1.1 Ophidia	9
2.1.1.1.1 Viperidae	10
<i>Bothrops atrox</i>	11
Biologia da <i>Bothrops atrox</i>	11
Distribuição geográfica.....	13
Risco de extinção.....	14
2.1.2 Procedimentos e protocolos envolvidos nas Análises Hematológicas	14
2.1.2.1 Colheita sanguínea de serpentes	14
2.1.2.2 Conservação da amostra sanguínea de serpentes.....	17
2.1.2.3 Análises Hematológicas em répteis.....	18
2.1.3 Hemoglobina.....	19
2.1.3.1 Histórico evolutivo da Hemoglobina.....	21
2.1.3.3 Métodos de mensuração da concentração de hemoglobina.....	24
2.1.3.3.1 Método de Cianometahemoglobina.....	24
2.1.3.3.2 Método Modificado de Hematina Alcalina (MAHD)	24
2.1.3.3.3 Método do Lauril Sulfato de Sódio (SLS).....	25
2.1.3.3.3 Analisadores Hematológicos Automáticos.....	25
3 MATERIAL E MÉTODO.....	27
3.1 ANIMAIS	27
3.2 COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....	27
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	28
3.3.1 Dosagem de Hemoglobina pelo método da Cianometahemoglobina (Hb _C) e Estabilidade Analítica.....	28
3.3.2 Dosagem de Hemoglobina pelo Analisador Hematológico Automático (Hb _H)	29
3.3.3 Mensuração do hematócrito.....	30
3.3.4 Hemoglobina calculada.....	30
3.3.5 Estabilidade Analítica da Hemoglobina	31

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES.....	43

1 INTRODUÇÃO

A serpente jararaca-do-norte, *Bothrops atrox* (LINNAEUS, 1758), é um réptil peçonhento endêmico da floresta tropical e subtropical úmida da América do Sul (BARRETO *et al.*, 2017; FRAGA *et al.*, 2013). Segundo Monteiro e colaboradores (2020), a composição da sua peçonha é amplamente estudada e ajuda a evidenciar a relevância de suas características na biologia desses animais e os impactos gerados na sua interação com humanos envolvidos em acidentes botrópicos.

Em répteis, o hemograma e avaliação do esfregaço sanguíneo são incluídos nos exames de rotina laboratoriais assim como ocorre com mamíferos, possuindo apenas algumas diferenças (CAMPBELL; GRANT, 2022; HEATLEY; RUSSELL, 2020). Samour e Hart (2021) evidenciam a importância dessas análises quando afirmam que essas mensurações hematológicas, em qualquer espécie animal, desempenham papel fundamental para a determinação do diagnóstico diferencial, bem como para monitoramento da evolução da doença e de seu tratamento, permitindo ao veterinário prever um prognóstico.

A hemoglobina, objeto de avaliação hematológica, é a principal proteína presente nos eritrócitos, cuja função, primordial para a manutenção da vida dos vertebrados, é a de carrear oxigênio (O₂) dos órgãos respiratórios, como pulmões, brânquias e pele, para os demais tecidos a fim de suprir suas necessidades metabólicas (MIYATA *et al.*, 2020; STORZ, 2019). Sua avaliação, aliada aos índices hematológicos (volume corpuscular médio; hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média), é primordial para investigar mais profundamente a função dos eritrócitos, assim como, contribuem para um diagnóstico mais assertivo, identificação da causa e caracterização da anemia (SAGGESE, 2009).

Os autores Ranzani-Paiva *et al.* (2013), Magno, Miguita e Oshiro (2017), Mohapatra, Bhatia e Parida (2018) apontam que o cianeto de potássio presente na solução de diluição e lise, utilizado no método de cianometahemoglobina para dosagem de hemoglobina, é altamente tóxico, danoso ao meio ambiente e fotossensível. De modo que a manipulação e intoxicação com o cianeto é letal para o manipulador e sua eliminação é potencialmente um risco biológico.

Como alternativa, convencionou-se em laboratórios médicos, que a concentração de hemoglobina em animais hígdos é equivalente a cerca de um terço do hematócrito (TURKSON; GANYO, 2015). Alguns laboratórios veterinários também

se utilizam desse fator de correção, assim como alguns autores de livros veterinários igualmente aceitam essa relação (BARGER; MACNEILL, 2015; SUTTON; SELLON, 2012; TURKSON; GANYO, 2015).

Outra problemática envolvida nessas espécies de répteis está relacionada ao tempo e tipo de estocagem da amostra. Os efeitos dessas variáveis ainda não estão muito bem elucidados em serpentes. Assim, para obter resultados mais confiáveis estima-se que as amostras devem ser avaliadas em até 24h e armazenadas sob refrigeração de 4°C (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020).

O presente trabalho objetivou: (1) comparar as concentrações de hemoglobina de jararacas-do-norte obtidas pelo método de cianometahemoglobina e por um analisador hematológico automático (Hematoclin 2.8 VET, Quibasa-Bioclin); (2) verificar a estabilidade analítica da hemoglobina nesta espécie em três tempos (24h; 48h e 72h); (3) confrontar os resultados obtidos de acordo com o tipo de anticoagulante utilizado, EDTA K2 (ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico) e heparina sódica; (4) verificar se a convenção de que a Hb corresponde à um terço do hematócrito se aplica à *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) e (5) propor uma fórmula simplificada para estimar a concentração hemoglobínica no sangue total destas serpentes por meio de regressão linear.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Répteis

Os répteis são animais de morfologia corporal variável, revestidos externamente por adaptações tegumentares, como placas córneas, escamas, osteodermas e casco. Estes possuem como características côndilo occipital único; coração tricavitário (esquamatas e testudines) ou tetracavitário (crocodilianos); todas as células sanguíneas nucleadas; rins metanéfricos; ectotérmicos, que se reproduzem, principalmente, sexuadamente por fecundação interna e de classificação ovípara ou vivípara (POUGH; JANIS; HEISER, 2008; TROIANO, 2018).

Esses seres magníficos fazem parte da classe Reptilia, sendo representados pelas ordens Squamata (serpentes, lagartos e anfisbenas); Crocodylia (crocodilos, aligátors, caimões e gaviais); Testudines (tartarugas, cágados e jabutis) e os rincocéfalos [tuataras das espécies *Sphenodon punctatus* (GRAY, 1842) e *Sphenodon guentheri* (GRAY, 1842) distribuídos na Nova Zelândia]. Estes estão disseminados mundialmente, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (POUGH; JANIS; HEISER, 2008; ZIMMERMAN, 2018; TROIANO, 2018).

É importante ressaltar que até dezembro de 2020, foram reconhecidas 11440 espécies de répteis distribuídas em 92 famílias e subfamílias, dentre os quais 3956 são serpentes. Reduzindo a região para a América Latina, estima-se que 2233 espécies de reptilianos sejam encontrados, de modo que, no Brasil, apenas 430 espécies da Subordem Ophidia são endêmicas. Diminuindo ainda mais a área estudada para as Unidades Federativas Brasileiras, 246 espécies e subespécies de ofídios estão distribuídas geograficamente no Norte, 205 no Sul, 215 no Centro-oeste, 196 no Sudeste e 137 no Sul (COSTA; BÉRNILS, 2018; COSTA; GUEDES; BÉRNILS, 2021; UETZ *et al.*, 2021a; UETZ *et al.*, 2021b).

2.1.1 Squamata

As 11440 espécies incluídas na classe de répteis não-aves (UETZ *et al.*, 2021a) ocupam uma infinidade de ambientes, tanto aquáticos como terrestres, e por vezes são amplamente diversos e abundantes (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020). Os escamados são, então, considerados como a linhagem mais bem sucedida entre os

reptilianos não-aves sobreviventes, bem como entre os vertebrados terrestres de modo geral, em relação ao número de espécies e em sua variação morfológica e ecológica (PINCHEIRA-DONOSO *et al.*, 2013).

Por mais de 165 milhões de anos esses animais dominaram a terra durante a Era dos Répteis, na Era Mesozoica, dividindo-se em múltiplas espécies terrestres e aquáticas, incluindo os dinossauros. No fim dessa Era, houve uma extinção em massa eliminando muitas linhagens, sobrando somente algumas, que incluem os répteis atuais (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020).

Por volta de 325 milhões de anos atrás, durante o estágio Bashkirian do período Carbonífero Tardio (BROCKLEHURST; BENSON, 2021), os primeiros ancestrais dos répteis não-aves, aves e mamíferos surgiram, chamados de amniotas. Este grupo se adaptou completamente ao ambiente terrestre, bem como obteve modificações cutâneas que garantiam uma proteção à perda vertiginosa e exorbitante de água (VITT; CALDWELL, 2014).

Este grupo monofilético se originou dos antracossauros, seres anamniotas por vezes confundidos com os répteis primitivos. Assim, os primeiros amniotas se reproduziam por meio de um ovo com casca, o que garantiu a independência dos ambientes aquáticos ou úmidos, visto que esse estágio embrionário foi encapsulado pelo âmnio dentro de uma cavidade repleta de líquido que garantiria a sobrevivência do embrião. Essa evolução reprodutiva assegurou o sucesso desses representantes na conquista da vida terrestre (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020; KARDONG, 2019).

Representantes modernos deste táxon se dividem em duas linhagens principais, a Synapsida e Diapsidae. Sendo que o primeiro abrange apenas os mamíferos e o segundo, os lepidossauros (Squamata e tuataras), testudines (tartarugas, jabutis e cágados) e arcossauros (crocodilianos e aves). Tradicionalmente, a diferenciação entre esses dois clados se refere aos padrões de janelas na têmpera craniana atrás da órbita ocular. Os crânios diápsidos possuem dois pares de aberturas, duas laterais e duas dorsais, enquanto que os de classificação sinápsida possuem apenas um par, as laterais (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020; KARDONG, 2019).

Os primeiros fósseis reconhecidos como répteis, os cotilossauros, eram morfologicamente semelhantes aos lagartos e surgiram por volta de 275 milhões de anos, no Carbonífero inferior ou Permiano superior. Acredita-se que deram origem a

todas as espécies de répteis viventes, além de posteriormente, se diversificarem nas linhagens progenitoras de dinossauros, mamíferos e pássaros (LILLYWHITE, 2014).

Os escamados estão no táxon mais diverso e abundante dos répteis (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020; VITT; CALDWELL, 2014), agrupados dessa forma de acordo com alguns caracteres homólogos apomórficos, dos quais os mais evidentes são: apresentar hemipênis, crânio cinético, ossos pré-maxilares fundidos pós desenvolvimento embrionário e transversalidade da fenda cloacal (BENEDITO, 2017). Este grupo compreende, atualmente, 11302 espécies, sendo que 3956 destas são serpentes (Ophidia), 7144 lagartos (Lacertilia) e 202 anfisbenas (Amphisbaenia) (UETZ *et al.*, 2021a).

O fóssil mais antigo de lagartos data do período Jurássico, porém sua diversificação ocorreu posteriormente no período Cretáceo da era Mesozóica, no apogeu de dominação dos Dinossauros (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020). As serpentes apareceram no período Jurássico tardio, provavelmente há 150 milhões de anos atrás, a partir de lagartos ápodas com hábitos fossórios (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020; BENEDITO, 2017). Trinta milhões de anos após o seu surgimento, as primeiras serpentes se adaptaram, também, aos ambientes aquáticos. Apesar de espécies de ambos os hábitos coexistirem no período Cretáceo, em torno de 95 milhões de anos atrás, não há consenso de qual evoluiu primeiro (LILLYWHITE, 2014).

2.1.1.1 Ophidia

Os fósseis das primeiras serpentes possuíam membros. Porém, evolutivamente, as espécies de ofídios viventes perderam os membros e as cinturas peitoral e pélvica (vestigiais em pítons, jiboias e outras serpentes) (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020). Para mais, tiveram seus corpos alongados. Essas adaptações se devem às mudanças na expressão dos genes Hox, que controlam a replicação celular no embrião, mantendo-a ao longo do eixo corporal, bem como definem o desenvolvimento dos membros, o limiar dessas alterações e de outras relacionadas (LILLYWHITE, 2014). Estas modificações corpóreas, associadas ao aumento do número, diminuição do comprimento e aumento da largura das vértebras, permite que esses seres se movimentem rapidamente por meio de ondulações corporais nos mais diversos terrenos (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020).

Além disso, outras mudanças incluíram o reordenamento dos órgãos internos e alterações no crânio, que permitiram o aumento da cinese, maior efetividade e força na oclusão mandibular. Essas alterações possibilitaram, então, a apreensão de presas maiores (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020).

Esses seres ofídios se diferenciam baseados em vários fatores. Seu comprimento corporal pode variar de 10 cm a 10 m. Em relação à sua dieta, esta pode se basear em roedores, aves, sauros, anfíbios, peixes, moluscos, lesmas, vermes, insetos ou outras serpentes. Ainda, elas podem ser constritoras, não constritoras, semiconstritoras e peçonhentas. Em relação aos comportamentos, se classificam em diurnas e noturnas, bem como podem ser ovíparas e vivíparas (BENEDITO, 2017).

Externamente, esses animais não são muito distintos. Apresentam escamas dorsais menores e ventrais, maiores e retangulares. Esses indivíduos não possuem pálpebras, porém, seus olhos são protegidos pela *brille*, escama transparente que durante a ecdise é eliminada juntamente com as outras. Estes anexos tegumentares podem ser lisos, carenados ou granulares. A disposição, formato e número dessas estruturas por vezes são utilizadas para diferenciação taxonômica (BENEDITO, 2017).

As serpentes estão distribuídas em todo o planeta, com exceção das calotas polares (BENEDITO, 2017; GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014). Estão presentes especialmente nas regiões temperadas e tropicais, devido ao caráter ectotérmico desses animais, característica importante neles, visto que influencia praticamente todos os seus aspectos fisiológicos (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014).

Até o momento, as serpentes estão divididas em 30 famílias distintas (UETZ *et al.*, 2021c), sendo que as de maior interesse comercial e médico são: Colubridae, Pythonidae, Elapidae, Viperidae e Boidae (BENEDITO, 2017; GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014). No Brasil, 430 espécies representam dez famílias e 84 gêneros (COSTA; GUEDES; BÉRNILS, 2021). A diversidade de habitats brasileiros propicia essa variabilidade de indivíduos (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014).

2.1.1.1.1 *Viperidae*

As víboras são animais de dentição solenóglifa, na qual glândulas de veneno estão ligadas a presas tubulares localizadas mais rostralmente na cavidade oral. Estas

ficam escondidas no interior de uma bainha membranosa, quando a boca está fechada. Porém, quando este animal ataca uma potencial presa ou por auto-defesa, um músculo ativa um sistema de alavanca, de formação óssea, que por sua vez, expõe as presas. Estas são introduzidas nos tecidos e a peçonha é injetada nesse local (GREGO; ALBUQUERQUE; KOLESNIKOVAS, 2014; SUES, 2019). Seus representantes ocorrem em quase todas as regiões do planeta, com exceção da Austrália, Antártica e ilhas oceânicas (SUES, 2019).

A subfamília Crotalinae tem como característica, a presença de cavidades sensoriais entre as narinas e os olhos, denominadas fossetas loreais (BENEDITO, 2017; VITT; CALDWELL, 2014; HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020; SUES, 2019). Providas de terminações nervosas, essas estruturas são capazes de detectar ondas infravermelhas de 5000 a 15000 nm e são precisas na identificação do calor emitido pelo corpo de animais endotérmicos (que irradiam ondas com comprimento de 10000 nm). Esses órgãos do sentido têm como função localizar as presas e orientar os botes (HICKMAN JUNIOR *et al.*, 2020).

Bothrops atrox

Biologia da *Bothrops atrox*

Essa serpente de médio porte é comumente encontrada no norte da América do Sul. Devido a isso, acidentes ofídicos com essa espécie são frequentemente reportados nessas regiões (FRAGA *et al.*, 2013; HATAKEYAMA *et al.*, 2020; HUI WEN *et al.*, 2015).

Além disso, seu habitat inclui, primariamente, florestas tropicais e subtropicais, campos de vegetação baixa e em ambientes úmidos às margens de rios e lagoas. No entanto, se adaptam facilmente em ambientes antropizados, como pastagens, lavouras e áreas urbanas (BERNARDE, 2014; DE FREITAS, 2003; GUTIÉRREZ-CÁRDENAS *et al.*, 2015).

Quando adultas podem medir entorno de 53,7 cm a 153,3 cm de comprimento rostro-cloacal (CRC) (SILVA *et al.*, 2019), sendo registrados comprimentos totais de até 186 cm (DE FREITAS, 2003); machos com até 100 cm e fêmeas com até 210 cm (FRAGA *et al.*, 2013). O dimorfismo sexual nesta espécie está presente, de tal

maneira que as fêmeas são maiores que os machos (BISNETO; KAEFER, 2019; SILVA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019).

Estes indivíduos apresentam uma grande divergência no padrão de cores (DUARTE, 2014; FRAGA *et al.*, 2013), sendo a cor de fundo variável entre verde-oliva, marrom, cinza, bege, amarelo ou ferrugem, as formas geométricas trapezoidais mais escuras na lateral do corpo e faixa postocular bem evidenciada (CAMPBELL; LAMAR, 2004; FRAGA *et al.*, 2013; DE FREITAS, 2003). No ventre, o padrão colorimétrico segue o xadrez (FRAGA *et al.*, 2013).

Suas escamas dorsais são justapostas, carenadas e arranjadas em 23 a 33 fileiras. Esses anexos tegumentares se dividem em cinco a 11 intrasupraoculares, sete supralabiais (em algumas exceções, oito), duas anais e 47 a 86 subcaudais. Além disso, são morfologicamente caracterizadas por apresentarem fossetas loreais, pupilas dispostas verticalmente e denticção solenóglifa, sendo, portanto, uma serpente peçonhenta (FRAGA *et al.*, 2013).

Esse animal de hábitos noturnos e crepusculares, caça por emboscada quando adultos, se mantendo no solo, porém quando jovens podem caçar ativamente por meio da vibração da ponta da cauda de coloração amarela, atraindo lagartos e anfíbios para o alcance do bote, display denominado de engodo caudal (MATTISON, 2014; O'SHEA, 2018). Sua dieta base é rodentívora, avevícora, saurófaga, ofiófaga e carnívora, assim como se alimentam de rãs e marsupiais (FRAGA *et al.*, 2013).

As serpentes possuem comportamentos defensivos diferentes de acordo com os instrumentos que possuem. Essas características fenotípicas diminuem consideravelmente os embates físicos e, conseqüentemente, os custos energéticos gerados por eles. Assim, se resumem em adaptações estratégicas (JARA; PINCHEIRA-DONOSO, 2015). Nesse sentido, a *B. atrox* possui glândulas na base da cauda, em número par, que liberam substâncias fétidas que, por vezes, são capazes de afugentar o predador (FRAGA *et al.*, 2013).

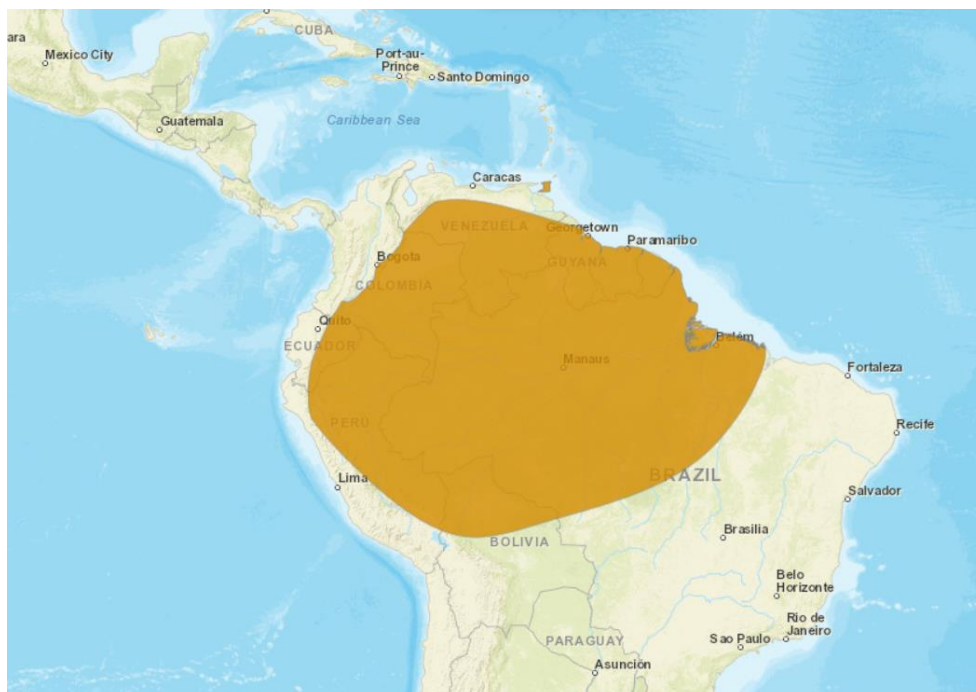
Ademais, alguns comportamentos que demonstrem agressividade podem ser usados no intuito de intimidar prováveis ameaças. Em vista disso, as jararacas agitam a cauda ferozmente, além de achatarem o pescoço (FRAGA *et al.*, 2013), display popularmente conhecido como encapuzamento. Essa estratégia consiste em um achatamento dorso-ventral e expansão lateral dessa região, criando uma falsa ilusão de que o animal é maior do que parece (JARA; PINCHEIRA-DONOSO, 2015).

Outra idiossincrasia dessa espécie de caráter ofensivo e defensivo é a peçonha, incluindo todos os processos que ela depende para ser inoculada. Os seus efeitos proteolíticos acarretam alterações locais, como edema, dor, eritema, hemorragia e morte tecidual (ALMEIDA *et al.*, 2020; COSTAL-OLIVEIRA *et al.*, 2019). Ainda sua ação coagulante se destrincha em distúrbios sistêmicos, os quais se baseiam no consumo de fibrinogênio pela formação de trombos e coágulos generalizados, e, conseqüentemente, na incoagulabilidade do sangue (WELLMANN *et al.*, 2020).

Distribuição geográfica

Está distribuída geograficamente (Figura 1) pelo leste dos Andes, sudeste colombiano, sul e leste venezuelano, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, leste equatoriano, Peru, Panamá, norte boliviano e norte brasileiro (GUTIÉRREZ-CÁRDENAS *et al.*, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Figura 1 – Mapa da distribuição geográfica de *Bothrops Atrox* na América Latina.



Fonte: GUTIÉRREZ-CÁRDENAS *et al.*, 2015

Risco de extinção

Segundo Gutiérrez-Cárdenas e outros especialistas (2015), a espécie está categorizada como menos preocupante na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN - International Union for Conservation of Nature). Isto se deve ao fato de que sua população é estável ou crescente, e amplamente distribuída, principalmente em áreas de preservação. Sofrem de poucas ameaças de extinção, as quais são: uso de seus recursos biológicos; caça e captura; perseguição e controle; e, geralmente, são exterminadas quando avistadas por humanos (GUTIÉRREZ-CÁRDENAS *et al.*, 2015).

2.1.2 Procedimentos e protocolos envolvidos nas Análises Hematológicas

2.1.2.1 Colheita sanguínea de serpentes

De acordo com Brown, Tristan e Heatley (2020), na maioria das vezes, a contenção física de serpentes é suficiente para possibilitar a colheita de amostras sanguíneas. Porém, quando são espécies peçonhentas, espécimes muito grandes ou animais agressivos, pode ser oportuno a utilização de técnicas farmacológicas para restrição do movimento. Ainda os mesmos autores afirmam que a contenção e manuseio de ofídios que possuem peçonha necessitam de técnicas e equipamentos especiais, visando a segurança do manipulador e da serpente.

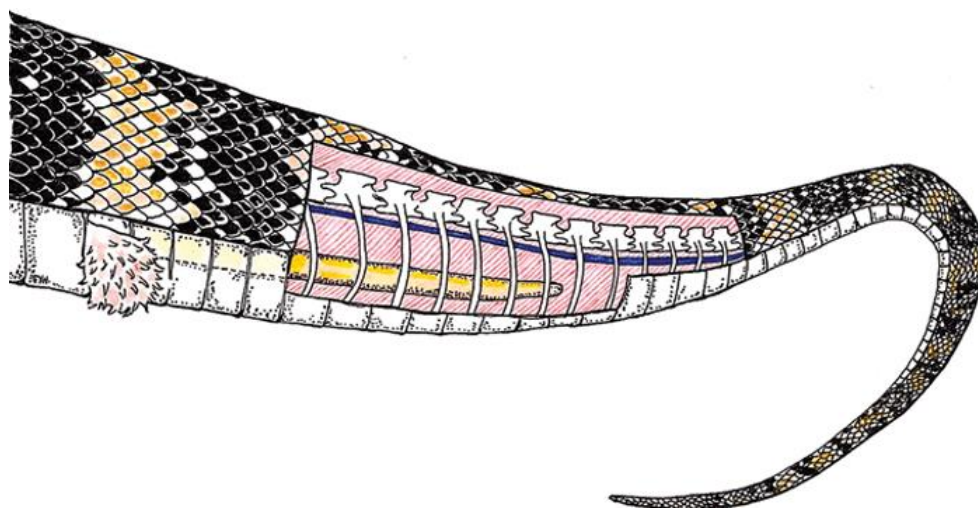
Antes de se realizar a colheita sanguínea é imprescindível a determinação do volume máximo seguro de colheita. Os répteis possuem um volume de sangue total inferior quando comparados com mamíferos, que corresponde a 5% a 8% do peso corporal. Muitos répteis, quando sadios, toleram a perda de 10% do volume total de sangue, ou seja, pode se colher uma quantia em mililitros correspondente à 1% do peso corporal (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; CAMPBELL; GRANT, 2022; SYKES; KLAPHAKE, 2015; THRALL, 2017), porém somente cerca de 0,2 a 1 ml, são necessárias para avaliação da maior parte dos parâmetros hematológicos (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; HERRIN, 2017).

Segundo Brown, Tristan e Heatley (2020), os locais de punção sanguínea mais comumente usadas em serpentes, em ordem decrescente de utilização, são: veia caudal ou coccígea ventral, ventrículos cardíacos e veias palatinas ou vertebrais.

De modo que, nesses animais, o sítio de escolha para colheita de sangue é a veia caudal ou coccígea ventral (KANDA; BRANDÃO, 2021; TROIANO, 2018), considerada a mais conveniente (STACY; HEARD; WELLEHAN, 2019) e a mais acessível (HARR, 2018).

Esse vaso sanguíneo pode ser localizado contiguamente ventral às vértebras coccígeas, como ilustrado nas Figuras 2 e 3 (HARR, 2018; HERRIN, 2017; KANDA; BRANDÃO, 2021; STACY; HEARD; WELLEHAN, 2019; TROIANO, 2018), distalmente à cloaca em 25 a 50% em relação ao comprimento desta até a ponta da cauda (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; CAMPBELL; GRANT, 2022) ou de seis a 12 escamas após a cloaca (SYKES; KLAPHAKE, 2015). O comprimento da agulha deve ser capaz de alcançar o corpo da vértebra coccígea e ter diâmetro adequado para a veia (HARR, 2018). Assim, ela pode ser atingida por agulhas de 25G a 22 G por 5/8 a 1½" de comprimento (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020), escolhidas de acordo com o tamanho corporal do animal (OLDFIELD, 2014), acopladas a seringas de 1 a 5ml (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020).

Figura 2 – Representação esquemática da localização anatômica da veia coccígea ventral em serpentes.



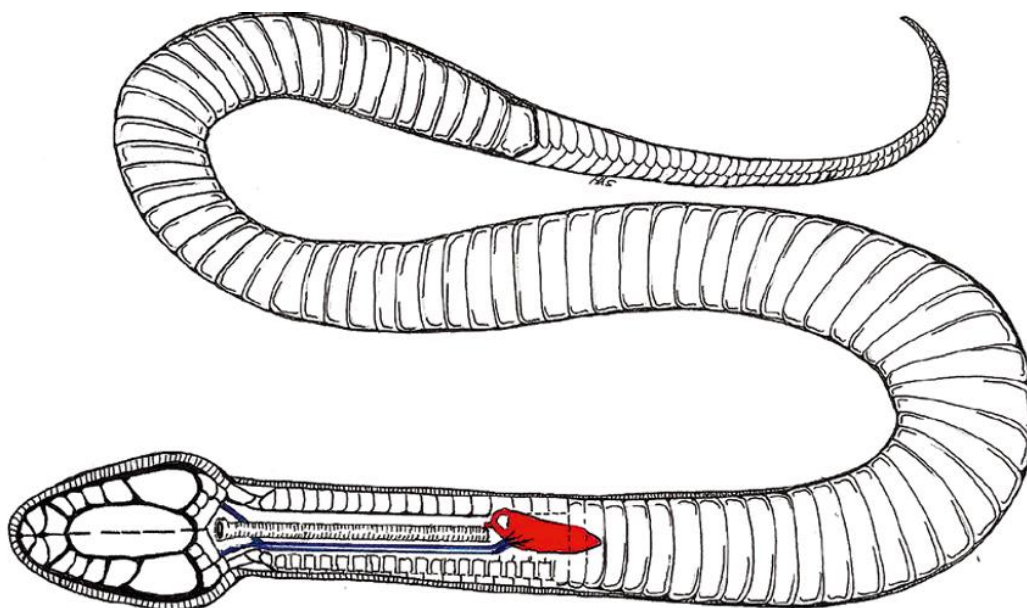
Fonte: BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020

Nesta técnica, com o animal em decúbito dorsal e cauda estabilizada e contida (TROIANO, 2018; OLDFIELD, 2014), a agulha é inserida craniodorsalmente sob a escama sagital mediana ventral da cauda em um ângulo de 45 a 90° e exerce-se pressão negativa na seringa. Deve-se progredir em direção à vértebra e caso essa

seja encontrada no trajeto, retira-se lentamente até o sangue fluir na seringa (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; KANDA; BRANDÃO, 2021; TROIANO, 2018). Ao se puncionar nesse local, deve-se evitar fazê-lo muito próximo à abertura da cloaca, a fim de prevenir traumas nos hemipênis masculino e glândulas anais de cheiro nas fêmeas (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020).

Outro sítio de punção venosa é a do seio vertebral cervical descrito por Zippel, Lillywhite e Mladinich (2001). Essa metodologia consiste na introdução de uma agulha 0,45 x 13mm - 26G ½" acopladas a seringas de 3 a 5 ml (RODRIGUES *et al.*, 2018; ÚNGARI *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2014) na região entre osso occipital e o atlas (VIEIRA *et al.*, 2014).

Figura 3 – Representação esquemática dos locais de colheita sanguínea em serpentes.



Fonte: Adaptado de THOMAS; LUMB, 2012

Além disso, pode-se optar pela venopunção cardíaca (Figura 3). A determinação da posição do coração pode ser feita à olho nu, palpação, uso de doppler vascular ou por meio do equipamento de ultrassom (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; HARR, 2018; KANDA; BRANDÃO, 2021; TROIANO, 2018). Esta vai variar de acordo com a espécie (HARR, 2018), dependendo das características fisiológicas e anatômicas de cada uma. Nos animais de hábitos terrestres e arborícolas, este órgão está situado entre 15% a 20% do CRC, enquanto que em

ofídios aquáticos, de 25 a 45% do mesmo referencial (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020).

Com o animal contido em decúbito dorsal e o coração imobilizado por pressão digital, a agulha (22 a 25G – 1 a 1½") é inserida imediatamente caudal ao coração, entre as escamas, em um ângulo de 45°. Ela é avançada craniodorsalmente em direção ao ventrículo e o sangue é colhido vagarosamente à cada batimento cardíaco (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020). Todas essas etapas devem ser feitas cautelosamente em animais muito ativos ou pode-se proceder a contenção farmacológica, a fim de evitar laceração cardíaca (HARR, 2018).

Enquanto a punção sanguínea por meio da veia caudal ventral pode resultar em algum grau de contaminação por linfa, através da cardiocentese, a possibilidade de isto acontecer é baixa, porém pode ocorrer a punção de líquido pericárdico (KANDA; BRANDÃO, 2021). Independente de qual líquido aspirado em conjunto com o sangue, a amostra apresentará, durante as análises hematológicas, uma diminuição de hematócrito, das proteínas plasmáticas, dos azurófilos e da contagem global de leucócitos (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; STACY; HEARD; WELLEHAN, 2019).

2.1.2.2 Conservação da amostra sanguínea de serpentes

O anticoagulante mais indicado para amostras sanguíneas de boa parte das espécies de répteis é a heparina (sódica ou lítica), visto que a utilização de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) causa hemólise, especialmente nos testudines. Outros artefatos produzidos por EDTA, além da lise dos eritrócitos, são a aglutinação e crenação dessas células, bem como alteração nas concentrações séricas de cálcio e outros metais, devido à sua propriedade quelante. Enquanto a heparina forma um filme de coloração azulada nos esfregaços sanguíneos que prejudica a observação celular, assim como induz a formação de agregados tromboleucocitários (CAMPBELL; GRANT, 2022; THRALL, 2017; SYKES; KLAPHAKE, 2015).

As alterações hematológicas decorrentes do tempo ou tipo de armazenamento são pouco estudadas (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020). Para répteis, de um modo geral, é aconselhado que as amostras sejam processadas em até 12 horas, visto que pode haver alterações dos componentes sanguíneos, devido à formação de

agregados plaquetários e de degranulação, lise e crenação leucocitária (ABOU-MADI; JACOBSON, 2003; MITCHELL; HERNANDEZ-DIVERS, 2009).

Outro fator de grande importância envolve a temperatura de armazenamento, que deve ser mantida em 4° C, a fim de proteger a membrana celular da fração celular do sangue, reduzindo o extravasamento de potássio do meio intracelular, gerando erros de interpretação. Essa redução de temperatura é capaz de diminuir o metabolismo eritrocitário, permitindo que essas células permaneçam por mais tempo íntegras (ABOU-MADI; JACOBSON, 2003; MITCHELL; HERNANDEZ-DIVERS, 2009).

Considerando esses dois fatores, tempo e temperatura de armazenagem, os autores Brown, Tristan e Heatley (2020) afirmam que, para as serpentes, as avaliações hematológicas efetuadas em até 24 h após a colheita, ou em tempo inferior, providas de sangue estocado à uma temperatura de 4°C rendem bons resultados.

2.1.2.3 Análises Hematológicas em répteis

Em um cenário ideal, a avaliação hematológica completa inclui a determinação do volume globular (VG ou hematócrito), contagem total de eritrócitos e reticulócitos, concentração de hemoglobina (Hb), índices hematimétricos e morfologia das células (CAMPBELL; GRANT, 2022; HEATLEY; RUSSELL, 2020). Por meio de seus resultados, o clínico é capaz de identificar alterações, por vezes patológicas, como condições anêmicas, enfermidades inflamatórias, presença de hemoparasitas, transtornos hematocitopoiéticos e distúrbios hemostáticos (CAMPBELL; GRANT, 2022).

As condições ambientais e outros fatores externos são capazes de modificar a resposta do organismo à doença, exacerbando-a ou inibindo-a, de modo que essas informações devem ser levadas em consideração nas avaliações hematológicas. Outro ponto a ser considerado é a imprevisibilidade mais acentuada da resposta celular em répteis, quando comparada com mamíferos, que possuem mais estabilidade no microambiente das células (CAMPBELL; GRANT, 2022; FUDGE, 2000).

Além disso, outros fatores, estes mais intrínsecos aos indivíduos, como idade, gênero, estado nutricional, fisiológico e ser de cativeiro ou de vida livre, podem interferir nos parâmetros hematológicos (CAMPBELL; GRANT, 2022; FUDGE, 2000).

Os resultados destas avaliações também podem divergir devido a variações durante a colheita sanguínea, como local de venopunção, manipulação e acondicionamento das amostras, anticoagulante utilizado e contaminação por linfa ou líquido. Mais diferenças podem surgir de acordo com a metodologia aplicada, qualidade de controle e acurácia dos processos, e experiência do manipulador (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; CAMPBELL; GRANT, 2022).

Atualmente o estudo hematológico de répteis ainda está em seus primórdios, de modo que trabalhos científicos costumam ser esparsos, enquanto que as informações anedóticas são abundantes (SYKES; KLAPHAKE, 2015). Neste mesmo cenário, as avaliações das variações fisiológicas como um todo são escassas, devendo ser estudadas visto que são indicadores essenciais da saúde dos animais (CAIXETA *et al.*, 2015; TURKSON; GANYO, 2015).

2.1.3 Hemoglobina

Segundo Grispo e outros pesquisadores associados (2012), além de outros estudiosos, dentre as proteínas, a hemoglobina (Hb) é a mais analisada e estudada pelos cientistas com relação à sua estrutura e função. Ainda as inúmeras pesquisas comparativas de suas isoformas e atuações nas mais diversas espécies de animais não humanos contribuem para o avanço do conhecimento (LEI *et al.*, 2020; WAHEED *et al.*, 2016).

Essa proteína respiratória fundamental tem como função primordial o transporte de oxigênio (O₂) das estruturas corpóreas responsáveis pela respiração, como pulmões, brânquias e superfície tegumentar, em direção a todas as células do corpo. Além disso, faz um transporte inverso de dióxido carbônico (CO₂), metabólito da oxidação ocorrida durante a respiração celular (MIYATA *et al.*, 2020; STORZ; OPAZO; HOFFMANN, 2013; STORZ, 2019).

A Hb nos gnastomados (vertebrados com mandíbula) possui uma configuração tetramérica, constituída de duas subunidades polipeptídicas α e duas β ($\alpha_2\beta_2$), cada qual associada a um grupo heme. Este possui um íon ferro central em um anel de potroporfirina, que por sua vez se liga de modo reversível ao O₂, quando está no estado ferroso (Fe²⁺) (STORZ, 2016; STORZ, 2019).

O grupo prostético heme, por si só, pode se ligar imutavelmente à molécula de oxigênio (STORZ, 2019), quando duas moléculas livres desse composto se unem ao

O₂, promovendo a conversão irreversível de íon ferroso para férrico (Fe³⁺). Porém quando associado à globina, o íon ferroso fica protegido pelo grupo heme no interior da globina (NELSON; COX, 2021; STORZ, 2019), de tal forma que essa reação não é permitida. De maneira pormenorizada, quando o heme está livre sua conformação estrutural permite que o Fe²⁺ fique disponível para duas ligações dativas. Quando no interior da globina, uma dessas ligações é ocupada pela histidina proximal (His F8) e outra fica disponível para ligação com a molécula de oxigênio (NELSON; COX, 2021; THOMAS; LUMB, 2012).

Além disso, a histidina distal, molécula localizada na posição 89 da cadeia α-globina, promove impedimento estérico, protegendo a oxidação do íon ferroso para férrico por outros constituintes da globina, bem como ajuda na prevenção à ligação irreversível de monóxido de carbono (CO) no sítio do grupo heme (THOMAS; LUMB, 2012). Isso ocorre, pois a histidina distal (His E7), apesar de não coordenar com o ferro central da protoporfirina, se relaciona com o ligante do grupo heme através de ligação de hidrogênio. Enquanto que essa interação ocorre com o oxigênio, esta pode ser impedida quando se trata de CO, de modo que, apesar de se ligar 200 vezes melhor que O₂ ao íon ferroso, há uma redução seletiva de sua ligação ao grupo prostético (NELSON; COX, 2021).

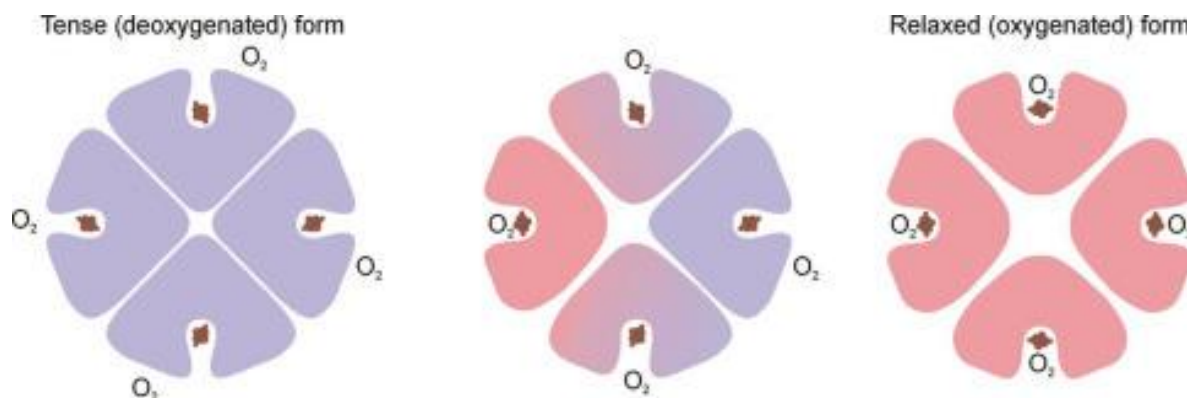
Ainda, a ligação coordenada do íon ferroso com o oxigênio, ao invés da ligação deste último com as duas valências deste primeiro, também é fundamental para reversibilidade do sistema. Além disso, permite o transporte de oxigênio molecular, em detrimento ao iônico, que quando disponibilizado nos tecidos permanece nesse formato (HALL; HALL, 2021).

A atividade alostérica da hemoglobina, ou seja, a sua ligação cooperativa ao ligante, permite que mesmo que ela se associe ao O₂ com alta afinidade nos órgãos respiratórios de modo eficaz, devido à alta pressão dessa molécula (pO₂) nesses locais, ela consiga liberar eficientemente o oxigênio nos tecidos por apresentar diminuta atração, onde a pressão pO₂ é baixa. Todo esse mecanismo é possível graças à capacidade desse pigmento respiratório de transicionar de um estado de reduzida à alta afinidade (STORZ, 2019; NELSON; COX, 2021).

Resumidamente, quando a Hb está em seu estado desoxigenado (estado T), sua afinidade ao oxigênio é baixa. À medida que o O₂ se liga à primeira subunidade, as outras mudam ligeiramente sua conformação, propiciando um aumento gradativo de afinidade, conforme cada grupo heme recebe o seu ligante, até que todos estejam

preenchidos e a afinidade se torne alta, no estado R, como ilustrado na Figura 4 (STORZ, 2019; NELSON; COX, 2021).

Figura 4 – Representação esquemática das transições entre o estado tenso (estado T) e relaxado (estado R) da proteína hemoglobina.



Fonte: THOMAS; LUMB, 2012

Nos órgãos respiratórios, a hemoglobina se torna oxihemoglobina (oxiHb) e passa a ter alta afinidade ao oxigênio, como explicado anteriormente. Ao chegar nos tecidos, caso haja abundância de O_2 , a oxiHb não liberta suas quatro moléculas de oxigênio. Porém, caso este composto esteja reduzido nos tecidos, esse pigmento respiratório liberará para o meio o O_2 , a fim de reestabelecer sua concentração no meio extracelular (HALL; HALL, 2021).

2.1.3.1 Histórico evolutivo da Hemoglobina

À medida que os organismos foram evoluindo, a globina primitiva dos primeiros seres, estes unicelulares e anaeróbicos, evoluiu da provável função de desintoxicação, por meio do sequestro de oxigênio e enzimas relacionadas, para a de transporte e armazenamento do oxigênio (STORZ; OPAZO; HOFFMANN, 2013). Nesse período, as primeiras bactérias possuíam as flavohemoglobinas (FHbs) e globinas domínio único semelhantes à FHbs (Fgbs), pertencentes à família F. Assim, em uma época desprovida de abundância de oxigênio, essa molécula se tornava tóxica à vida das células, que precisavam se livrar desse composto, papel provavelmente desempenhado por essas proteínas (KEPPNER *et al.*, 2020).

Ao passo que os organismos se tornaram mais complexos, multicelulares e aeróbicos, o uso de pigmentos respiratórios semelhantes à globina se tornou

essencial para o transporte e armazenamento de O_2 (STORZ; OPAZO; HOFFMANN, 2013). Isso ocorreu devido ao surgimento de organelas responsáveis por produzir energia e o O_2 , antes perigoso para as células, se tornou um exímio catabólito, potencializador do metabolismo energético desses seres (KEPPNER *et al.*, 2020).

Segundo Keppner e seus associados (2020), levando estes processos em consideração, propõe-se que as globinas dos eucariotos possuem como origem uma linhagem bacteriana. Por meio desta, se transferiu horizontalmente os genes responsáveis pela formação dessa proteína, utilizando-se dos mesmos eventos endossimbióticos ocorridos para originar as mitocôndrias e cloroplastos, a partir de uma α -proteobactéria e uma cianobactéria.

À mais de 500 milhões de anos atrás, no início da era Paleozóica, os vertebrados se irradiaram nos mais diversos habitats e evoluíram seus comportamentos, formas de locomoção e fisiologia de maneiras diferentes (PHILIPSEN; HARDISON, 2018; STORZ, 2019). Nesse período, denominado de explosão Cambriana, grandes animais surgiram, de modo que a difusão de oxigênio se tornou ineficaz (BURMESTER; HANKELN, 2014). Por isso, a evolução desses organismos seria completamente distinta do que é atualmente, caso a Hb não fosse utilizada como molécula de transporte de gases (STORZ, 2019). Assim, o metabolismo energético aeróbio dos vertebrados ancestrais era dependente do uso da Hb como pigmento respiratório (STORZ; OPAZO; HOFFMANN, 2013; STORZ, 2016).

Segundo Storz (2016; 2019), as demandas de oxigênio por esses organismos móveis e consideravelmente grandes só foram atendidas pelo aumento de pressão de O_2 no sangue graças à hemoglobina. O transporte de oxigênio para todo o organismo não poderia mais depender da difusão passiva de gases no sangue, sendo somente possível para seres unicelulares e pequenos animais (STORZ; OPAZO; HOFFMANN, 2013; STORZ, 2016; STORZ, 2019). No entanto, a exceção à essa regra são os peixes-gelo da família Channichthyidae (STORZ; OPAZO; HOFFMANN, 2013; STORZ, 2016; STORZ, 2019), que transportam o O_2 convectivamente através de um sistema de circulação fechada (STORZ, 2019).

A hemoglobina surgiu devido a dois eventos de duplicação do genoma na linhagem dos vertebrados (WAHEED *et al.*, 2016; STORZ, 2019). A separação entre hemoglobina e globina, permitiu a divisão fisiológica das suas atividades, sendo responsáveis pelo transporte e pelo armazenamento de oxigênio, respectivamente

(WAHEED *et al.*, 2016). A bifurcação entre essas duas proteínas ocorreu provavelmente à 0,7 bilhões de anos atrás, após o primeiro evento de duplicação do genoma (ALMEIDA, 2016; LEI *et al.*, 2020), entre a segmentação de plantas e animais (~ 1 bilhão de anos atrás) e a ramificação entre vertebrados e invertebrados (~ 0,6 bilhões de anos) (ALMEIDA, 2016).

O segundo evento de duplicação, cerca de 450 milhões de anos, possibilitou a diferenciação dos genes da α - e β -globina e, conseqüentemente, permitiu a formação tetramérica da hemoglobina (STORZ, 2019). Isso ocorreu, coincidentemente, na divisão entre agnatos e gnastomatos (MIYATA *et al.*, 2020; STORZ, 2016). As hemoglobinas de ambos esses clados evoluíram independentemente, no Período Cambriano, a partir de genes ancestrais diferentes. Porém, ambas confluíram para uma expressão parecida nas células vermelhas do sangue (ROHLFING *et al.*, 2016). Conforme Miyata *et al.* (2020), esse padrão foi possível pela expressão mútua do gene NPRL3, que regulou similarmente ambos os genes distintos responsáveis pela formação de Hb nesses animais.

Os répteis, de um modo geral, evoluíram fisiologicamente de um modo que a demanda energética e o gasto para a movimentação de oxigênio no sangue fossem reduzidos. Para este fim, se adaptaram à ectotermia e a reduzidas taxas metabólicas de manutenção da vida, assim como à uma condução termorreguladora de O₂, o que propicia elasticidade da viscosidade do sangue, modificação da afinidade e capacidade de oxigênio e ajustes na sensibilidade da oxigenação do sangue mediada pela temperatura (WAHEED *et al.*, 2016).

As serpentes, por sua vez, possuem divergências na exigência tecidual de O₂ de acordo com a temperatura corpórea, que modifica a afinidade ao oxigênio, ao exercício físico, as condições do ambiente e estados fisiológicos (WAHEED *et al.*, 2016; WAHEED; DOMAN; AHMED, 2018). Além disso, os esquamados apresentam um mecanismo de regulação na qual, de acordo com o estágio do desenvolvimento, isoformas diferentes da hemoglobina (isoHb) são expressas (WAHEED; DOMAN; AHMED, 2018; STORZ, 2019). As serpentes adultas apresentam réplicas únicas de α -globinas, α^D ou α^A , enquanto que β -globinas são provenientes de genes duplicados, β^I e β^{II} (WAHEED *et al.*, 2016; WAHEED; DOMAN; AHMED, 2018).

2.1.3.3 Métodos de mensuração da concentração de hemoglobina

2.1.3.3.1 Método de Cianometahemoglobina

Segundo Ranzani-Paiva e colaboradores (2013), nesse método de medição da hemoglobina, o sangue é diluído na solução de Drabkin, que contém: ferrocianeto de potássio (100 mg); bicarbonato de sódio (2 mg); cianeto de potássio (50 mg) e 1 L de água destilada. O agente de lise libera a hemoglobina dos eritrócitos. O ferrocianeto de potássio oxida o íon ferroso do grupo heme da hemoglobina para íon férrico, formando a metahemoglobina. Após isso, o cianeto de potássio converte este último em cianometahemoglobina (HiCN) (KEOHANE; OTTO; WALENGA, 2020; RAPPAPORT *et al.*, 2020).

O composto formado nessa reação é um cromóforo estável, no qual a intensidade de sua cor está proporcionalmente relacionada à concentração de hemoglobina. Esta é medida pela técnica de espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm e comparada a uma leitura padrão (KEOHANE; OTTO; WALENGA, 2020). Para mensuração da Hb de répteis, aves e peixes, essa técnica é levemente modificada, sendo que após a mistura com o reagente, essa solução deve ser centrifugada a 3.500 RPM por 5 min e o sobrenadante que deve ser analisado (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; CAMPBELL; GRANT, 2022; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Essa metodologia é vantajosa, pois utiliza apenas uma solução para a reação e quase todos os derivados de hemoglobina são medidos, como a desoxi-Hb, oxi-Hb, carboxi-Hb, hemoglobina fetal e parte da sulfemoglobina. Além disso, a lei de Lambert-Beer pode ser usada em uma ampla faixa de absorção e visto que a HiCN é um composto estável, medições podem ser realizadas logo após ou até dias após a mistura do sangue com o reagente (ZANDER; LANG; WOLF, 1984).

2.1.3.3.2 Método Modificado de Hematina Alcalina (MAHD)

Este método envolve a conversão pelo detergente não-iônico de todos os derivados de hemoglobina, metahemoglobina, desoxi-Hb, oxi-Hb, carboxi-Hb, hemoglobina fetal e sulfemoglobina, em um composto final, a clorohemina, que fica

estável por vários dias (ZANDER; LANG; WOLF, 1984). O reagente possui notável estabilidade por 1 ano, sensibilidade à luz e é de fácil manuseio (O'HALLORAN; FINBARR DUGGAN; MYERS, 1987).

Como procedimento padrão, 20 µl da amostra sanguínea é homogeneizada com 3 ml de reagente MAHD, composto de 25 g de Triton X-100 e 1 L de NaOH (0,1 mol/L) e a leitura da absorbância é feita a 575 nm (O'HALLORAN; FINBARR DUGGAN; MYERS, 1987; ZANDER; LANG; WOLF, 1984). A hemólise acontece imediatamente à mistura e toda a amostra estará hemolisada em poucos segundos (ZANDER; LANG; WOLF, 1984).

Como vantagem desta metodologia, Zander, Lang e Wolf (1894) citam a estabilidade do reagente, a conversão completa de todos os derivados hemoglobínicos em um único produto final que pode ser facilmente medido, baixos custos na fabricação do reagente e inocuidade do sistema, visto que não se utiliza nenhum composto tóxico.

2.1.3.3.3 Método do Lauril Sulfato de Sódio (SLS)

O SFS é um agente surfactante capaz de lisar as membranas dos eritrócitos e liberar a hemoglobina. O ingrediente ativo, dodecil sulfato de sódio (SDS), converte todos os derivados de hemoglobina em metahemoglobina e, posteriormente, se une à esta, formando o complexo estável SLS-hemoglobina (ARCOT *et al.*, 2021; LEWIS *et al.*, 2008; KEOHANE; OTTO; WALENGA, 2020 OSHIRO; TAKENAKA; MAEDA, 1982;).

Para esse método, 25 µL de sangue são adicionados à 5 ml de SLS (2,08 mmol/L, pH 7,2) e após a reação, o cromóforo formado é medido colorimetricamente no comprimento de onda de 539 - 555 nm, que corresponde à hemoglobina pela lei de Lambert-Beer (ARCOT *et al.*, 2021; LEWIS *et al.*, 2008; KEOHANE; OTTO; WALENGA, 2020; OSHIRO; TAKENAKA; MAEDA, 1982).

2.1.3.3.3 Analisadores Hematológicos Automáticos

Os analisadores hematológicos automatizados propiciaram uma alta precisão na dosagem, melhoraram o fluxo de trabalho, por aumentar a produtividade das análises. No entanto, para um funcionamento satisfatório, é necessária manutenção

constante e regular, calibração periódica do equipamento, treinamento dos técnicos e estabilidade climática (CHAUDHARY; DUBEY; SONKER, 2017).

A determinação da hemoglobina por esses equipamentos varia. Alguns utilizam o método da cianometahemoglobina ou uma modificação deste, no qual se quantifica a HiCN em comprimento de onda de 540 nm, como já explicado anteriormente. Outros analisadores diluem a amostra sanguínea em uma solução aquosa de EDTA e injeta ar nessa solução, de modo a converter a Hb em oxihemoglobina. Então, a absorbância da amostra é medida em 540 nm (CHAUDHARY; DUBEY; SONKER, 2017).

Com a sofisticação dos métodos, nas últimas décadas, os equipamentos passaram a usar métodos livres de cianeto (CHAUDHARY; DUBEY; SONKER, 2017; KEOHANE; OTTO; WALENGA, 2020), visto que ele é tóxico para os manipuladores e meio ambiente (MAGNO; MIGUITA; OSHIRO, 2017; MOHAPATRA; BHATIA; PARIDA, 2018; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Assim, reagentes como o lauril sulfato de sódio (SLS) foram incorporados na metodologia dos analisadores (CHAUDHARY; DUBEY; SONKER, 2017; KEOHANE; OTTO; WALENGA, 2020).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 16 indivíduos de *Bothrops atrox*, sete fêmeas (massa corporal média de ~ 1,90 kg, 6 anos de idade) e nove machos (massa corporal média de ~ 0,740 kg, 6 anos de idade). Os animais foram considerados hígidos por meio da avaliação de escore corporal, da coloração e umidade das mucosas. Estes eram provenientes do criatório comercial para extração de peçonha de serpentes Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação LTDA (grupo DSM), Uberlândia, Minas Gerais, cujo número de registro junto ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) é 11904.

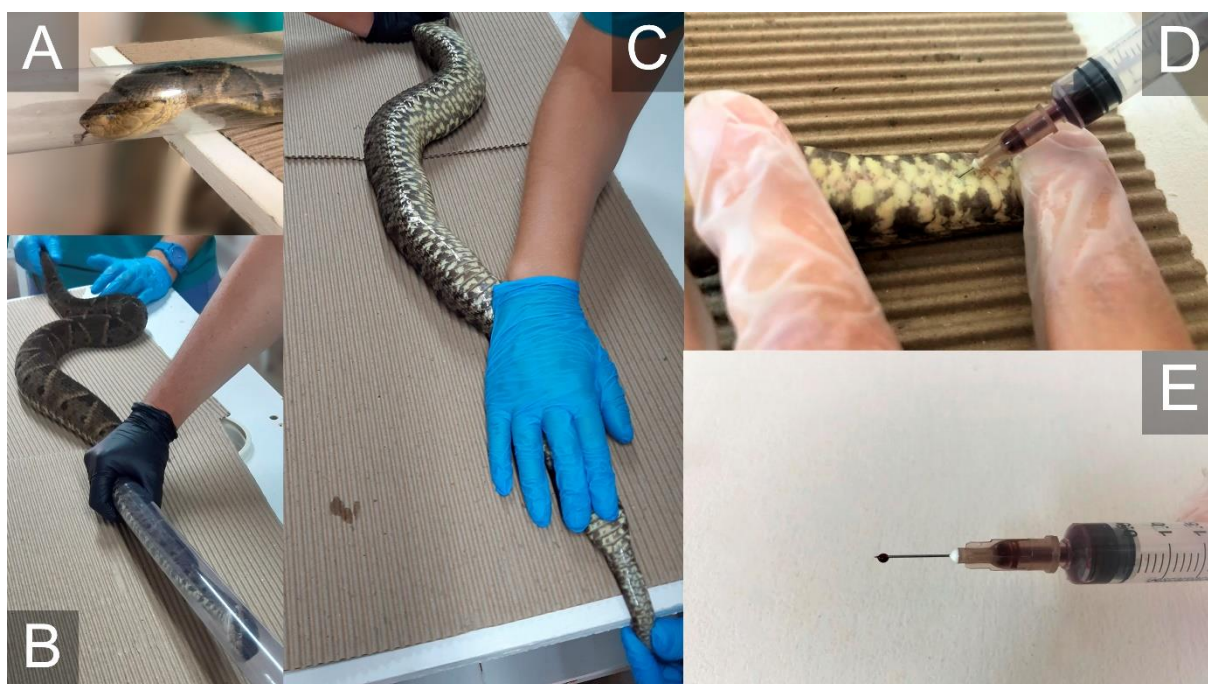
Os procedimentos realizados conduziram-se em acórdância com os preceitos éticos em pesquisa com utilização animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com aquiescência do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo nº 040/19 e sua aprovação no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), número 69416-5 e SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), número de cadastro AF8A99F.

3.2 COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Para a colheita de amostras biológicas, os animais foram imobilizados em cama de espuma com o uso de gancho e contidos fisicamente com o uso de tubo de contenção transparente (Figura 5a e 5b), seguindo a técnica de Passos (2009). Após a contenção, com a serpente em decúbito dorsal (Figura 5c), foi feita a antisepsia com gaze embebida em Álcool 70° em região caudal à cloaca, conforme descrito por Sykes e Klaphake (2015). A colheita se deu pela venopunção da veia coccígea ventral, com auxílio de seringas de 3 ml acopladas a agulhas com 0,45 mm de diâmetro por 13 mm de comprimento - 26 G ½" (Figura 5d e 5e). O volume total de sangue extraído foi menor que 1% do peso corporal do indivíduo, não ultrapassando 0,10 ml por indivíduo.

Metade do volume sanguíneo colhido foi depositado em microtubo (0,5 ml) contendo EDTA K2 e o restante em microtubo contendo heparina sódica. As amostras foram acondicionadas, durante todo o período de processamento em geladeira, sob refrigeração de 4 °C.

Figura 5 – Fotografia de *Bothrops atropx* fêmea. A e B – Técnica de contenção em serpentes com tubo transparente. C – Animal em decúbito dorsal para colheita sanguínea. D – Colheita sanguínea na veia coccígea ventral. E – Amostra sanguínea colhida



Fonte: A, D e E – Gentilmente cedida pela Me. Heloísa Castro Pereira. B e C – Da autora.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

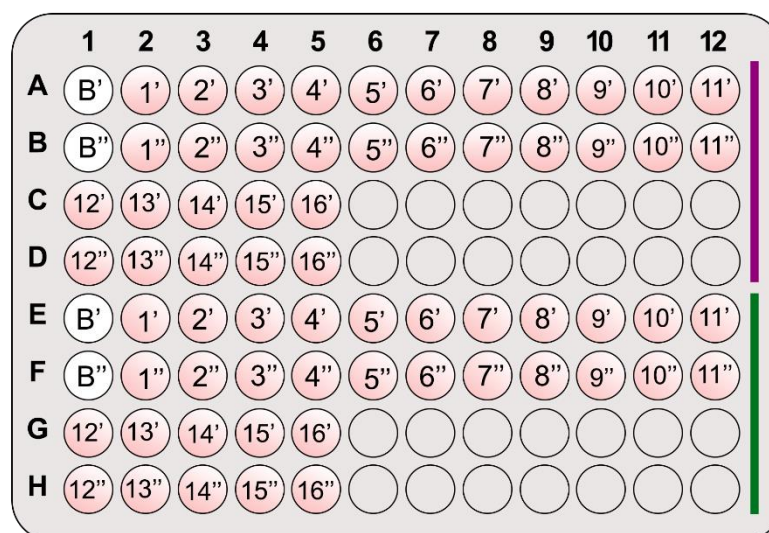
3.3.1 Dosagem de Hemoglobina pelo método da Cianometahemoglobina (Hbc) e Estabilidade Analítica

Para esta metodologia, adicionou-se 10µl de sangue total, previamente homogeneizado, em 2,5 ml de solução de Drabkin, baseado em MACHADO e colaboradores (2021). A mistura resultante foi centrifugada por 5 minutos na velocidade de 3.500 RPM (Rotações Por Minuto) na Centrífuga Sorológica 32/15 3.5 (INBRAS®).

Para o preenchimento da microplaca de microtitulação, 300 µl da solução de Drabkin foi colocada no primeiro poço, como branco, e o mesmo volume do sobrenadante da mistura centrifugada anteriormente (sangue+reagente) foi pipetada nos poços posteriores (Figura 5). Todas as amostras e o branco foram colocadas em duplicata e a absorbância foi lida a 540 nm no Leitor de placas multi-modo EnSpire™2300 (PerkinElmer Inc.).

Essas etapas foram desenvolvidas para amostras acondicionadas em EDTA K2 e em heparina sódica.

Figura 5 – Representação esquemática do preenchimento da microplaca com as amostras sanguíneas, com EDTA K2 (traçado roxo) ou com heparina sódica (traçado verde), diluídas na solução de Drabkin.



Fonte: A autora.

Notas: B (branco). Números denotam indivíduos diferentes. Apóstrofo e aspas denotam duplicatas do mesmo indivíduo. EDTA K2: A – D (1 – 12). Heparina sódica: E – H (1-12)

3.3.2 Dosagem de Hemoglobina pelo Analisador Hematológico Automático (Hb_H)

O volume de 13 µl do sangue total, acondicionado em microtubo contendo EDTA K2, foi pipetado pelo Hematoclin 2.8 VET (Quibasa-Bioclin) por meio da sonda de amostra, após se pressionar a tecla de aspiração. Segundo o fabricante, à essa quantidade inicial, adicionou-se 3,5 ml de diluente e 0,5 ml do reagente de lise. Este último converte a hemoglobina em um complexo estável, que foi medido por um

sensor de luz a 525 nm. A Hb (g/dL) é calculada pela fórmula abaixo (QUIBASA / BIOCLIN, 2021).

$$Hb \text{ (g/dL)} = Constante \times \log_{10} \left(\frac{\text{Corrente de Luz do branco}}{\text{Corrente de luz da amostra}} \right)$$

3.3.3 Mensuração do hematócrito

Tubos capilares de vidro, de 75 mm de comprimento por 1 mm de diâmetro, foram preenchidos com sangue total até $\frac{3}{4}$ de sua capacidade, vedados em uma das extremidades por meio de aquecimento com chama de mini-maçarico e centrifugados por 5 minutos em uma velocidade de 10000 RPM. Por meio de cartão de hematócrito (Hc), foi possível quantificar o volume globular. Este procedimento foi realizado tanto para amostras com EDTA K2, quanto para as com heparina sódica.

3.3.4 Hemoglobina calculada

A concentração da hemoglobina de cada indivíduo, acondicionada em EDTA K2, foi calculada, segundo convencionado pelos patologistas clínicos, autores e cientistas (TURKSON; GANYO, 2015; BARGER; MACNEILL, 2015; SUTTON; SELLON, 2012), conforme fórmula a seguir:

$$Hb_{CV} \text{ (g/dL)} = \frac{\text{Hematócrito (Hc, \%)}}{3}$$

Além disso, com base nos dados obtidos pelo método de cianometahemoglobina e dos hematócritos de amostras de sangue com EDTA K2, propôs-se uma fórmula de regressão linear na configuração $Hb_R \text{ (g/dL)} = \text{coeficiente angular} \times Hc + \text{coeficiente linear}$, pelo qual as concentrações de hemoglobina de cada indivíduo foi calculada.

3.3.5 Estabilidade Analítica da Hemoglobina

Para verificar a influência do tempo de armazenamento na mensuração da concentração de hemoglobina, a dosagem da Hb pelo método de cianometahemoglobina, para ambos os anticoagulantes, foi efetuada em três tempos: T0 (24h); T1(48h) e T2 (72h).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos dados obtidos e a confecção dos gráficos foram realizados por meio do software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, EUA). A normalidade das informações foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% e considerou-se que os resultados eram pareados e seguiam distribuição normal.

Para comparação das médias, os dados adquiridos, com base em amostras em EDTA K2, por meio dos diferentes métodos de dosagem e das concentrações hemoglobínicas calculadas (método da cianometahemoglobina [Hb_C], analisador hematológica automático [Hb_H], hemoglobina calculada por meio da convenção [Hb_{CV}] regressão linear [Hb_R]), foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5%.

Além disso, a relação estatística entre estas variáveis foi realizada por meio da correlação de Pearson a 5%. Ainda, para os resultados obtidos pelo método da cianotometahemoglobina (Hb_C) e do Hematoclin 2.8 VET (Hb_H), de amostras em EDTA K2, propôs-se uma fórmula de regressão linear para correção dos valores obtidos pela segunda metodologia, na configuração $Hb_C (g/dL) = \text{coeficiente angular} \times Hb_H (g/dl) + \text{coeficiente linear}$.

A fim de comparar as médias obtidas em cada tempo de dosagem pelo método HiCN (T0; T1; T2) de amostras de cada anticoagulante utilizado (EDTA K2 ou heparina sódica), os valores adquiridos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5%.

Por fim, para confrontar as médias obtidas para cada anticoagulante (EDTA K2 ou heparina sódica), cujas amostras foram dosadas pelo método da cianometahemoglobina (T0), realizou-se um teste t pareado a 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e respectivos DP (desvio padrão), referentes à *Bothrops atrox*, bem como número amostral para cada sexo, estão relacionados na tabela 1. Observa-se baixa variabilidade dessas variáveis tanto para machos quanto para fêmeas indicando homogeneidade dos atributos biométricos e aspectos biológicos dos animais utilizados no experimento.

Tabela 1 – Descrição geral dos dados obtidos para serpentes *Bothrops atrox*, com relação à idade, comprimento e massa corporal (média $\pm$ DP)

Variáveis	Animais	
	Fêmea	Macho
n	7	9
Idade	6 ± 0	6 ± 0
Comprimento	$1,39 \pm 0,094$	$1,15 \pm 0,073$
Massa corporal	$1,89 \pm 0,115$	$0,74 \pm 0,225$

Nota: n (número de amostras). Unidades de medida: Idade (anos); Comprimento (metros) e Massa corporal (kg).

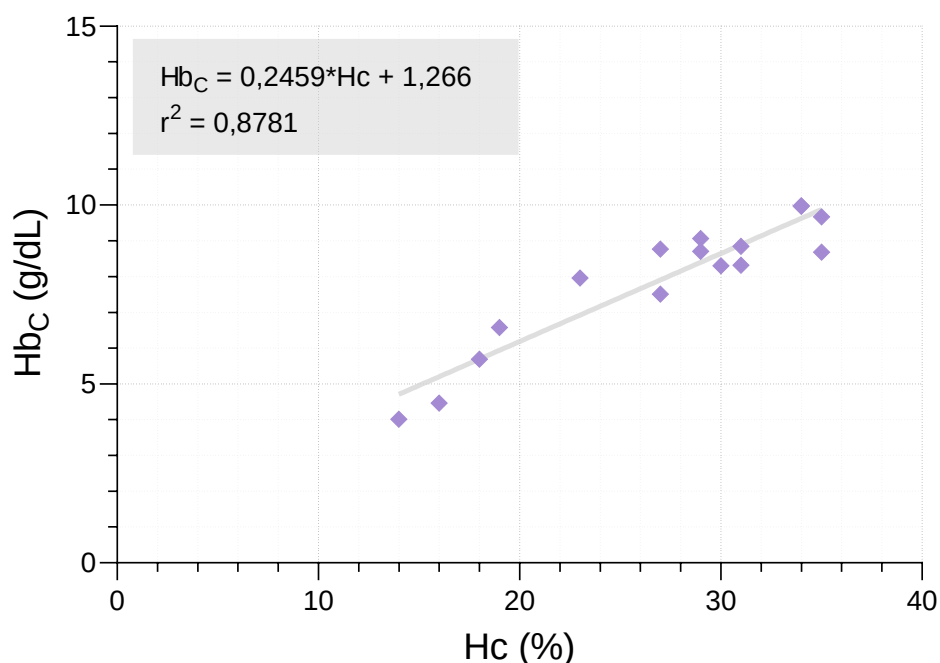
Com relação à análise de regressão relacionando as concentrações de hemoglobina plasmática com o hematócrito, de amostras armazenadas em microtubos com EDTA K2, verificou-se uma relação linear positiva e significativa ($p < 0,0001$) entre essas variáveis, a qual foi representada por $Hb_C = 0,2459 \times Hc + 1,266$ com coeficiente de determinação de $r^2 = 0,8781$ (Gráfico 1).

Por meio do coeficiente de determinação obtido, foi possível afirmar que 87,81% da variação da concentração de hemoglobina plasmática para serpentes *Bothrops atrox* é explicada pelo hematócrito. Esse resultado é importante, pois permite que através de um teste hematológico mais simples e atóxico obtenha-se a concentração de hemoglobina desses animais a partir da fórmula $Hb_C = 0,2459 \times Hc + 1,266$.

Nesse íterim, a mesma relação linear foi observada por Turkson e Ganyo (2015), que definiram para bovinos a fórmula $Hb_C = 0,2762 \times HC + 3,1105$, com coeficiente de determinação $r^2 = 0,5504$, valor bem inferior ao inferido no presente experimento. Com a mesma constatação, Velguth, Payton e Hoover (2010) estabeleceram a fórmula $Hb = 0,30 \times Hc + 0,46$ ($r^2 = 0,83$) para aves das ordens Anseriformes, Columbiformes, Falconiformes, Galliformes, Passeriformes,

Psittaciformes, Sphenisciformes e Strigiformes. Para os flamingos, os mesmos autores, propuseram a expressão matemática $Hb = 0,217 \times Hc + 6.692$ ($r^2 = 0,793$).

Gráfico 1 – Gráfico de dispersão das concentrações hemoglobínicas determinadas pelo método de cianometahemoglobina versus hematócrito para amostras sanguíneas de *Bothrops atrox*, acondicionadas em EDTA K2.



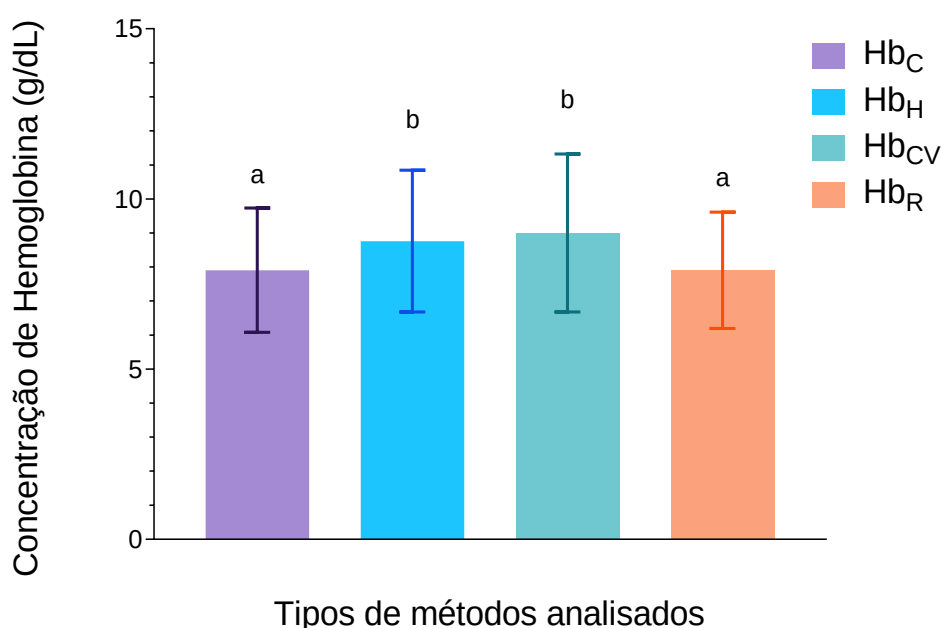
Notas: Dosagem de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (Hb_C) no T0, hematócrito (Hc), r^2 (coeficiente de determinação).

Ao se comparar a diferença entre as médias de Hb_C ($7,91 \pm 1,83$ g/dL), Hb_H ($8,76 \pm 2,09$ g/dL); Hb_{CV} ($9,00 \pm 2,32$ g/dL) e Hb_R ($7,91 \pm 1,71$ g/dL), de amostras conservadas com EDTA K2, verificou-se uma desigualdade significativa entre essas ($p < 0,0001$), de modo que o método de cianometahemoglobina e a hemoglobina plasmática calculada pela fórmula de regressão linear não possuíram diferença estatística entre si ($p > 0,9999$), porém ambas foram significativamente diferentes ($p < 0,0001$) de Hb_H e Hb_{CV}. Por sua vez, estas últimas variáveis obtiveram médias estatisticamente equivalentes, com $p = 0,4390$ (Gráfico 2).

Observou-se, em *Bothrops atrox*, superestimação dos valores obtidos por um terço do hematócrito e pelo analisador hematológico em relação à metodologia padrão (Hb_C) e, em bovinos, houve subestimação das concentrações de hemoglobina plasmáticas calculadas pelo terço do hematócrito (TURKSON; GANYO, 2015). Já em humanos, o contrário ocorreu, de modo que os dados relativos à hemoglobina

calculada foram maiores que as laboratorialmente determinadas (CARNEIRO *et al.*; 2007; RODRÍGUEZ-MORALES *et al.*, 2007). Assim, a determinação desse parâmetro por meio do terço do hematócrito, não só no presente estudo, mas também nos acima exemplificados, é falha para algumas espécies. Portanto, a sua utilização deve ser estudada caso a caso.

Gráfico 2 – Média das concentrações de hemoglobina determinadas para cada metodologia aplicada, em amostras sanguíneas de *Bothrops atrox* acondicionadas com EDTA K2



Notas: Método da cianometahemoglobina (Hb_C), analisador hematológico automático (Hb_H), hemoglobina calculada por meio da convenção (Hb_{CV}) e regressão linear (Hb_R). Médias sinalizadas com letras distintas possuem diferença estatística pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

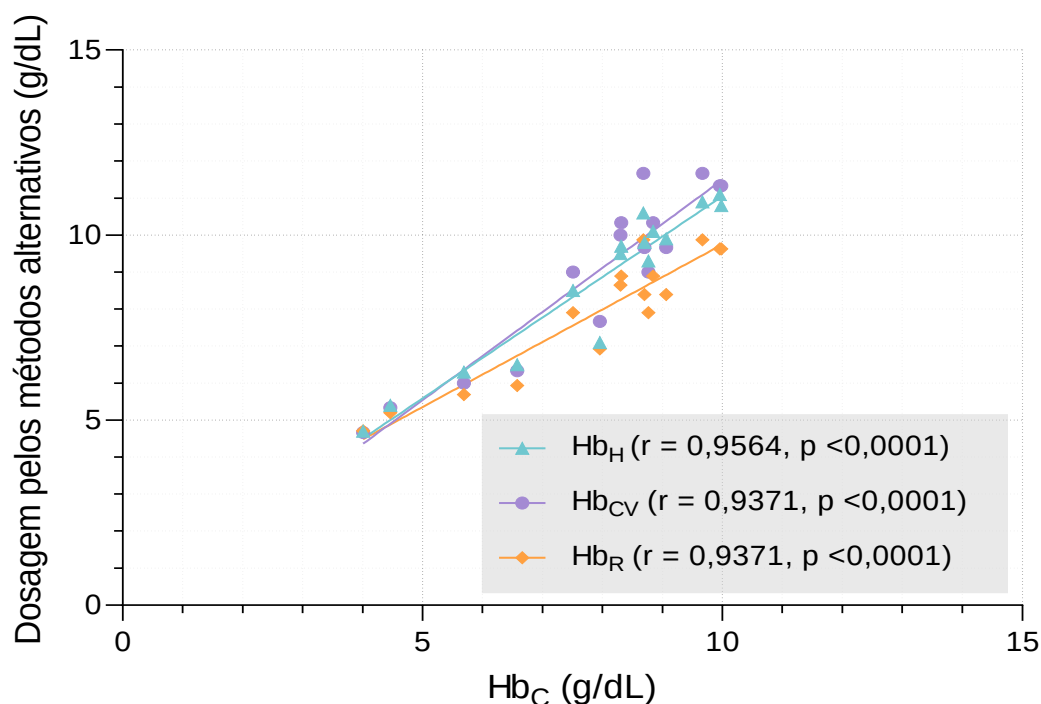
Presume-se que os valores superestimados pelo analisador hematológico Hematoclin 2.8 VET estão relacionados ao aumento da densidade óptica ocasionada pelos núcleos dos eritrócitos suspensos após a lise eritrocitária, elevando erroneamente a concentração de hemoglobina plasmática (LILLIEHÖÖK *et al.*, 2004). No método tradicional, esse viés é evitado pela centrifugação prévia da amostra misturada com a solução de Drabkin e pela pipetagem apenas do sobrenadante (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; CAMPBELL; GRANT, 2022; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Um modo alternativo para solucionar o problema acima descrito foi indicado por Stacy e seus colaboradores (2019). Neste estudo, o congelamento das amostras sanguíneas de *Dermochelys coriácea* (tartaruga-de-couro), - 80 °C, foi capaz de romper todas as membranas celulares, e quaisquer resquícios de cromatina residuais não interferiram na análise colorimétrica da hemoglobina pelo HemoCue ®Hb 201 (HemoCue ®, Inc.). Visto que os resultados da dosagem das amostras congeladas-descongeladas e apenas homogeneizadas não diferiram estatisticamente ($p = 0,87$) daquelas previamente centrifugadas (STACY *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que o diagnóstico de anemia em serpentes geralmente está baseado em diminuição do hematócrito para valores menores que 15 a 20% (CAMPBELL; GRANT, 2022; HEATLEY; RUSSELL, 2020; NEVAREZ, 2021) e da hemoglobina para concentrações inferiores a 5,5 g/dL (SAGGESE, 2009). Assim, valores superiores a 55%, para Hc, e 12 g/dL, para Hb, podem indicar hemoconcentração ou eritrocitose, e aqueles inferiores a 15% (Hc) e 5,5 g/dL (Hb) sugerem anemia, quando não houver hemodiluição da amostra (CAMPBELL; GRANT, 2022; NEVAREZ, 2021; SAGGESE, 2009). Por isso, valores subestimados ou superestimados devido aos métodos utilizados, como a fórmula convencionada ou o analisador hematológico do presente estudo, em que houve superestimação, poderiam sinalizar um quadro patológico inexistente em animais hígidos ou higidez naqueles enfermos, induzindo o clínico ao erro e a propor tratamentos ineficazes ou desnecessários.

No Gráfico 3, demonstrou-se a dispersão dos dados relativos à comparação dos métodos avaliados no presente estudo (Hb_H ; Hb_{CV} e Hb_R) com o método tradicionalmente utilizado para a espécie (Hb_C). Constatou-se uma correlação forte e positiva para todas as variáveis analisadas, ratificada pelos coeficientes de correlação 0,9564 (Hb_H , $p < 0,0001$), 0,9371 (Hb_{CV} , $p < 0,0001$) e 0,9371 (Hb_R , $p < 0,0001$). Para a espécie *Ciconia boyciana* (cegonha-branca-oriental), Han, Jang e Na (2016) observaram boa concordância entre as análises hematológicas efetuadas pelo Cell-Dyn 3700 (Abbott Laboratories), quando comparado com o método tradicional.

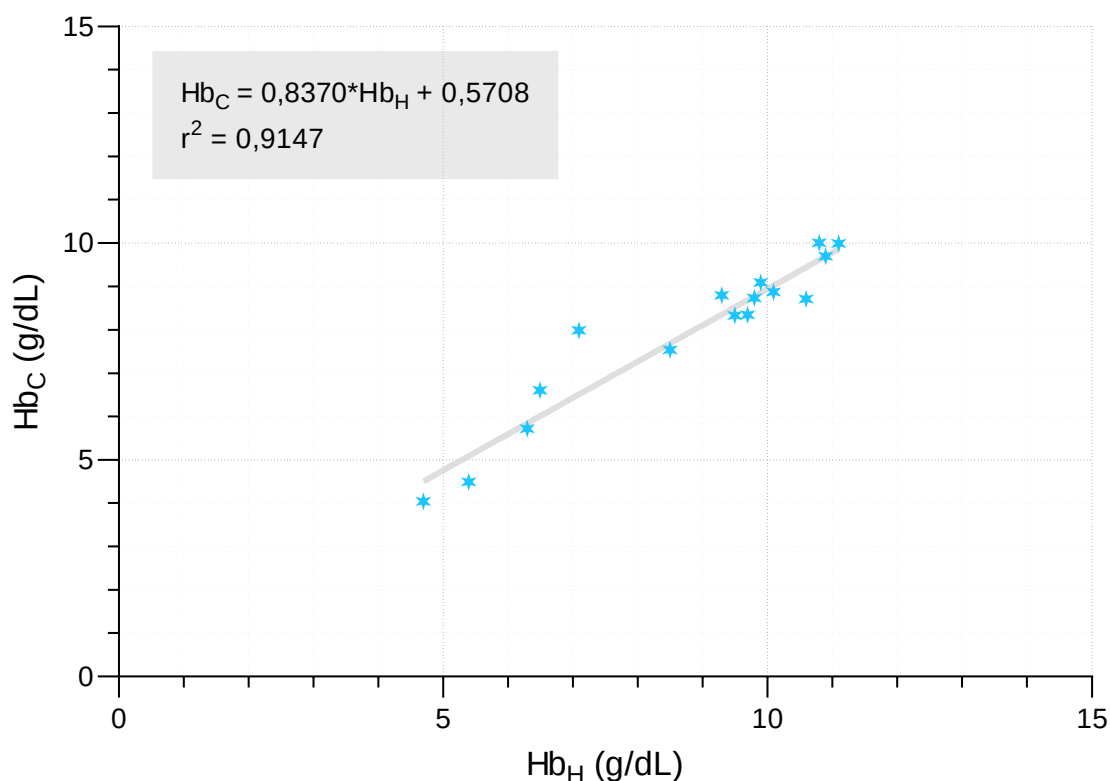
Gráfico 3 – Gráfico de dispersão das concentrações hemoglobínicas determinadas pelo método de cianometahemoglobina versus outros métodos, em amostras sanguíneas de *Bothrops atrox*, acondicionadas com EDTA K2



Notas: Método da cianometahemoglobina (Hb_C) no T0, analisador hematológica automático (Hb_H), hemoglobina calculada por meio da convenção (Hb_{CV}) e regressão linear (Hb_R), coeficiente de correlação (r) e p (probabilidade de significância).

Devido a forte correlação dos métodos alternativos com a técnica tradicional, foi possível determinar uma fórmula de correção dos dados obtidos pelo analisador hematológico, de modo a aproximar as médias, por meio da fórmula de regressão linear $Hb_C \text{ (g/dL)} = 0,8370 \cdot Hb_H + 0,5708$ ($r^2 = 0,8781$), cuja dispersão dos dados e a reta ajustada estão ilustradas no Gráfico 4. Essa equação poderá ser utilizada para estimar o valor padrão, dado o valor obtido no Hematoclin 2.8 VET na espécie estudada, aumentando o rol de técnicas disponíveis.

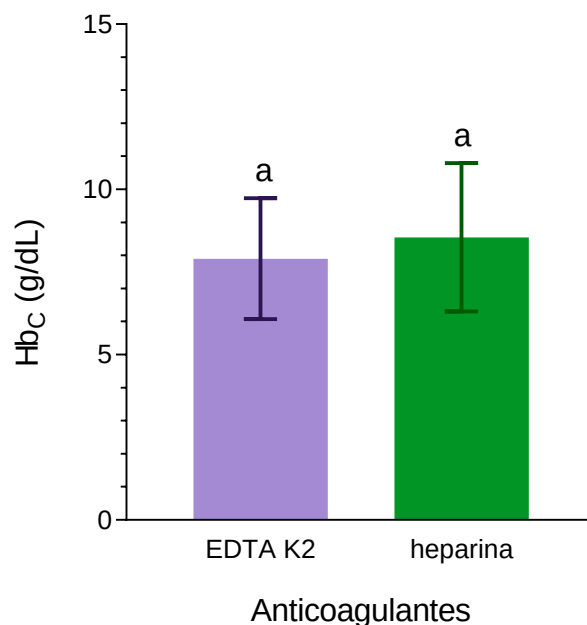
Gráfico 4 – Gráfico de dispersão das concentrações hemoglobínicas determinadas pelo método de cianometahemoglobina versus Hematoclin 2.8 VET, em amostras sanguíneas de *Bothrops atrox*, acondicionadas com EDTA K2



Notas: Dosagem de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (Hb_C), hematócrito (Hc), r² (coeficiente de determinação).

Como mostrado no Gráfico 5, os anticoagulantes utilizados, EDTA K2 e heparina sódica, não interferiram na dosagem da hemoglobina plasmática, pelo método de cianometahemoglobina, na espécie de serpente estudada, visto que as médias de ambos não diferiram estatisticamente ($p = 0,0831$), sendo elas $7,91 \pm 1,83$ g/dL e $8,55 \pm 2,24$ g/dL, respectivamente. A igualdade das médias também foi verificada para *Arapaima gigas* (GONZALES-FLORES *et al.*, 2022), *Podocnemis expansa* (GARCIA *et al.*, 2021), *Schizopyge lagoonostomus* (SHEIKH; AHMED, 2020), *Piaractus mesopotamicus* (FARIAS, *et al.*, 2016), *Iguana iguana* (HANLEY *et al.*, 2004), *Podocnemis unifilis* (FURTADO, 2021) e *Cyprinus carpio* (WALENCIK; WITESKA, 2007).

Gráfico 5 – Média das concentrações de hemoglobina em amostras sanguíneas de *Bothrops atrox* acondicionadas em EDTA K2 ou heparina sódica



Notas: Dosagem de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (HbC), Ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (EDTA K2). Médias sinalizadas com letras distintas possuem diferença estatística pelo teste t pareado, com nível de significância de 5%.

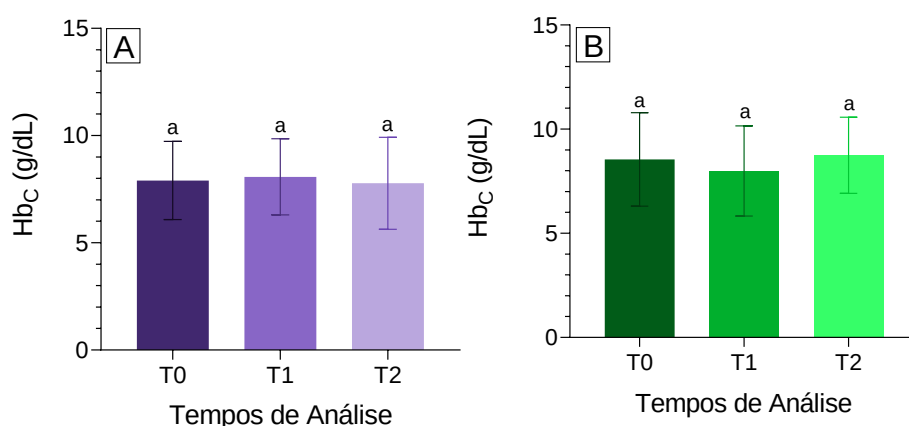
Quando analisada a interferência do tempo de estocagem, à 4° C, das amostras sanguíneas com EDTA K2, na concentração hemoglobínica plasmática das serpentes, inferiu-se a igualdade ($p = 0,6598$) das médias obtidas em cada tempo amostral T0, T1 e T2 em g/dL, $7,905 \pm 1,825$, $8,077 \pm 1,773$ e $7,775 \pm 2,143$, respectivamente, representadas pelo Gráfico 6.

Assim como o inferido nas dosagens em amostras sanguíneas com EDTA K2, o tempo de armazenamento do sangue acondicionado com heparina sódica na determinação hemoglobínica plasmática não apresentou diferença significativa ($p = 0,0589$) entre os tempos amostrais T0, T1 e T2 em g/dL, $8,549 \pm 2,243$, $7,991 \pm 2,163$ e $8,743 \pm 1,828$, respectivamente, representadas pelo Gráfico 6.

Diferentemente do que se afirmou em outros estudos, em que o tempo de estocagem sugerido foi de 24 h para serpentes (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020) e 12 h para répteis no geral (ABOU-MADI; JACOBSON, 2003; MITCHELL; HERNANDEZ-DIVERS, 2009), no presente trabalho 72 h foi satisfatório para a dosagem de hemoglobina plasmática, exclusivamente.

Segundo Ihedioha e Onwubuche (2007), a dosagem de hemoglobina plasmática em bovinos e caprinos não apresentou alterações significativas até 120h após a colheita, de amostras armazenadas a 30 °C e 5 °C. No entanto, em suínos, diferenças nas concentrações foram significativas as 96h. Em humanos (UNALLI; OZARDA, 2021) e em jumentos (PEREZ-ECIJA *et al.*, 2020), observaram diferença analítica de 48h para amostras armazenadas a 4 °C. Além disso, as dosagens hemoglobínicas em trutas-arco-íris, de acordo com Fazio *et al.* (2017), só apresentaram decréscimo significativo em 366h após venopunção.

Gráfico 6 – Média das concentrações de hemoglobina determinadas em amostras sanguíneas com EDTA K2 (A) ou heparina sódica (B), para os tempos amostrais T0 (24 h), T1 (48 h) e T2 (72 h)



Notas: Dosagem de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (HbC) e Ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (EDTA K2). Médias sinalizadas com letras distintas possuem diferença estatística pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Apesar do desenvolvimento da hematologia e bioquímica em ofídios estar progredindo, devido à novas pesquisas e conhecimentos adquiridos (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020), as técnicas de determinação da Hb em répteis, consequentemente em serpentes, ainda são as mesmas. Elas consistem no método manual, de cianometemoglobina modificado, ou metodologia automática com o equipamento hemoglobinômetro (BROWN; TRISTAN; HEATLEY, 2020; CAMPBELL; GRANT, 2022).

Apesar do custo-benefício envolvido no procedimento padrão, por não necessitar de equipamentos caros quando comparados àqueles utilizados em outros

métodos, toda a metodologia é tediosa e demorada, de forma que não é mais usualmente utilizado na rotina clínica (RAPPAPORT *et al.*, 2020), o que pode resultar em falta de atenção do manipulador e possíveis erros de dosagem (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Ainda os reagentes utilizados são tóxicos e danosos ao meio ambiente (MAGNO; MIGUITA; OSHIRO, 2017; MOHAPATRA; BHATIA; PARIDA, 2018; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

Outro ponto a se considerar é que na medicina humana, os analisadores hematológicos hoje são considerados padrão ouro para as determinações hematológicas, mesmo para a concentração hemoglobínica, devido ao padrão de qualidade e de calibração acurados nesses equipamentos (RAPPAPORT *et al.*, 2020). Ainda, sua utilização na veterinária vem se estabelecendo nas espécies domésticas, de modo que novos equipamentos são desenvolvidos para avaliação específica nesses animais, como no aparelho Mindray BC-5000Vet (Mindray) que analisa amostras sanguíneas de cão, gato, cavalo, macaco, furão, rato, camundongo, coelho, porco, vaca, burro, cabra e ovelha (THONGSAHUAN *et al.*, 2020).

Apesar desses instrumentos serem adequados para avaliação rotineira nesses indivíduos, o mesmo não pode ser dito na avaliação de répteis, logo em serpentes, visto que não há estudos científicos que comprovem a eficiência na sua utilização. Essa afirmação ficou evidenciada no presente estudo, quando os valores de hemoglobina plasmática adquiridos pelo analisador hematológico diferiram significativamente do método tradicionalmente aceito. No entanto, é necessário ter cautela na generalização dessa informação, visto que existem os mais diversos tipos de equipamentos disponíveis no mercado com metodologias distintas (CHAUDHARY; DUBEY; SONKER, 2017; KEOHANE; OTTO; WALENGA, 2020), sendo necessário novos estudos que abordem outros analisadores para a espécie pesquisada.

Em répteis, anfíbios e aves é relatada a utilização de analisadores automáticos, porém nem todos evidenciam se os métodos utilizados são cientificamente comprovados. Fei e colaboradores (2016) utilizaram o equipamento BC-3000plus (Mindray, Shenzhen, China) para avaliação de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*). Fei e colaboradores (2018) procederam o mesmo estudo, com o mesmo instrumento, na espécie *Alligator sinensis* (jacaré-da-china). Le Souëf *et al.* (2013) aplicaram análises hematológicas em três espécies de cacatuas (*Calyptorhynchus latirostris*, *Calyptorhynchus baudinii* e *Calyptorhynchus banksii naso*) por meio do aparelho CellDyn ® 3500 (Abbott Diagnostics). Um modelo posterior deste último (CellDyn

3700, Abbott Diagnostics) avaliou amostras sanguíneas de escincos-de-cauda-truncada (*Tiliqua rugosa*) usando o modo eritrócito (RBC) resistente (MOLLER; GAÁL; MILLS, 2016).

Segundo o manual da CellDyn ® 3700, é possível realizar as análises hematológicas em aves e répteis, mesmo com pequenos volumes sanguíneos (ABBOTT LABORATORIES, 2007), o que não pode ser afirmado para os outros analisadores automáticos citados anteriormente. A ratificação do seu uso nesses animais, para os modelos CellDyn ® 3500 e posteriores, foi realizada nos laboratórios do SeaWorld (Orlando, FL, EUA), porém é apenas uma comunicação pessoal (VAP *et al.*, 2012).

Ainda, há de se considerar que os estudos desenvolvidos com animais silvestres, por vezes se dão em pesquisas de campo, com investigações das espécies em seu ambiente natural. Por isso, Whitehead Júnior (2019) evidenciou a importância de se determinar métodos adequados e de excelente qualidade para a mensuração da hemoglobina, tanto em ambientes laboratoriais quanto de campo, sendo que o último geralmente conta com escassos recursos, drásticas condições ambientais e infraestrutura deficiente.

Devido a todos os contratempos citados, muitos laboratórios comerciais não medem a concentração de hemoglobina em vertebrados não-mamíferos ou se utilizam de fórmulas não validadas cientificamente para espécie avaliada. Na falta desse parâmetro, Turkson e Ganyo (2015) deixam claro que os índices hematimétricos também não são contabilizados e a avaliação da anemia se baseia somente no hematócrito e morfologia eritrocitária.

Assim, estudos que propõem métodos alternativos de dosagem de Hb, com melhor custo-benefício e, se possível, sem a necessidade de equipamentos caros ou sem utilização rotineira nos laboratórios, são essenciais para a manutenção da saúde do indivíduo e para a rotina clínica. Ainda, a comparação de métodos é essencial para evitar mensurações errôneas das amostras sanguíneas por metodologias não-cientificamente elucidadas.

Por conseguinte, da mesma forma como é observado em outras espécies, principalmente as domésticas, são necessários maiores estudos que cataloguem informações sobre tempo de armazenamento, local de colheita e anticoagulante utilizado, de modo a contribuir na determinação dos padrões normais, levando em consideração sexo, idade e muitos outros fatores. Essas informações poderão ser

utilizadas com maior segurança e elucidar muitas condições fisiológicas ou patológicas de animais atendidos por médicos veterinários em centros de reabilitação e triagem de animais silvestres, Zoológicos, Aquários, projetos de conservação, clínicas veterinárias e criatórios comerciais de animais silvestres.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que apesar das médias das concentrações de hemoglobina plasmática em serpentes *Bothrops atrox* pelos métodos de cianometahemoglobina e regressão linear diferirem significativamente daquela obtida pela fórmula convencionada de conversão da Hb e pelo analisador hematológico, há forte correlação dos métodos alternativos com o tradicional. Assim, o presente trabalho propõe a expressão matemática $Hb_C = 0,2459 \times Hc + 1,266$ como alternativa para estimação da concentração de hemoglobina, bem como $Hb_C \text{ (g/dL)} = 0,8370 \times Hb_H + 0,5708$ para correção de valores obtidos por meio do Hematoclin 2.8 VET. Além disso, a estabilidade analítica da hemoglobina, em amostras armazenadas a 4 °C, na espécie analisada, é de 72h após colheita sanguínea e os anticoagulantes EDTA K2 e heparina sódica, não são capazes de alterar as mensurações da concentração de hemoglobina plasmática em *Bothrops atrox*.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT LABORATORIES (EUA). **CELL-DYN® 3700**: System Operator's Manual. 1. ed. rev. e aum. Illinois: Abbott Laboratories, 2007. 795 p. Disponível em: <https://documents.pub/reader/full/cell-dyn-3700-operations-manual>. Acesso em: 1 fev. 2022.
- ABOU-MADI, N.; JACOBSON, E. R. Effects of blood processing techniques on sodium and potassium values: a comparison between Aldabra tortoises (*Geochelone gigantea*) and Burmese mountain tortoises (*Manouria emys*). **Veterinary Clinical Pathology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 61–66, 2003.
- ALMEIDA, M. T. de; FREITAS-DE-SOUSA, L. A.; COLOMBINI, M.; GIMENES, S. N. C.; KITANO, E. S.; FAQUIM-MAURO, E. L.; SERRANO, S. M. T.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Inflammatory Reaction Induced by Two Metalloproteinases Isolated from *Bothrops atrox* Venom and by Fragments Generated from the Hydrolysis of Basement Membrane Components. **Toxins**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 96, 2020. DOI 10.3390/toxins12020096.
- ALMEIDA, P. **Proteins concepts in biochemistry**. 1ª ed. Nova Iorque: Ny Garland Science, 2016.
- ARCOT, L.; KANDASWAMY, S.; MODALI, A.; GORTHI, S. S.; RAI DASTIDAR, T. Developing microscopy based microfluidic SLS assay for on-chip hemoglobin estimation. **AIP Advances**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2021. DOI 10.1063/5.0036446.
- BARGER, A. M.; MACNEILL, A. L. **Clinical Pathology and Laboratory Techniques for Veterinary Technicians**. 1ª ed. Ames (IA): John Wiley & Sons, 2015.
- BARRETO, G. N. L. S.; DE OLIVEIRA, S. S.; DOS ANJOS, I. V.; CHALKIDIS, H. de M.; MOURÃO, R. H. V.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; SANO-MARTINS, I. S.; GONÇALVES, L. R. de C. Experimental *Bothrops atrox* envenomation: Efficacy of antivenom therapy and the combination of *Bothrops* antivenom with dexamethasone. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, 17 Mar. 2017. DOI 10.1371/journal.pntd.0005458.
- BENEDITO, E. **Biologia e Ecologia de Vertebrados**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2017.
- BERNARDE, P. S. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. 1ª ed. São Paulo: Anolis books, 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**, v. 49, n. 2, p. 105–113, 2019. DOI 10.1590/1809-4392201802371.
- BROCKLEHURST, N.; BENSON, R. J. Multiple paths to morphological diversification during the origin of amniotes. **Nature Ecology & Evolution**, v. 5, n. 9, p. 1243–1249, 2021. DOI 10.1038/s41559-021-01516-x.

BROWN, J.; TRISTAN, T.; HEATLEY, J. J. Snakes. In: HEATLEY, J. J.; RUSSELL, K. E. **Exotic Animal Laboratory Diagnosis**. 1^a ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2020. Cap. 17, p. 291–318.

BURMESTER, T.; HANKELN, T. Function and evolution of vertebrate globins. **Acta Physiologica**, [s. l.], v. 211, n. 3, p. 501–514, 28 May 2014. DOI 10.1111/apha.12312.

CAIXETA, B. T.; MONTEIRO, E. M.; ROCHA, P. V. P.; SANTOS, A. L. Q. Concentrações bioquímicas séricas de jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) machos, adultos de vida livre. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 35, n. suppl 1, p. 51–55, 2015.

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

CAMPBELL, T. W.; GRANT, K. R. **Exotic Animal Hematology And Cytology**. 5^a ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2022.

CARNEIRO, I. A.; DRAKELEY, C. J.; OWUSU-AGYEI, S.; MMBANDO, B.; CHANDRAMOHAN, D. Haemoglobin and haematocrit: is the threefold conversion valid for assessing anaemia in malaria-endemic settings? **Malaria Journal**, v. 6, n. 1, 22 May 2007. DOI 10.1186/1475-2875-6-67.

CHAUDHARY, R.; DUBEY, A.; SONKER, A. Techniques used for the screening of hemoglobin levels in blood donors: current insights and future directions. **Journal of Blood Medicine**, v. Volume 8, p. 75–88, Jul. 2017. DOI 10.2147/jbm.s103788.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. N. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 11–57, 2018.

COSTA, H. C.; GUEDES, T.; BÉRNILS, R. S. Lista de répteis do Brasil: padrões e tendências. **Herpetologia Brasileira**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 110–179, 2018

COSTAL-OLIVEIRA, F.; STRANSKY, S.; GUERRA-DUARTE, C.; NAVES DE SOUZA, D. L.; VIVAS-RUIZ, D. E.; YARLEQUÉ, A.; SANCHEZ, E. F.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; BRAGA, V. M. M. L-amino acid oxidase from Bothrops atrox snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 28 Jan. 2019. DOI 10.1038/s41598-018-37435-4.

DE FREITAS, M. A. **Serpentes Brasileiras**. 1^a ed. [s. l.]: Editora Lauro de Freitas, 2003.

DUARTE, M.O. **Estruturação morfológica e gênica das populações de *Corallus hortulanus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes, Boidae) ao sul da bacia Amazônica, Brasil**. 2014. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

FARIAS, T. H. V.; PEREIRA, N. L.; PÁDUA, S. B. de; ALVES, L. de O.; SAKABE, R.; BELO, M. A. de A.; PILARSKI, F. Na₂EDTA anticoagulant impaired blood samples from the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 431–435, May 2016. DOI 10.1590/s0100-736x2016000500013.

FAZIO, F.; FERRANTELLI, V.; SAOCA, C.; GIANGROSSO, G.; PICCIONE, G. Stability of haematological parameters in stored blood samples of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). **Veterinari Medicina**, v. 62, n. 7, 2017. <https://doi.org/10.17221/51/2017-VETMED>.

FEI, P.; RUI, Z.; XUE, Z.; HUAN, W.; SHENGZHOU, Z. Hematology and serum biochemistry of farmed bullfrog, *Lithobates catesbeianus* during the active and hibernating periods. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 8, n. 11, p. 176–182, 30 Nov. 2016. DOI 10.5897/jvmah2016.0517.

FEI, P.; XIANXIAN, C.; TING, M.; EN, L.; YONGKANG, Z.; SHENGZHOU, Z. Hematology and serum biochemistry parameters of captive Chinese alligators (*Alligator sinensis*) during the active and hibernating periods. **Tissue and Cell**, v. 51, p. 8–13, Apr. 2018. DOI 10.1016/j.tice.2018.02.002. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29622092/>. Accessed on: 8 Apr. 2022.

FRAGA, R. de; LIMA, A. P.; LÚCIA, A.; MAGNUSSON, W. E. **Guia de Cobras da Região de Manaus Amazônia Central**. [s. l.]: Editora INPA, 2013.

FRAGA, R. de; MAGNUSSON, W. E.; ABRAHÃO, C. R.; SANAIOTTI, T.; LIMA, A. P. Habitat Selection by *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) in Central Amazonia, Brazil. **Copeia**, [s. l.], v. 2013, n. 4, p. 684–690, 30 Dec. 2013. DOI 10.1643/ce-11-098.

FUDGE, A. M. **Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets**. 1ª edição ed. Philadelphia: Saunders, 2000.

FURTADO, Y. I. C. **Efeitos dos anticoagulantes heparina, Na₂EDTA e K₃EDTA nas análises hematológicas e bioquímica plasmática de tracajá (*Podocnemis unifilis*)**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2021.

GARCIA, G. C.; ALVES-JÚNIOR, J. R. F.; SANTANA, Á. E.; STAS, C. M. F.; SILVA, C. C.; KANAYAMA, C. Y.; BITTAR, E. R.; BITTAR, J. F. F. Hematologic variables of the Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) under the effects of different anticoagulants and cytologic stains. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 50, n. 2, p. 209–215, Jun. 2021. DOI 10.1111/vcp.12960.

GONZALES-FLORES, A. P.; MEJIA PEREZ, F. I.; HUANUIRI QUINTEROS, K. A.; SANCHEZ CALLEJAS, I. Y.; VASQUEZ ROJAS, J. L.; FERNANDEZ-MENDEZ, C. Effect of heparin and EDTA as anticoagulants on hematological values in farmed juvenile of *Arapaima gigas*. **Aquaculture International**, v. 30, n. 1, p. 263–271, 4 Nov. 2021. DOI 10.1007/s10499-021-00796-1.

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

GRISPO, M. T.; NATARAJAN, C.; PROJECTO-GARCIA, J.; MORIYAMA, H.; WEBER, R. E.; STORZ, J. F. Gene Duplication and the Evolution of Hemoglobin Isoform Differentiation in Birds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 45, p. 37647–37658, Nov. 2012. DOI 10.1074/jbc.m112.375600.

GUTIÉRREZ-CÁRDENAS, P.; CAICEDO, J. R.; RIVAS, G.; MURPHY, J. IUCN Red List of Threatened Species: *Bothrops atrox*. 22 Jul. 2015. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/44582135/44582154>. Acessado em: 28 jan. 2022.

HALL, J. E.; HALL, M. E. **Guyton e Hall Textbook of Medical Physiology**. 14^a ed. Filadélfia: Elsevier, 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**, v. 35, n. 3, p. 328–332, Sep. 2004. DOI 10.1638/03-057.

HARR, K. E. Sample Collection. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 21, n. 3, p. 579–592, Sep. 2018. DOI 10.1016/j.cvex.2018.05.008.

HATAKEYAMA, D. M.; TASIMA, LÍDIA JORGE; BRAVO-TOBAR, C. A.; SERINO-SILVA, C.; TASHIMA, A. K.; FABRI, C.; SILVA; GALIZIO; OLIVEIRA, E.; KAVAZOI, V. K.; GUTIERREZ-MARÍN, J. D.; FARIAS; SANT'ANNA, SÁVIO STEFANINI; GREGO, K. F.; MORAIS-ZANI, K. de; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Venom complexity of *Bothrops atrox* (common lancehead) siblings. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 26, 12 Oct. 2020.

HEATLEY, J. J.; RUSSELL, K. E. **Exotic Animal Laboratory Diagnosis**. 1^a ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2020.

HERRIN, K. V. Clinical Techniques and Supportive Care. In: DONELEY, B.; MONKS, D.; JOHNSON, R.; CARMEL, B. (Eds.). **Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice**. [S. l.]: Wiley, 2017, cap. 13. DOI 10.1002/9781118977705.

HICKMAN JUNIOR, C. P.; KEEN S. L.; EISENHOUR, D. J.; LARSON, A.; I'ANSON, H. **Integrated Principles of Zoology**. Nova Iorque: McGraw-Hill Education, 2020.

HUI WEN, F.; MONTEIRO, W. M.; MOURA DA SILVA, A. M.; TAMBOURGI, D. V.; MENDONÇA DA SILVA, I.; SAMPAIO, V. S.; DOS SANTOS, M. C.; SACHETT, J.; FERREIRA, L. C. L.; KALIL, J.; LACERDA, M. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. e0003701, 21 May 2015. DOI 10.1371/journal.pntd.0003701.

IHEDIOHA, J. I.; ONWUBUCHE, R. C. Artifactual changes in PCV, hemoglobin concentration, and cell counts in bovine, caprine, and porcine blood stored at room and refrigerator temperatures. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 1, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2007.tb00183.x>.

JARA, M.; PINCHEIRA-DONOSO, D. The neck flattening defensive behaviour in snakes: First record of hooding in the South American colubrid genus *Philodryas*. **Animal Biology**, v. 65, n. 1, p. 73–79, 2015. DOI 10.1163/15707563-00002459.

KANDA, I.; BRANDÃO, J. Catheterization and Venipuncture. In: GRAHAM, J. E.; DOSS, G. A.; BEAUFRÈRE, H. (Eds.). **Exotic Animal Emergency and Critical Care Medicine**. [S. l.]: Wiley, 2021, cap. 42, DOI 10.1002/9781119149262.

KARDONG, K. V. **Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution**. 8ª Ed. Nova Iorque: McGraw-Hill Educatio, 2019.

KEOHANE, E. M.; OTTO, C. N.; WALENGA, J. M. **Rodak's Hematology Clinical Principles and Applications**. 6ª ed. Saint Louis: Elsevier, 2020. DOI 10.1016/c2013-0-19483-4.

KEPPNER, A.; MARIC, D.; CORREIA, M.; KOAY, T. W.; ORLANDO, I. M. C.; VINOGRADOV, S. N.; HOOGEWIJS, D. Lessons from the post-genomic era: Globin diversity beyond oxygen binding and transport. **Redox Biology**, v. 37, p. 101687, Oct. 2020. DOI 10.1016/j.redox.2020.101687.

LE SOUËF, A. T.; HOLYOAKE, C. S.; VITALI, S. D.; WARREN, K. S. Hematologic and Plasma Biochemical Reference Values for Three Species of Black Cockatoos (*Calyptorhynchus* species). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 27, n. 1, p. 14–22, Mar. 2013. DOI 10.1647/2010-056.1.

LEI, Y.; YANG, L.; JIANG, H.; CHEN, J.; SUN, N.; LV, W.; HE, S. Recent genome duplications facilitate the phenotypic diversity of Hb repertoire in the Cyprinidae. **Science China Life Sciences**, v. 64, n. 7, p. 1149–1164, 10 Oct. 2020. DOI 10.1007/s11427-020-1809-0.

LEWIS, S. M.; GARVEY, B.; MANNING, R.; SHARP, S. A.; WARDLE, J. Lauryl sulphate haemoglobin: a non-hazardous substitute for HiCN in haemoglobinometry. **Clinical & Laboratory Haematology**, v. 13, n. 3, p. 279–290, 28 Jun. 2008. DOI 10.1111/j.1365-2257.1991.tb00283.x.

LILLIEHÖÖK, I.; WALL, H.; TAUSON, R.; TVEDTEN, H. Differential leukocyte counts determined in chicken blood using the Cell-Dyn 3500. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 3, p. 133–138, Sep. 2004. DOI 10.1111/j.1939-165x.2004.tb00362.x.

LILLYWHITE, H. B. **How Snakes Work**. Structure, Function and Behavior of the World's Snakes. 1ª Ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2014

MACHADO, S. S.; BLATT, T. L. da S.; NETO, C. C. B.; WATANABE, A. L.; NASCIMENTO, I. A.; GAGGINI, T. S. Hematologia e desempenho zootécnico do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultivado em bioflocos e aquaponia / Hematology and zootechnical performance of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultured in bioflocs and aquapony. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 66555–66571, 6 Jul. 2021. DOI 10.34117/bjdv7n7-095.

MAGNO, J. A.; MIGUITA, K.; OSHIRO, M. Métodos alternativos para avaliar a concentração de Hemoglobina livre no plasma. **Bol. do Inst. Adolfo Lutz**, p. 1–3, 2017. Available at: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1048869>. Accessed on: 24 Mar. 2022.

MATTISON, C. **Nature Guide: Snakes and Other Reptiles and Amphibians**. Nova Iorque: DK Publishing, 2014.

MITCHELL, M.; HERNANDEZ-DIVERS, S. Methods in herpetological forensic work — clinical techniques. **Applied Herpetology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 3–28, 2009.

MIYATA, M.; GILLEMANS, N.; HOCKMAN, D.; DEMMERS, J. A. A.; CHENG, J.-F.; HOU, J.; SALMINEN, M.; FISHER, C. A.; TAYLOR, S.; GIBBONS, R. J.; GANIS, J. J.; ZON, L. I.; GROSVELD, F.; MULUGETA, E.; SAUKA-SPENGLER, T.; HIGGS, D. R.; PHILIPSEN, S. An evolutionarily ancient mechanism for regulation of hemoglobin expression in vertebrate red cells. **Blood**, v. 136, n. 3, p. 269–278, 2020. DOI 10.1182/blood.2020004826.

MOHAPATRA, D.; BHATIA, V.; PARIDA, S. Diagnostic dilemma in catching anaemia early. **Indian Journal of Community and Family Medicine**, v. 4, n. 1, p. 69, 2018. DOI 10.4103/2395-2113.251354.

MOLLER, C. A.; GAÁL, T.; MILLS, J. N. The hematology of captive Bobtail lizards (*Tiliqua rugosa*): blood counts, light microscopy, cytochemistry, and ultrastructure. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 634–647, 21 Nov. 2016. DOI 10.1111/vcp.12425.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 8^a ed. Nova Iorque: Macmillan Learning, 2021.

NEVAREZ, J. G. **Blackwell's five-minute veterinary consult. Reptile and amphibian**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2022.

NOGUEIRA, C. C.; ARGÔLO, A. J. S.; ARZAMENDIA, V.; AZEVEDO, J. A.; BARBO, F. E.; BERNILS, R. S.; BOLOCHIO, B. E.; BORGES-MARTINS, M.; BRASIL-GODINHO, M.; BRAZ, H.; BUONONATO, M. A.; CISNEROS-HEREDIA, D. F.; COLLI, G. R.; COSTA, H. C.; FRANCO, F. L.; GIRAUDO, A.; GONZALEZ, R. C.; GUEDES, T.; HOOGMOED, M. S.; MARQUES, O. A. V. Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. **South American Journal of Herpetology**, v. 14, edição especial, p. 1 - 274, 2019. DOI 10.2994/sajh-d-19-00120.1.

O'HALLORAN, J.; FINBARR DUGGAN, P.; MYERS, A. A. Determination of haemoglobin in birds by a modified alkaline haematin (D-575) method. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 86, n. 4, p. 701–704, Jan. 1987. DOI 10.1016/0305-0491(87)90215-x.

O'SHEA, M. **The Book of Snakes**. A Life-Size Guide to Six Hundred Species from around the World. Chicago: The University of Chicago Press, 2018.

OLDFIELD, C. How to obtain a blood sample in reptiles via venepuncture. **The Veterinary Nurse**, Londres, v. 5, n. 9, p. 532-537, 2014. DOI 10.12968/vetn.2014.5.9.532

OSHIRO, I.; TAKENAKA, T.; MAEDA, J. New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS). **Clinical Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 83–88, Apr. 1982. DOI 10.1016/s0009-9120(82)91069-4.

PASSOS, R. R. F. C. F. **Contenção física de serpentes: técnicas e precauções**. 2009. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

PEREZ-ECIJA, A.; BUZON-CUEVAS, A.; AGUILERA-AGUILERA, R.; GONZALEZ-DE CARA, C. A.; MENDOZA, F. J. Blood Storage Conditions Affect Hematological Analysis in Samples From Healthy Donkeys and Donkeys With Experimentally-Induced Endotoxemia. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00640>.

PHILIPSEN, S.; HARDISON, R. C. Evolution of hemoglobin loci and their regulatory elements. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 2–12, May 2018. DOI 10.1016/j.bcmd.2017.08.001.

PINCHEIRA-DONOSO, D.; BAUER, A. M.; MEIRI, S.; UETZ, P. Global Taxonomic Diversity of Living Reptiles. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. e59741, 2013.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 699 p.

QUIBASA / BIOCLIN (Brasil). **Hematoclin Vet 3.0**: Analisador Hematológico 3 Partes - Manual De Operação. 3. ed. rev. e aum. Belo Horizonte: QUIBASA /BIOCLIN, 2021. 342 p. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#!/saude/25351262468201216/>. Acesso em: 1 fev. 2022.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1ª ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2013.

RAPPAPORT, A. I.; KARAKOCHUK, C. D.; HESS, S. Y.; RALPH D WHITEHEAD, J.; NAMASTE, S. M. L.; DARY, O.; PARKER, M. E.; NEUFELD, L. M.; LARSON, L. M.; NEWTON, S.; WEGMULLER, R.; MOORTHY, D. Variability in haemoglobin concentration by measurement tool and blood source: an analysis from seven countries. **Journal of Clinical Pathology**, 2020. DOI 10.1136/jclinpath-2020-206717.

RODRIGUES, T. O.; SANTOS, A. L. Q.; PEREIRA, P. V. R.; SIQUEIRA, S. E.; RODRIGUES, T. C. S.; GUIMARÃES, E. C. Use of ketamine by colon-rectal route for chemical restraint in *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 with test of influence of the drug on renal system. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 328–334, Feb. 2018.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; SÁNCHEZ, E.; ARRIA, M.; VARGAS, M.; PICCOLO, C.; COLINA, R.; FRANCO-PAREDES, C. Haemoglobin and haematocrit: the threefold conversion is also non valid for assessing anaemia in *Plasmodium vivax* malaria-endemic settings. **Malaria Journal**, v. 6, n. 1, Dec. 2007. DOI 10.1186/1475-2875-6-166.

ROHLFING, K.; STUHLMANN, F.; DOCKER, M. F.; BURMESTER, T. Convergent evolution of hemoglobin switching in jawed and jawless vertebrates. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, n. 1, 1 Feb. 2016. DOI 10.1186/s12862-016-0597-0.

SAGGESE, M. D. Clinical Approach to the Anemic Reptile. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 18, n. 2, p. 98–111, Apr. 2009. DOI 10.1053/j.jepm.2009.04.003.

SAMOUR, J.; HART, M. **Hawkey's Atlas of Wild and Exotic Animal Haematology**. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2021.

SHEIKH, Z. A.; AHMED, I. Comparative evaluation of two anticoagulants used for the analysis of haematological, biochemical parameters and blood cell morphology of himalayan snow trout, *Schizopyge plagiostomus*. **Tissue and Cell**, v. 67, p. 101398, Dec. 2020. DOI 10.1016/j.tice.2020.101398.

SILVA, F. M. da; OLIVEIRA, L. S. de; NASCIMENTO, L. R. de S.; MACHADO, F. A.; PRUDENTE, A. L. da C. Sexual dimorphism and ontogenetic changes of Amazonian pit vipers (*Bothrops atrox*). **Zoologischer Anzeiger**, v. 271, p. 15–24, Nov. 2017. DOI 10.1016/j.jcz.2017.11.001.

SILVA, K. M. P.; SILVA, K. B.; SUEIRO, L. R.; OLIVEIRA, M. E. E. S.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Reproductive Biology of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) from the Brazilian Amazon. **Herpetologica**, v. 75, n. 3, p. 198, 20 Sep. 2019. DOI 10.1655/d-18-00023.

STACY, N.; HEARD, D.; WELLEHAN, J. Diagnostic sampling and laboratory tests. In: GIRLING, S. J.; RAITI, P (Eds.). **BSAVA Manual of Reptiles**, Gloucester British Small Animal Veterinary Association, 2019, cap. 8, p. 115–133. DOI 10.22233/9781905319794.8.

STACY, N. I.; CHABOT, R. M.; INNIS, C. J.; CRAY, C.; FRASER, K. M.; RIGANO, K. S.; PERRAULT, J. R. Plasma chemistry in nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) from Florida: Understanding the importance of sample hemolysis effects on blood analytes. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. e0222426, 10 Sep. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222426>.

STORZ, J. F. Gene Duplication and Evolutionary Innovations in Hemoglobin-Oxygen Transport. **Physiology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 223–232, 2016. DOI 10.1152/physiol.00060.2015

STORZ, J. F. **Hemoglobin Insights into Protein Structure, Function, and Evolution**. 1^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2019.

STORZ, J. F.; OPAZO, J. C.; HOFFMANN, F. G. Gene duplication, genome duplication, and the functional diversification of vertebrate globins. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 66, n. 2, p. 469–478, Feb. 2013. DOI 10.1016/j.ympev.2012.07.013.

SUES, H.-D. **The Rise of Reptiles: 320 Million Years of Evolution**. 1ª ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2019.

SUTTON, D. G. M.; SELLON, D. C. Haematopoietic and immune systems. In: MAIR, T.; LOVE, S.; SCHUMACHER, J.; SMITH, R. K. W.; FRAZER, G. **Equine Medicine, Surgery and Reproduction - E-Book**. [S. l.]: Saunders Ltd, 2013. cap. 10, p. 195–210. DOI 10.1016/b978-0-7020-2801-4.00010-9.

SYKES, J. M.; KLAPHAKE, E. Reptile Hematology. **Clinics in Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 661–680, 2015.

THOMAS, C.; LUMB, A. B. Physiology of haemoglobin. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain**, v. 12, n. 5, 2012. DOI 10.1093/bjaceaccp/mks025.

THONGSAHUAN, S.; FONGHOI, L.; KAEWFAI, S.; SRINOUN, K. Precision and accuracy of the Mindray BC-5000Vet hematology analyzer for canine and feline blood. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 49, n. 2, p. 207–216, Jun. 2020. DOI 10.1111/vcp.12861.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2º edição ed. São Paulo: Roca, 2017.

TROIANO, J. C. **Doenças dos Répteis**. 1ª edição ed. [s.l.] : Medvet, 2018.

TURKSON, P.-K.; GANYO, E. Y. Relationship between haemoglobin concentration and packed cell volume in cattle blood samples. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 82, n. 1, 2015. DOI 10.4102/ojvr.v82i1.863.

UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; HOŠEK, J. **The reptile database - Species Numbers**. 2021a. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/>>. Acesso em: 25 jan. 2022.

UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; HOŠEK, J. **Worldwide Diversity of Reptiles**. 2021b. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; HOŠEK, J. **Higher Taxa in Extant Reptiles**. 2021c. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/>>. Acesso em: 27 jan. 2022.

UNALLI, O.; OZARDA, Y. Stability of hematological analytes during 48 hours storage at three temperatures using Cell-Dyn hematology analyzer. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 252–260, 2021. DOI 10.5937/jomb0-27945.

ÚNGARI, L. P.; SANTOS, A. L. Q.; PAIVA, G. C. M.; MOTA, K. C. P.; BORGES, L. F. de A.; CURY, M. C. Concomitant infection of Haemogregarina sp. and Staphylococcus

aureus in free-living yellow-spotted river turtle (*Podocnemis unifilis*): case report. **Archives of Veterinary Science**, v. 23, n. 3, 30 Sep. 2018. DOI 10.5380/avs.v23i3.59102

VAP, L. M.; HARR, K. E.; ARNOLD, J. E.; FREEMAN, K. P.; GETZY, K.; LESTER, S.; FRIEDRICH, K. R. ASVCP quality assurance guidelines: control of preanalytical and analytical factors for hematology for mammalian and nonmammalian species, hemostasis, and crossmatching in veterinary laboratories. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, n. 1, p. 8–17, Mar. 2012. DOI 10.1111/j.1939-165x.2012.00413.x.

VELGUTH, K. E.; PAYTON, M. E.; HOOVER, J. P. Relationship of Hemoglobin Concentration to Packed Cell Volume in Avian Blood Samples. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 2, p. 115–121, Jun. 2010. DOI 10.1647/2008-042.1.

VIEIRA, D. S.; RODRIGUES, T. C. S.; RENATA, M.; CARDOSO, G. F.; GUIMARÃES, E. C.; BRITES, V. L. C.; MUNDIM, A. V. Determinação das concentrações plasmáticas de proteínas e metabólitos de cascavéis em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 39–42, Dec. 2014. DOI 10.1590/S0100-736X2014001300008

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. 4^a ed. London: Academic press, 2014.

WAHEED, H.; DOMAN, S. K.; AHMED, A. The Partial Amino Acid Sequence of Leaf-Nosed Viper (*Eristicophis macmahonii*) Snake Hemoglobin. **Journal of Animal and Plant Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1622-1628, 2018.

WAHEED, H.; FRIEDMAN, H.; MOIN, S. F.; ZARINA, S.; AHMED, A. The Primary Structure of β I-Chain of Hemoglobin from Snake Sindhi Krait (*Bungarus sindanus sindanus*). **The Protein Journal**, v. 35, n. 3, p. 193–201, 27 Apr. 2016. DOI 10.1007/s10930-016-9661-2.

WALENCIK, J.; WITESKA, M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 331–335, Sep. 2007. DOI 10.1016/j.cbpc.2007.04.004.

WELLMANN, I. A. M.; IBIAPINA, H. N. S.; SACHETT, J. A. G.; SARTIM, M. A.; SILVA, I. M.; OLIVEIRA, S. S.; TARRAGÔ, A. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LACERDA, M. V. G.; FERREIRA, L. C. de L.; MALHEIRO, A.; MONTEIRO, W. M.; COSTA, A. G. Correlating Fibrinogen Consumption and Profiles of Inflammatory Molecules in Human Envenomation's by *Bothrops atrox* in the Brazilian Amazon. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 18 Aug. 2020. DOI 10.3389/fimmu.2020.01874.

WHITEHEAD JUNIOR, R. D.; MEI, Z.; MAPANGO, C.; JEFFERDS, M. E. D. Methods and analyzers for hemoglobin measurement in clinical laboratories and field settings. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1450, n. 1, p. 147–171, 2019. DOI 10.1111/nyas.14124.

ZANDER, R.; LANG, W.; WOLF, H. Uwe. Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I.

description of the method. **Clinica Chimica Acta**, v. 136, n. 1, p. 83–93, Jan. 1984. DOI 10.1016/0009-8981(84)90250-x.

ZIMMERMAN, L. M. Reptilia: Humoral Immunity in Reptiles. In: COOPER, E. L. (Ed.). **Advances in Comparative Immunology**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 751–772.

ZIPPEL, K. C.; LILLYWHITE, H. B.; MLADINICH, C. R. J. New vascular system in reptiles: Anatomy and postural hemodynamics of the vertebral venous plexus in snakes. **Journal of Morphology**, v. 250, n. 2, p. 173–184, 2001. DOI 10.1002/jmor.1063.