



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Clínica de animais exóticos

Joana Filipa Lopes de Almeida

Orientador interno: Professora Doutora Joana Reis

Orientador externo: Dr. Carlos Henriques

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Tema da monografia: Inseminação artificial em *Python regius*

Relatório de Estágio

Évora, 2016

Este relatório de estágio inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Clínica de animais exóticos

Joana Filipa Lopes de Almeida

Orientador interno: Professora Doutora Joana Reis

Orientador externo: Dr. Carlos Henriques

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Tema da monografia: Inseminação artificial em *Python regius*

Relatório de Estágio

Évora, 2016

Este relatório de estágio inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri

À minha mãe.
Pela paixão pela biologia,
pela curiosidade científica,
pelo amor por bichos esquisitos.
Amo-te.

Agradecimentos

À Professora Doutora Joana Reis, por todo o apoio e orientação desde a escolha do local de estágio até à finalização do presente trabalho. Obrigada pela paixão que põe em tudo o que faz como orientadora, professora e médica veterinária. Pela exigência, pela dedicação e profissionalismo. Mas também pela amizade, confiança e motivação.

A toda a equipa da Exoclinic que proporciona um ótimo ambiente de trabalho.

Em particular ao Dr. Carlos Henriques pela acessibilidade no esclarecimento de dúvidas e partilha de conhecimentos, pela disponibilização dos seus animais que possibilitou a realização do ensaio prático, pela orientação e apoio durante o estágio, elaboração do estudo prático e desenvolvimento deste trabalho escrito.

À Dra. Cristina Almeida por toda a atenção e preocupação para que pudesse tirar o melhor partido do estágio, adquirindo conhecimentos e competências. Pela disponibilidade para esclarecer dúvidas e pela preocupação constante em estimular a aprendizagem dos estagiários através de perguntas e desafios sobre os casos clínicos. Por todos os conselhos relativos à escolha do tema da monografia e trabalho prático e depois durante a elaboração dos mesmos.

À Dra. Carolina Pimenta Lopes pela total disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e partilha de conhecimentos. Pela confiança demonstrada e constante motivação. Pela simpatia e amizade.

À Dra. Mariana Bernardino e ao Dr. Filipe Martinho, com quem o contacto foi mais breve mas igualmente enriquecedor, pela partilha de conhecimentos, simpatia e disponibilidade.

À Filipa Fernandes, “mãe de toda a gente”, por toda a ajuda e apoio, quer durante o estágio, quer depois. À Line Sousa, pelo companheirismo e amizade durante o estágio, pelos (muitos) favores de última hora. A todos os colegas que foram fazendo parte da equipa, em especial à Florbela Chaves e à Alicja Teodorczyk.

À Dra. Carolina Monteiro, do espaço Ecovet, pela atenciosa disponibilidade para a colaboração no ensaio prático, oferecendo o seu tempo, conhecimento e material para a realização das ecografias.

À Diana Jorge, por existires e fazeres parte de mim.

Ao Sérgio Águas, porque a tese não é apenas a tese mas o culminar de todo um percurso. Percurso que teria sido muito mais duro sem ti. Obrigada por todo o teu apoio incondicional ao

longo destes seis anos em que veterinária tomou conta da minha vida. Obrigada por não me teres deixado cair quando a vida me trouxe dolorosos desafios.

À minha família, pelo constante apoio e confiança. À minha mãe que contribuiu em grande parte para o que sou e faço hoje. Obrigada pelo enorme interesse, entusiasmo e orgulho por tudo o que fui aprendendo e que ainda me foi possível partilhar. Ao meu pai, Margarida, manos, tios e avós por acreditarem sempre em mim, mesmo que cobras, lagartos e ratazanas não pareçam ser animais que alguém queira tratar! Ao José Alberto, pela revisão de texto, mas sobretudo pela amizade que, como o meu percurso académico, foi um parto difícil mas que se fez e ainda bem! Pela paciência, boa vontade, dedicação e apoio durante a elaboração deste trabalho e nos vários anos que a antecederam.

The last but not the least, Alexandre! Obrigada por encheres o meu mundo com mais cobras, lagartos e peixinhos e o meu coração de amor. Que tudo isto seja apenas o começo.

Resumo

Clínica de animais exóticos

Este relatório de estágio descreve as atividades desenvolvidas no estágio curricular e desenvolve o tema "Inseminação artificial em *Python regius*". O estágio de seis meses foi realizado na Exoclinic – clínica veterinária de aves e exóticos, permitindo consolidar conhecimentos através da prática clínica e agregar-lhes a área da medicina de animais exóticos, dedicando especial atenção à medicina de répteis. Desenvolvem-se os casos mais frequentes: medicina preventiva nas várias classes de animais, patologia dentária em roedores e lagomorfos, doença do bico e das penas dos psitacídeos e anorexia em répteis. Na monografia aborda-se a anatomofisiologia e o comportamento reprodutivos das cobras e a sua influência no manejo reprodutivo em cativeiro, métodos de avaliação de reprodutores e técnicas de inseminação artificial. Realizou-se um ensaio prático com seis animais, realizando colheitas de sémen, avaliação de alguns parâmetros do sémen, controlo folicular por ecografia e inseminação artificial. Apresentam-se os métodos, os resultados e respetiva discussão.

Palavras-chave: Animais exóticos, Inseminação artificial, *Python regius*, Controlo folicular, Avaliação de sémen

Abstract

Exotic animal medicine

This traineeship report describes the activities during the traineeship and develops the theme "Artificial insemination in *Python regius*." The six-month internship was held in Exoclinic - clínica veterinária de aves e exóticos, consolidating knowledge through clinical practice and adding the medical field of exotic animals, with special attention to reptiles. The most frequent clinical cases are developed: preventive medicine in the various classes of animals, dental pathology in rodents and lagomorphs, Psittacine Beak and Feather Disease in birds and anorexia in reptile. The monograph addresses the anatomy, physiology and reproductive behavior of snakes and their influence on reproductive management in captivity, methods for reproductors selection and evaluation and artificial insemination techniques. Implementation of a field trial with six animals, performing semen crops and evaluation of some of its parameters, follicular monitoring by ultrasound and artificial insemination. Methods and results are presented and discussed.

Keywords: Exotic animals, artificial insemination, *Python regius*, follicular control, semen evaluation

Índice geral

Dedicatória	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	v
Índice geral.....	vi
Índice de figuras	viii
Índice de gráficos	x
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
Lista de espécies.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Descrição das atividades	1
2.1. Local de estágio	2
2.2. Casuística.....	6
2.2.1. Atividades desenvolvidas	6
2.2.2. Espécies acompanhadas	10
2.2.3. Casuística clínica	15
2.2.3.1. Medicina Preventiva	18
2.2.4. Casuística por classes de animais	25
2.2.4.1. Patologia dentária em coelhos, porquinhos-da-índia e chinchilas.....	28
2.2.4.2. Doença do bico e das penas dos psitacídeos (Pbfd)	31
2.2.4.3. Anorexia em répteis	32
2.3. Coleção de répteis	34
3. Monografia.....	43
3.1. Inseminação artificial em cobras: introdução	43
3.2. Anatomofisiologia reprodutiva e comportamento reprodutivo das cobras.....	44
3.2.1. Aparelho reprodutivo do macho	45
3.2.2. Aparelho reprodutivo da fêmea.....	46

3.2.3. Comportamento reprodutivo e Maneio reprodutivo em cativeiro	48
3.2.4. Python regius.....	49
3.3. Avaliação Reprodutiva	52
3.3.1. Fêmea	54
3.3.2. Macho.....	55
3.4. Inseminação Artificial – Procedimento	58
3.5. Ensaio prático.....	59
3.5.1. Amostra e avaliação geral.....	60
3.5.2. Colheita e avaliação de sémen (Machos)	62
3.5.3. Controlo folicular ecográfico (Fêmeas)	69
3.5.4. Inseminação artificial.....	73
3.5.5. Discussão dos resultados e investigação futura	74
4. Conclusões gerais.....	76
Referências bibliográficas	78

Índice de figuras

Figura 1 – Consultórios 1 e 2 (A e B, respetivamente)	3
Figura 2 – Internamento	3
Figura 3 – Sala de reuniões / Hotel de animais exóticos	3
Figura 4 – Sala de Cirurgia	4
Figura 5 – Material de imagiologia: aparelho de raio-X (A) e endoscópio (B)	4
Figura 6 – Bloco operatório com equipamento de anestesia volátil e tapete térmico (A e B) e incubadora para recuperação pós-cirúrgica (C).....	5
Figura 7 – Laboratório com máquina de análises bioquímicas, centrífuga e microscópio.	5
Figura 8 - Colheita de sangue em caturra (<i>N. hollandicus</i>)	9
Figura 9 – Agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>). Posicionamento para avaliação radiográfica do membro posterior direito.	10
Figura 10 - Petauro-do-açúcar (<i>Petaurus breviceps</i>).....	12
Figura 11 – Ratazana (<i>Rattus norvegicus</i>). Progenitora e neonatos após ser realizada cesariana, tratamento cirúrgico de distócia.....	17
Figura 12 – Ouriço-pigmeu-africano (<i>Ateleryx albiventris</i>).....	35
Figura 13 – Píton-carpete (<i>Morelia spilota</i>).....	39
Figura 14 – Boa-de-dumeril (<i>Acrantophis dumerili</i>)	40
Figura 15 – Iguana-verde (<i>Iguana iguana</i>).....	40
Figura 16 – Camaleão-pantera (<i>Furcifer pardalis</i>), macho (à esquerda) e fêmea (à direita)	41
Figura 17 - Camaleão de Jackson (<i>Trioceros jacksonii</i>).....	41
Figura 18 – Gecko-de-crista (<i>Correlophus ciliatus</i>).....	41
Figura 19 – Tegu preto e branco gigante (<i>Salvador marianae</i>)	42
Figura 20 – Axolotl (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	42
Figura 21 – Salamandra-tigre (<i>Ambystoma tigrinum</i>)	42
Figura 22 – <i>Python regius</i> , <i>morph</i> : normal.....	50
Figura 23 – Imagem radiográfica de cobra com retenção de ovos. A- projeção dorso-ventral; B – projeção latero-lateral esquerda.	54
Figura 24 – Posicionamento em decúbito esternal, colocação da sonda a cerca de três quintos do corpo da cobra.	55
Figura 25 – sistema de gavetas	60
Figura 26 – Machos utilizados no ensaio. B – Banana; L – Lemonblast calico; Y - Yellowbelly	61
Figura 27 – Fêmea F2 (<i>morph</i> : normal) utilizada no ensaio.	61
Figura 28 – Aparência das amostras de sémen ao microscópio ótico. A – amostra fresca, ampliação 100X; B – amostra corada com Diff-Quick®, ampliação 400X; C – amostra corada com Diff-Quick®, ampliação 1000X.	65
Figura 29 – Folículos pré-vitelogénicos. Primeira avaliação (07-01-2016), fêmea 3.....	70

Figura 30 – Folículos ligeiramente ecogénicos redondos e agrupados em cacho, início da vitelogénese. Terceira avaliação (17-02-2016), fêmea 3.....	70
Figura 31 – Quarta avaliação (18-03-2016). A - Folículo vitelogénico hiperecogénico (rodeado de folículos anecogénicos, mais pequenos), fêmea 1; B - Folículos hiperecogénicos com aspeto alongado, compatíveis com folículos pós-ovulatórios, fêmea 2.....	71
Figura 32 – Folículos com aspeto amorfo e ecogenicidade variável. Quarta avaliação (18-03-2016), fêmea 3.	71
Figura 33 - Folículos com perda de ecogenicidade relativamente à avaliação anterior. Quinta avaliação (22-04-2016), fêmea 1.	72
Figura 34 - Folículos hiperecogénicos com aspeto alongado. Quinta avaliação (22-04-2016), fêmea 2.....	72
Figura 35 - Folículos pequenos e pouco ecogénicos. Quinta avaliação (22-04-2016), fêmea 3.	73

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Distribuição das atividades desenvolvidas – frequência absoluta (n=316).....	8
Gráfico 2 – Distribuição das atividades desenvolvidas – frequência relativa (n=316).....	8
Gráfico 3 - Distribuição por grupos de animais dos casos acompanhados – frequência relativa (n=215)	12
Gráfico 4 - Distribuição da casuística por área – frequência absoluta (n=248)	17
Gráfico 5 - Distribuição da casuística por área – frequência relativa (n=248)	18
Gráfico 6 – Distribuição por área clínica dos casos clínicos de mamíferos – frequência absoluta (n=144)	26
Gráfico 7 – Distribuição por área clínica dos casos clínicos de aves – frequência absoluta (n=77)	27
Gráfico 8 – Distribuição por área clínica dos casos clínicos de répteis – frequência absoluta (n=27)	27
Gráfico 9 – Colheita 17-02-2016 (diluidor: meio de cultura de células Alpha MEM, BioWhittaker®) - Evolução da motilidade ao longo do tempo.....	67
Gráfico 10 - Colheita 26-02-2016 (diluidor: PBS pH7,2) - Evolução da motilidade ao longo do tempo.....	67
Gráfico 11 - Colheita 19-04-2016 (diluidor: NaCl 0,45%) - Evolução da motilidade ao longo do tempo.....	67
Gráfico 12 - Colheita 26-04-2016 (diluidor: meio de cultura de células Alpha MEM, BioWhittaker® enriquecido com glutamina) - Evolução da motilidade ao longo do tempo	68
Gráfico 13 - Colheita 03-05-2016 (diluidor: meio de cultura de células Alpha MEM, BioWhittaker® enriquecido com glutamina) - Evolução da motilidade ao longo do tempo	68
Gráfico 14 – Evolução do tamanho do maior folículo (mm) ao longo da época reprodutiva nas fêmeas 1, 2 e 3 (F1, F2 e F3, respetivamente).....	73

Índice de tabelas

Tabela 1 - Distribuição por espécie de mamíferos (n=120)	13
Tabela 2 - Distribuição por espécie de aves (n=70)	14
Tabela 3 - Distribuição por espécie de répteis (n=23)	15
Tabela 4 – Parâmetros gerais da avaliação reprodutiva – exame clínico (fêmeas e machos) ..	61
Tabela 5 – Parâmetros gerais da avaliação reprodutiva – hematócrito e bioquímicas sanguíneas (fêmeas e machos)	62
Tabela 6 - Peso dos animais no início e no fim da época reprodutiva.	62
Tabela 7 - Motilidade do sémen ao longo do tempo com diferentes diluidores.....	63
Tabela 8 - Esquema de colheitas efetuadas para avaliação da motilidade do sémen ao longo do tempo após colheita (indicando data da colheita, diluidor e temperaturas de armazenamento das amostras).....	64
Tabela 9 - Avaliação da motilidade ao longo do tempo após colheita, para as diferentes datas de colheita.	65
Tabela 10 - Registos do controlo folicular ecográfico.	69
Tabela 11 - Esquema de inseminações realizadas nas fêmeas 1, 2 e 3.	74

Lista de abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico

DVH – doença viral hemorrágica

FSH – hormona foliculoestimulante, do inglês *Follicle-Stimulating Hormone*

GnRH – hormona libertadora de gonadotrofina, do inglês *Gonadotropin-Releasing Hormone*

ICNF – Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

LH – hormona luteínizante, do inglês *Luteinizing Hormone*

PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PBFD – doença do bico e das penas dos psitacídeos, do inglês *Psittacine Beak and Feather Disease*

TSA – teste de suscetibilidade a antibiótico

Lista de espécies

Nome comum

Agapornis ou *love bird*
Arara
Aratinga
Beta-combatente
Canário
Catatua
Catatua-rosa

Caturra
Chinchila
Cobra-do-milho

Coelho
Degu
Doninha
Dragão-barbudo
Esquilo-terrestre-de-richardson
Furão
Galinha
Ganso-ocidental-comum
Gecko-leopardo
Hamster-anão
Hamster-sírio
Iguana-verde
Kingsnake
Lori-arco-íris
Minipig
Ouriço-pigmeu-africano
Papagaio-amazonas
Papagaio-cinzento
Papagaio-do-senegal
Papagaio-ecletus
Periquito
Periquito-de-colar ou *ringneck*
Periquito-de-dorso-vermelho ou *red rumped*
Petauro-do-açúcar

Nome científico

Agapornis roseicollis, *A. fischeri*, *A. personata*
Ara spp.
Aratinga spp.
Betta splendens
Serinus canaria
Família *Cacatuidae*, incluindo género *Cacatua*
Cacatua leadbeateri, também referida como
Lophochroa leadbeateri
Nymphicus hollandicus
Chinchilla laniger
Pantherophis guttatus, anteriormente
designada de *Elaphe guttata*
Oryctolagus cuniculus
Octodon degus
Mephitis mephitis
Pogona vitticeps
Spermophilus richardsonii
Mustela putorius furo
Gallus gallus domesticus
Anser anser
Eublepharis macularius
Phodopus spp.
Mesocricetus auratus
Iguana iguana
Cobras do género *Lampropeltis*
Trichoglossus haematodus
Sus domesticus, raça de
Ateleryx albiventris
Amazona spp.
Psittacus erithacus erithacus
Poicephalus senegalus
Eclectus roratus
Melopsittacus undulatus
Psittacula krameri
Psephotus haematonotus
Petaurus breviceps

Pionus-de-testa-branca	<i>Pionus senilis</i>
Pítton-da-birmânia	<i>Python bivittatus</i>
Pítton-real ou pítton-bola	<i>Python regius</i>
Pombo	<i>Columba livia</i>
Porquinho-da-índia	<i>Cavia porcellus</i>
Ratazana	<i>Rattus norvegicus</i>
Tartaruga-de-esporas-africana	<i>Centrochelys sulcata</i>
Tartaruga semi-aquática	Tartarugas de água doce, incluindo <i>Trachemys</i> , <i>Graptemys</i> , <i>Mauremys</i> , <i>Pseudemys</i> , <i>Macrolemys</i> , <i>Apalone</i> , etc.
Tartaruga-da-flórida	<i>Trachemys scripta</i>
Tartaruga-de-orelhas-vermelhas	<i>Trachemys scripta elegans</i>
Tartaruga-do-mississípi ou tartaruga-mapa	<i>Graptemys pseudogeographica</i>
Tartaruga-leopardo	<i>Geochelone pardalis</i>
Tartaruga terrestre	Familia <i>Testudinidae</i>
Varano-da-savana	<i>Varanus exanthematicus</i>

NOTA: A intenção desta lista é permitir a consulta rápida da denominação científica ou localização taxonómica das espécies animais cujos nomes comuns são referidos no texto do presente trabalho. É de notar, contudo, que alguns nomes comuns são vulgarmente utilizados para denominar diferentes espécies, assim como muitas das espécies possuem mais do que um nome comum, pelo que podem ser encontradas informações díspares noutras fontes.

1. Introdução

O presente relatório de estágio pretende descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular do mestrado integrado em medicina veterinária da Universidade de Évora, assim como, desenvolver o tema “Inseminação artificial em *Python regius*”.

O principal objetivo do estágio curricular, com a duração de seis meses, foi consolidar conhecimentos de medicina veterinária, nomeadamente no que diz respeito à prática clínica, agregando-lhes conhecimentos de uma área pouco abordada durante a componente letiva do curso que é a medicina e cirurgia de animais exóticos. O gosto e interesse pela medicina veterinária de animais exóticos e, em especial, de répteis ditaram a escolha da Exoclinic-Clínica Veterinária de Aves e Exóticos como local de estágio e recomendaram a colaboração do Dr. Carlos Henriques como orientador externo.

A “Inseminação artificial em *Python regius*” como tema para a monografia surgiu de um gosto pessoal por esta espécie de cobra* em particular, agregado ao interesse pela manutenção e reprodução de répteis em cativeiro. O estudo deste tema foi ainda complementado com um ensaio prático com um total de seis indivíduos em que se realizaram colheitas de sémen para inseminação artificial e para avaliação de alguns parâmetros do sémen e controlo folicular por ecografia.

***NOTA:** Ao longo do presente texto optou-se pela utilização do termo “cobra” para referir os espécimes pertencentes à Subordem Ophidia (serpentes). Em português os termos “cobra” e “serpente” são sinónimos, contudo o termo “cobra” é mais vulgarmente utilizado na nossa língua. Em algumas fontes (raras) o termo “cobra” é utilizado para designar apenas os elementos da Família *Colubridae* e na bibliografia anglo-saxónica o termo “cobra” é utilizado para referir as cobras venenosas da Família *Elapidae*.

2. Descrição das atividades

O estágio foi realizado na Exoclinic - Clínica Veterinária de Aves e Exóticos, de 1 de outubro de 2015 a 31 de março de 2016, durante o horário da clínica (segunda e sexta-feira das 10h às 13h e das 15h às 20h; terça, quarta e quinta das 10h às 13h e das 15h às 19h) e um a dois fins-de-semana por mês (sábados das 9h às 14h e tratamentos dos internados nos horários necessários), e assistência em urgências sempre que requerida.

As principais atividades desenvolvidas foram a assistência e auxílio em consultas, incluindo meios de diagnóstico imagiológicos (radiologia e, menos frequentemente, endoscopia e ecografia) e laboratoriais (hematologia e bioquímicas sanguíneas, análises de fezes e urina, citologias de papo e outros); ajuda em cirurgias, geralmente como ajudante de cirurgião e/ou

anestesista; tratamento dos animais internados inicialmente com assistência e posteriormente de modo autónomo e colaboração em consultas externas e consultas ao domicílio.

A Dra. Cristina Almeida demonstra uma preocupação constante com a formação contínua da equipa e dos seus estagiários e nesse sentido, além da frequente discussão dos casos clínicos em equipa e esclarecimento de dúvidas sempre que necessário, foi também organizado um pequeno ciclo de palestras em que cada estagiário elaborou uma breve comunicação. Neste âmbito foi elaborada uma apresentação oral (20 minutos) sobre sexagem de répteis. Foi ainda possível assistir a uma apresentação sobre fisioterapia em mamíferos exóticos e a outra sobre tumores da glândula pituitária em ratazanas.

No último mês do estágio, março de 2016, surgiu a oportunidade de acompanhar a coleção particular do Dr. Carlos Henriques. Durante este mês foi possível participar em atividades de organização, manejo, alimentação, higiene e sanidade de várias espécies de serpentes, lagartos e tartarugas e também algumas espécies de anfíbios (listadas no capítulo 2.3), assim como algumas espécies de mamíferos como o ouriço-pigmeu-africano, o petauro-do-açúcar ou a doninha-fedorenta-listada, ainda que o acompanhamento tenha sido especialmente dirigido para as espécies de répteis.

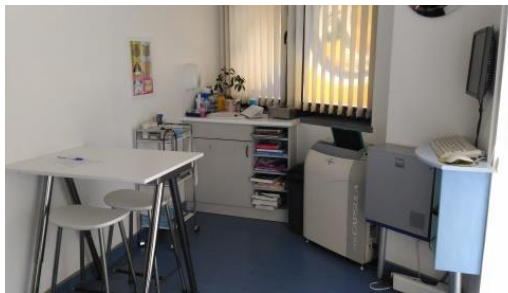
2.1. Local de estágio

A Exoclinic - Clínica Veterinária de Aves e Exóticos foi inaugurada em setembro de 2008 e dedica-se exclusivamente ao atendimento dos novos animais de companhia (aves, répteis e mamíferos exóticos). Em traços gerais pode dizer-se que são alvo desta clínica todas as espécies de animais de companhia, excepto o cão e o gato, não sendo incluídos animais de produção. Com instalações e equipamentos adaptados para o acolhimento, diagnóstico e tratamento de aves, répteis, coelhos, furões, roedores e outros tipos de animais exóticos, a clínica disponibiliza serviços de medicina preventiva e clínica, endoscopia, radiologia digital, análises laboratoriais, anestesia e cirurgia.

No âmbito da medicina preventiva destacam-se os conselhos pré e pós-compra, vacinações, desparasitações, *check-up* (exame físico e exames complementares), determinação do sexo (por endoscopia e análise do ácido desoxirribonucleico (ADN), em especial em psitacédeos), esclarecimento nutricional e de todo o tipo de cuidados de manejo a ter com os animais exóticos; manutenção e corte de guias (penas das asas), bico e unhas; colocação e verificação de *microchip*; elaboração de certificados veterinários e passaporte europeu; consultas de comportamento (auto-mutilação em psitacédeos); apoio técnico a criadores e consultadoria para colecionadores de aves de caça, galináceos ornamentais e outros. A clínica tem ainda serviço

de necrópsia para esclarecer causas de morte. São também disponibilizados serviços de tosquias, banhos e hotel para animais exóticos.

Para o atendimento e prestação destes serviços a clínica conta com dois consultórios (Figura 1), uma sala de internamento (Figura 2) e com uma sala (Figura 3) que funciona como hotel sempre que necessário.



A



B

Figura 1 – Consultórios 1 e 2 (A e B, respetivamente)



Figura 2 – Internamento

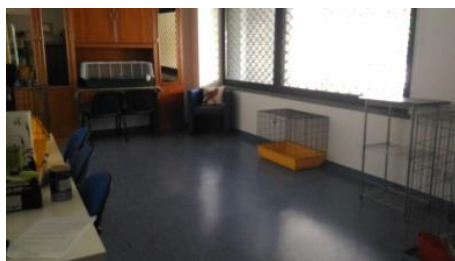


Figura 3 – Sala de reuniões / Hotel de animais exóticos

Na sala de cirurgia (Figura 4) estão instalados o aparelho de raio-x e o endoscópio (Figura 5). Com recurso à endoscopia são disponibilizados serviços de determinação de sexo em aves, tartarugas e lagartos monomórficos; exploração de órgãos internos e diagnósticos de doenças

não detetáveis com outros meios; colheita de biópsias (fígado, rim) e cirurgia endoscópica. A radiologia digital é um meio de diagnóstico de tecnologia avançada que permite a obtenção de imagens rápidas, fiáveis e com alta definição, indispensáveis ao estabelecimento de uma grande variedade de diagnósticos.



Figura 4 – Sala de Cirurgia



A



B

Figura 5 – Material de imagiologia: aparelho de raio-X (A) e endoscópio (B)

O bloco operatório está devidamente equipado (Figura 6) para prevenir riscos anestésicos típicos de animais de pequeno tamanho, como a perda de calor, hipoglicémia, desidratação e hipotensão. As cirurgias mais frequentes são a esterilização/castração de fêmeas e machos de diferentes espécies; correção cirúrgica de sobrecrecimento dentário e abscessos em coelhos, chinchilas, porquinhos-da-índia e outros roedores; exérese de massas, quistos e tumores em várias espécies; extração de ovos retidos em aves e répteis; resolução de prolapsos retais, uterinos ou de cloaca. Outras cirurgias menos frequentes incluem o tratamento de fraturas e luxações.

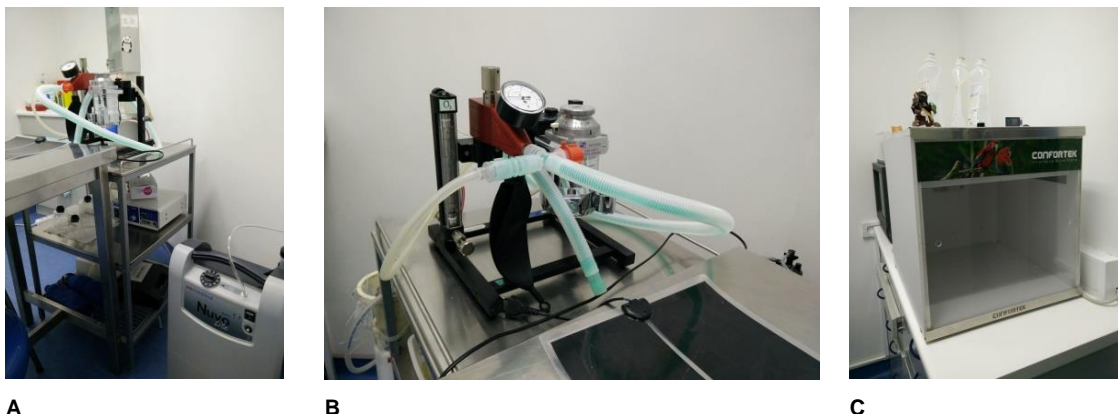


Figura 6 – Bloco operatório com equipamento de anestesia volátil e tapete térmico (A e B) e incubadora para recuperação pós-cirúrgica (C)

A clínica realiza colheita e análise de amostras biológicas como sangue, urina, fezes e outros em laboratório próprio (Figura 7) equipado com centrífuga, máquina de análises bioquímicas e microscópio, e trabalha com laboratórios externos para deteção de agentes específicos ou anticorpos (circovirus, herpesvirus ou doença de Pacheco, determinação do sexo por ADN, entre outros).



Figura 7 – Laboratório com máquina de análises bioquímicas, centrífuga e microscópio.

A equipa médico-veterinária é constituída pela Dra. Cristina Almeida, diretora clínica, com as aves como principal área de interesse, pelo Dr. Carlos Henriques, que dedica especial atenção aos répteis e pela Dra. Carolina Pimenta Lopes, cujo interesse se dirige principalmente aos mamíferos exóticos e aves. A equipa conta ainda com uma enfermeira veterinária e uma auxiliar de medicina veterinária. Além da equipa efetiva, a clínica conta frequentemente com a presença de estagiários de diferentes graus académicos, contribuindo assim para a pedagogia e o desenvolvimento profissional nesta área da medicina de animais exóticos. A equipa organiza anualmente um curso básico sobre animais exóticos, o “Summer school Exoclínic”, e

participa frequentemente, na qualidade de oradores convidados ou de assistentes, em variados cursos e palestras na área da medicina de animais exóticos.

2.2. Casuística

Neste capítulo pretende-se fazer, com recurso à análise estatística dos dados, uma descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio, abordando-se as espécies e os casos clínicos acompanhados.

É de referir que os dados apresentados se referem às atividades desenvolvidas e aos casos clínicos acompanhados e não ao total de atividades e casuística da clínica. Os dados foram tratados em termos de eventos clínicos, isto é, foi considerado um caso clínico de cada vez que um animal deu entrada na clínica. Assim, quando o mesmo animal esteve presente mais do que uma vez durante o período de estágio, foi contabilizado o número de vezes correspondente aos eventos clínicos em que foi acompanhado.

No que respeita às atividades desenvolvidas foram contabilizados o número de casos que foram seguidos em cada atividade. Frequentemente o mesmo caso foi acompanhado em diferentes atividades, tendo sido registado em todas elas (Exemplo: um animal que foi acompanhado na consulta, depois em imagiologia e depois no internamento).

Quanto às espécies acompanhadas, mais uma vez, não representam com rigor as estatísticas da clínica, ainda que possam dar uma ideia aproximada. O interesse pelos répteis, que são menos frequentemente presentes à consulta, e a tentativa de acompanhar os casos de répteis sempre que foi possível, pode ter alterado ligeiramente o que seria a real casuística da clínica em relação a essa classe.

Em relação à casuística clínica, é de salientar que animais com mais do que uma patologia foram contabilizados nas áreas clínicas correspondentes às várias afeções apresentadas, pelo que o número total de casos registados em cada área clínica será maior do que o número total de animais acompanhados. É importante esclarecer que alguns dos diagnósticos são presuntivos, pelo que, nesses casos, a classificação foi baseada na sintomatologia apresentada e não numa patologia específica.

2.2.1. Atividades desenvolvidas

Como é natural, a principal atividade da clínica são as consultas, pelo que a assistência e auxílio em consultas foi uma das principais atividades desenvolvidas. As consultas envolvem,

sempre que há indicação médica e consentimento dos proprietários, o recurso a meios complementares de diagnóstico, tanto imagiológicos como laboratoriais.

Outra área de atividade de destaque durante o estágio foi o internamento, que tem grande expressão na clínica de exóticos, por dois fatores essenciais:

- Por um lado, a maioria dos animais que chega à clínica são presas em natureza, pelo que geralmente mascaram sintomas. Este facto associado a algum desconhecimento dos principais sinais de doença por parte dos proprietários faz com que, tendencialmente, estes animais sejam trazidos à clínica num estado mais avançado de doença e, portanto, inspirem mais cuidados logo no momento da sua apresentação.
- Por outro lado, é frequente que os proprietários não se sintam totalmente à vontade na manipulação destas espécies, particularmente no que diz respeito às aves, pelo que muitos dos tratamentos que poderiam ser feitos em casa, acabam por ser feitos em regime de internamento por opção dos proprietários. Assim, o volume das atividades no internamento acaba por ter uma expressão muito semelhante ao das atividades desenvolvidas em consulta.

Acrescentam-se ainda a cirurgia, que é uma atividade relativamente frequente, e a deslocação para consultas externas (noutras clínicas) ou consultas ao domicílio e a criadores, menos frequentemente.

Estas atividades desenvolvidas refletem-se nos dados apresentados em seguida. Dividiram-se os casos clínicos pelas atividades em que foram acompanhados, considerando para o efeito sete tipos de atividades: consulta, internamento, cirurgia, imagiologia (radiologia, endoscopia e ecografia), laboratório, consulta ao domicílio e consulta externa.

O gráfico 1 reflete o número de casos acompanhados em cada tipo de atividade. As frequências relativas (%) das quatro atividades com mais representação são apresentadas no gráfico 2.

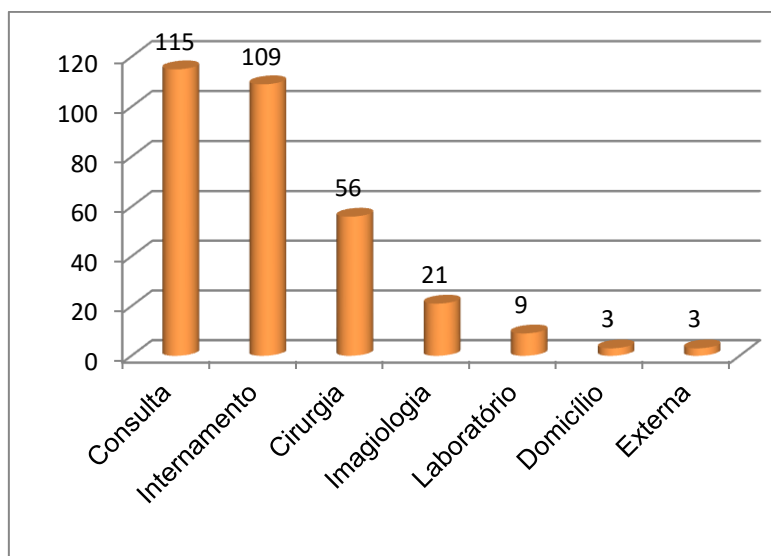


Gráfico 1 – Distribuição das atividades desenvolvidas – frequência absoluta (n=316)

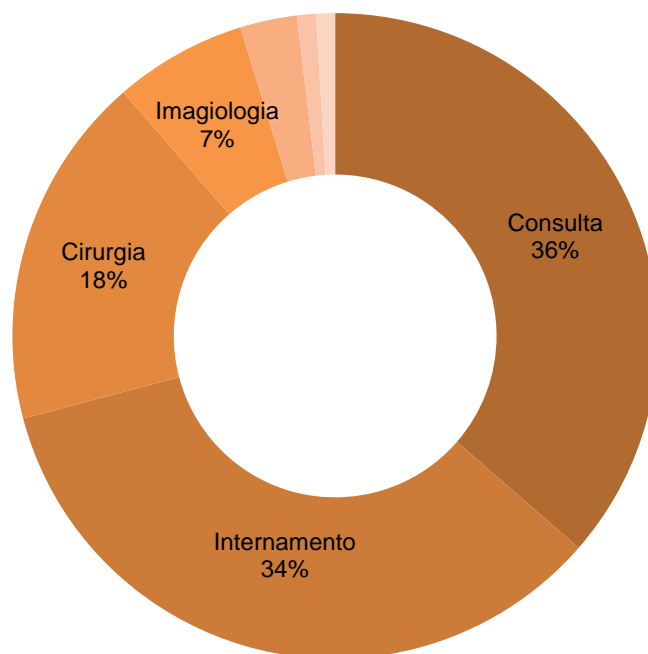


Gráfico 2 – Distribuição das atividades desenvolvidas – frequência relativa (n=316)

Como é possível observar no gráfico 1, foram acompanhados 115 casos clínicos em consulta, tendo sido possível assistir à anamnese e exame clínico, realizar contenção dos animais, auxiliar em tratamentos, auxiliar e realizar colheitas de sangue (ver Figura 8) com supervisão e, posteriormente, discutir e/ou esclarecer dúvidas sobre o caso clínico.



Figura 8 - Colheita de sangue em caturra (*N. hollandicus*)

Os 109 casos clínicos acompanhados no internamento possibilitaram a elaboração de fichas de internamento com instituição do respectivo protocolo terapêutico e cálculo de doses (assistência e realização com supervisão); tratamento dos animais internados, incluindo a sua contenção, administração de fármacos e outros tratamentos, inicialmente com assistência e posteriormente de modo autónomo.

Foram acompanhadas 56 cirurgias, discutindo protocolos anestésicos, monitorizando os sinais vitais do animal e a profundidade anestésica e/ou auxiliando o cirurgião na técnica cirúrgica em questão.

No que se refere à imagiologia, foram acompanhados 21 casos clínicos, na sua maioria auxiliando na realização ou realizando exames radiológicos (ver Figura 9), mas também foi possível assistir a endoscopias e ecografias.



Figura 9 – Agapornis (*Agapornis roseicollis*). Posicionamento para avaliação radiográfica do membro posterior direito.

Os casos seguidos em laboratório englobam hematologia e análises bioquímicas sanguíneas, análises de fezes e urina, citologias de papo e outros.

Foi possível assistir a um total de seis consultas fora da clínica, três consultas ao domicílio e outras três consultas noutras clínicas com quem a Exoclinic tem parceria.

2.2.2. Espécies acompanhadas

Um dos pontos de destaque na clínica de animais exóticos é a grande variedade de espécies que abrange. Importa, portanto, esclarecer dois aspetos no que diz respeito às espécies em causa:

- Em primeiro lugar definir a abrangência da expressão “animais exóticos”. Em rigor, animal exótico é todo aquele que pertence a outra localização geográfica (país ou região) que não aquela em que se encontra, isto é, que não é autóctone¹. Contudo, o termo é vulgarmente utilizado para fazer referência aos novos animais de companhia, isto é, todos os animais de companhia que não sejam o cão e o gato, sejam eles exóticos ou não. É com o sentido desta última definição que o termo “animal exótico” é empregado no presente trabalho.
- Em segundo lugar, é importante tecer algumas considerações legais. De facto, é proibida a captura de qualquer espécie silvestre autóctone, pelo que é proibido capturar e deter como animal de estimação qualquer animal selvagem da fauna europeia. A detenção de espécimes de espécies autóctones provenientes de criação em cativeiro é possível mediante os requisitos exigidos pela Portaria n.º 7/2010 de 5 de janeiro². É

proibida a detenção de espécimes vivos das espécies listadas no Anexo I da Portaria n.º 1226/2009 de 12 de outubro. A detenção de espécimes do Anexo II da Portaria n.º 1226/2009 de 12 de outubro é permitida a maiores de idade, desde que sejam registadas no Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF)³.

Em traços gerais, dentro da classe dos mamíferos são proibidos todos os cetáceos, dugongues, manatins, elefantes, rinocerontes, hipopótamos, ursos, otárias, morsas, focas, todos os canídeos excepto *Canis familiaris*, todos os felídeos excepto *Felis catus* e todos os primatas. Na classe das aves é proibida a detenção de avestruzes, nandus, casuares, emas e pinguins. Proibições com maior interesse na clínica de animais exóticos encontram-se na classe dos répteis, em que é proibida a detenção de todos os membros da ordem *Crocodylia*, todas as tartarugas marinhas e tartarugas-de-couro. No que respeita a lagartos são proibidos todos os monstros-de-gila (*Helodermatidae*) e algumas espécies de varanos (*Varanus spp.*). Quanto às cobras, são proibidas todas as víboras, crotalos e elapídeos, alguns géneros de colubrídeos e algumas espécies de boídeos e pitonídeos. No que respeita aos invertebrados são proibidos todas as centopeias e os escorpiões das famílias *Buthidae* e *Buthridae*.³ Este pequeno resumo em nada substitui a consulta da legislação supracitada para informação mais precisa e detalhada.

É importante ter conhecimento da legislação em vigor, no sentido de esclarecer o proprietário acerca dos aspetos legais relativos à detenção e registo de animais exóticos.

Mais uma vez, devido à grande variedade de espécies tratadas e para não sobrecarregar demasiado o texto com a sua nomenclatura, optou-se pela criação de uma Lista de espécies (página ix) onde se indica o nome científico correspondente a cada nome comum encontrado ao longo do presente trabalho. Neste subcapítulo, contudo, para facilitar a compreensão dos dados, serão apresentadas ambas as formas de nomenclatura.

Apesar da sua abrangência, pode dizer-se que a clínica de exóticos desenvolve a sua atividade em três classes predominantes de animais: mamíferos, aves e répteis. Foram acompanhados 215 casos, dos quais 120 foram mamíferos, 70 foram aves e 23 foram répteis. Foi ainda possível seguir um caso de um marsupial* (petauro-do-açúcar - *Petaurus breviceps*, ver Figura 10) e um de peixe (beta-combatente - *Betta splendens*), que não têm expressão significativa no total de casos, pois a sua percentagem é de aproximadamente 0%. O gráfico 3 mostra as percentagens correspondentes.

***NOTA: Em rigor, taxonomicamente, os marsupiais pertencem à classe dos mamíferos (*Mammalia*), agrupados numa infraclasse própria (*Marsupialia*). No entanto, devido às suas importantes diferenças biológicas, foram contabilizados separadamente.**



Figura 10 - Petauro-do-açúcar (*Petaurus breviceps*)

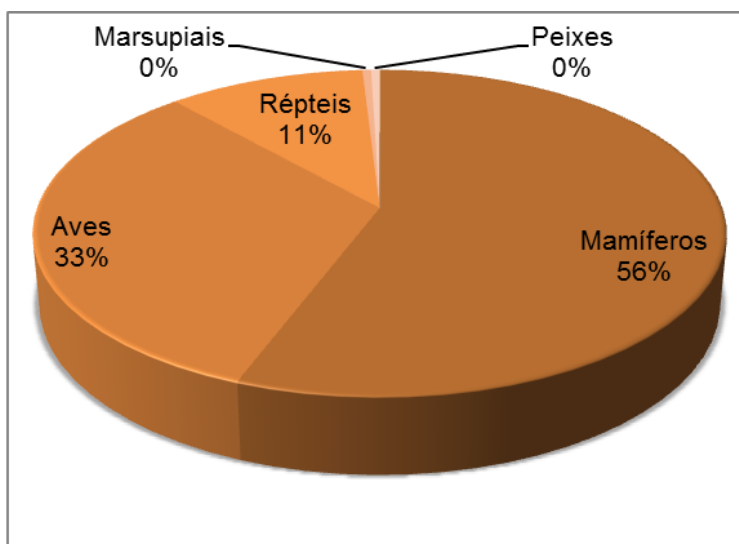


Gráfico 3 - Distribuição por grupos de animais dos casos acompanhados – frequência relativa (n=215)

Num total de 120 mamíferos (Tabela 1), o animal mais frequente é sem dúvida o coelho - *Oryctolagus cuniculus* (48,3%), seguido do porquinho-da-índia - *Cavia porcellus* (17,5%), da chinchila - *Chinchilla laniger* (13,3%) e do furão - *Mustela putorius furo* (10%). Menos frequentemente foram acompanhados hamsters - *Mesocricetus auratus* e *Phodopus spp.* (cinco casos), ratazanas - *Rattus norvegicus* (três casos), minipigs - raça de *Sus domesticus* (três casos), um degu - *Octodon degus* e um esquilo-terrestre-de-richardson - *Spermophilus richardsonii*.

Tabela 1 - Distribuição por espécie de mamíferos (n=120)

	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Coelho	58	48,3
Porquinho-da-índia	21	17,5
Chinchila	16	13,3
Furão	12	10,0
Hamster	5	4,2
Ratazana	3	2,5
Minipig	3	2,5
Degu	1	0,8
Esquilo Richardson	1	0,8

Quanto às aves, segunda classe mais frequente, é notória uma maior diversidade de espécies. Num total de 70 aves acompanhadas (Tabela 2), o mais frequente é o papagaio-cinzento - *Psittacus erithacus erithacus* (21,4%), seguido da caturra - *Nymphicus hollandicus* (14,3%) e do papagaio-amazonas - *Amazona spp.* (12,9%) em terceiro lugar. Seguem-se, por ordem decrescente de frequência, o periquito - *Melopsittacus undulatus*, o canário - *Serinus canaria*, o agapornis – *Agapornis spp.*, o papagaio-eclétus - *Eclectus roratus*, a catatua – *Cacatua spp.* e *Lophocroa leadbeateri*, o lori-arco-íris - *Trichoglossus haematodus*, o periquito-de-colar ou ringneck - *Psittacula krameri*, o pombo - *Columba livia*, pionus-de-testa-branca – *Pionus senilis*, a aratinga – *Aratinga spp.*, o periquito-de-dorso-vermelho ou red rumped - *Psephotus haematonotus*, o papagaio-do-senegal - *Poicephalus senegalus*, a arara – *Ara spp.*, o ganso-ocidental-comum - *Anser anser* e a galinha - *Gallus gallus domesticus*.

Tabela 2 - Distribuição por espécie de aves (n=70)

	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
<i>P. e. erithacus</i>	15	21,4
<i>N. hollandicus</i>	10	14,3
<i>Amazonas spp.</i>	9	12,9
<i>M. undulatus</i>	7	10,0
<i>S. canaria</i>	6	8,6
<i>Agapornis spp.</i>	6	8,6
<i>E. roratus</i>	2	2,9
<i>Cacatua spp.</i>	2	2,9
<i>T. haematodus</i>	2	2,9
<i>P. krameri</i>	2	2,9
<i>C. livia</i>	2	2,9
<i>P. senilis</i>	1	1,4
<i>Aratinga spp.</i>	1	1,4
<i>P. haematonotus</i>	1	1,4
<i>P. senegalus</i>	1	1,4
<i>Ara spp.</i>	1	1,4
<i>A. anser</i>	1	1,4
<i>G. g. domesticus*</i>	1	1,4

*O caso que é apresentado de *G. g. domesticus*, representa uma consulta ao domicílio a um bando de 68 galinhas de raça índio negro combatente. Optou-se por contabilizar apenas um caso de forma a não enviesar a casuística.

Os répteis são a classe menos representada. Como se pode observar na tabela 3, num total de 23 répteis acompanhados, contaram-se oito tartarugas semi-aquáticas (34,8%) dos géneros *Trachemys* e *Graptemys*, cinco píton-real - *Python regius*, três tartarugas terrestres (13%) das espécies *Centrochelys sulcata* e *Geochelone pardalis*, duas iguanas – *Iguana iguana*, dois dragões-barbudos – *Pogona vitticeps*, um gecko-leopardo - *Eublepharis macularius*, um varano-da-savana – *Varanus exanthematicus* e uma píton-da-birmânia – *Python bivittatus*.

Tabela 3 - Distribuição por espécie de répteis (n=23)

	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Tart. semi-aquática	8	34,8
<i>P. regius</i>	5	21,7
Tart. terrestre	3	13,0
<i>I. iguana</i>	2	8,7
<i>P. vitticeps</i>	2	8,7
<i>E. macularius</i>	1	4,3
<i>V. exanthematicus</i>	1	4,3
<i>P. molurus</i>	1	4,3

2.2.3. Casuística clínica

Para uma sistematização da casuística geral, optou-se por agrupar os casos clínicos em 15 áreas diferentes: “medicina preventiva”, “dentário”, “digestivo”, “reprodutivo”, “neoplásico”, “dermatológico”, “metabólico”, “respiratório”, “infeccioso”, “ortopédico”, “urinário”, “neurológico”, “endócrino”, “comportamental” e “outros”.

Mais uma vez, importa referir que alguns diagnósticos foram presuntivos, em especial quando o diagnóstico definitivo implica análises laboratoriais mais dispendiosas, como culturas com teste de suscetibilidade a antibiótico (TSA), pesquisas de antígenos ou anticorpos específicos por PCR (reação em cadeia da polimerase) ou análises histopatológicas. Também nos casos de morte súbita ou eutanásia primária em estados de agonia evidente, os proprietários raramente recorrem à necropsia, pelo que o diagnóstico definitivo fica em falta. Nestes casos foi tida em consideração a sintomatologia apresentada para a classificação dentro de uma determinada área clínica. Este é o motivo pelo qual não foram dadas às diferentes áreas denominações de áreas médicas, mas sim denominações relativas ao sistema de órgãos com o qual estão relacionadas as patologias e/ou os sinais clínicos presentes (por exemplo, optou-se pela denominação “digestivo”, em vez de gastroenterologia, porque em alguns casos a sintomatologia é relacionada com o sistema digestivo – como no caso da anorexia – mas pode não corresponder a uma patologia gastrointestinal).

Sob o domínio da medicina preventiva incluem-se as consultas de primeira vez sem achados clínicos relevantes, as consultas de rotina ou *check-up*, e as consultas para desparasitação e/ou vacinação. Os casos de medicina dentária consistem sobretudo em condições de sobrecrecimento dentário de pré-molares e molares e, menos frequentemente, de incisivos, com ou sem doença periodontal associada, e abscessos dentários. Nos casos de sistema digestivo foram incluídos os de hipomotilidade gastrointestinal, diarreia, gastroenterite, impactação gástrica ou intestinal, rotura de papo, megabacteriose, intoxicação alimentar,

estomatite e também sintomatologia inespecífica do foro digestivo como a anorexia ou hiporexia. Entre os casos clínicos do foro reprodutivo destacam-se a ovariectomia (OVH) e orquiectomia eletivas. Nesta categoria foram ainda incluídos os casos de sexagem, estase folicular e retenção de ovo, quistos ováricos, distócia (ver Figura 11), metrite, pseudogestação, ovopostura exagerada, estro persistente e prolapso de pênis. Nos casos de neoplasias acompanharam-se indivíduos com massas tumorais, com diferentes graus de malignidade, em alguns casos sem diagnóstico histopatológico definitivo. A maioria dos casos tratou-se de neoplasias cutâneas e subcutâneas, por vezes com envolvimento de glândulas de marcação, mas também foram acompanhados casos de tumores de órgãos internos, como timomas e massas abdominais. Nos casos de dermatologia incluem-se doenças parasitárias, alopecia e mudas exuberantes, disecdise, escoriações, pododermatite e quistos foliculares. Nas afeções metabólicas consideraram-se a doença hepática e desequilíbrios nutricionais, deficiências minerais e vitamínicas. Os casos de patologia respiratória abrangeram pneumonia, aerossaculite, doença respiratória crónica, rotura de traqueia, sarna das vias aéreas e patologia respiratória inespecífica. Nas patologias infecciosas estão compreendidos os casos de PBF (doença do bico e das penas dos psitacídeos, do inglês *Psittacine Beak and Feather Disease*), doença de newcastle (suspeita), sífilis (*Treponema cuniculi*) e casos fortemente suspeitos de doença infecciosa, sem diagnóstico definitivo. Dentro da área clínica de ortopedia foi possível acompanhar casos de fratura de rádio e de tíbia, sobrecrecimento de bico por má oclusão, anquilose de membro posterior e malformação tíbio-társica. Nas afeções do sistema urinário foram incluídas a doença renal, a urolitíase e a infeção trato urinário inferior. Quanto a afeções do foro neuroológico, puderam acompanhar-se casos de infeção por *Encephalitozoon sp.*, de sintomatologia neuroológica em ave compatível com doença de newcastle, e de sinais neuroológicos inespecíficos. Entre as patologias endócrinas estão o estro persistente e doença adrenal em furões, e ovopostura exagerada numa caturra. Nos casos clínicos do foro comportamental encontram-se casos de picacismo em psitacídeos e marcação territorial exuberante em coelho. Foram incluídos na categoria outros os casos com sintomatologia inespecífica (prostração, corpo em bola em aves), sem diagnóstico definitivo, sobre os quais não havia elementos que permitissem colocá-los numa das outras categorias.



Figura 11 – Ratazana (*Rattus norvegicus*). Progenitora e neonatos após ser realizada cesariana, tratamento cirúrgico de distúcia.

Os dois gráficos que se seguem apresentam a distribuição da casuística por área clínica. Num total de 248 casos, as diferentes áreas apresentaram a frequência absoluta exposta no gráfico 4.

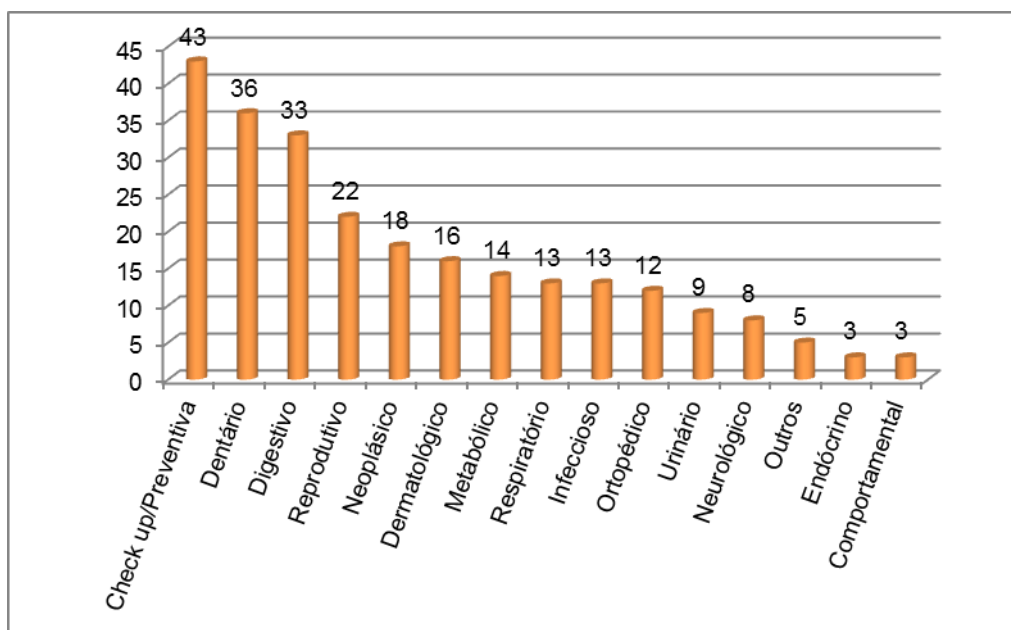


Gráfico 4 - Distribuição da casuística por área – frequência absoluta (n=248)

As sete áreas clínicas mais representadas têm a sua frequência relativa (%) apresentada sobre o gráfico circular a baixo (Gráfico 5). A área que assume maior importância é a medicina preventiva (17%), seguida dos casos de medicina dentária (15%), que são exclusivamente

compostos pela classe dos mamíferos, especificamente lagomorfos e roedores, e dos casos que envolvem o sistema digestivo (13%), que incluem indivíduos das três classes de animais. Seguem-se, por ordem decrescente de frequência, os casos de sistema reprodutivo (9%), as neoplasias (7%), os casos dermatológicos (7%), metabólicos (6%), respiratórios (5%), infecciosos (5%), ortopédicos (5%), urinários (4%), neurológicos (3%), outros – com sintomatologia inespecífica e sem diagnóstico definitivo – (2%), os casos de sistema endócrino (1%) e comportamentais (1%).

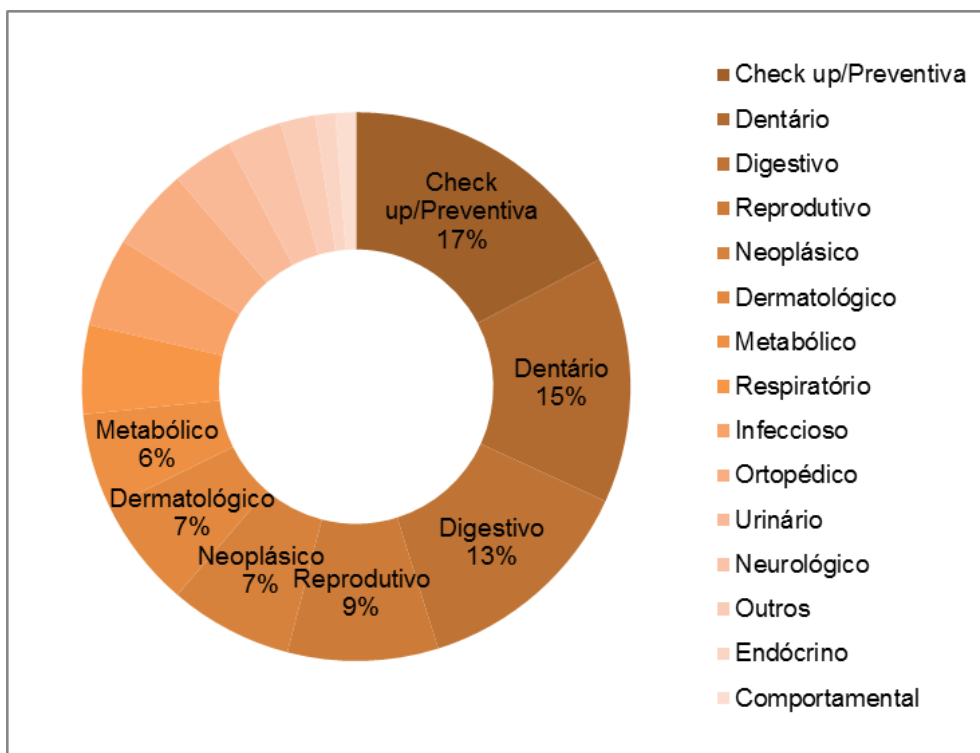


Gráfico 5 - Distribuição da casuística por área – frequência relativa (n=248)

2.2.3.1. Medicina Preventiva

A medicina preventiva é, nas três classes de animais apresentadas, uma área que se destaca. A medicina preventiva é uma componente muito importante na manutenção da saúde dos animais exóticos e o ideal seria que os animais fossem levados a uma consulta veterinária pelo menos uma a duas vezes por ano⁴.

Além de uma anamnese e exame físico completos, numa consulta de medicina preventiva em animais exóticos assume grande importância o esclarecimento sobre os cuidados a ter com a espécie em questão. Os proprietários devem ser educados sobre o manejo adequado, a dieta e nutrição, alojamento e condições ambientais e as opções de enriquecimento ambiental, de forma a assegurar o bem-estar físico e psicológico dos animais, contribuindo para diminuir a incidência de problemas médicos em pequenos mamíferos exóticos, aves e répteis^{4,5,6,7}.

Vacinação

Em Portugal não existe obrigatoriedade legal de vacinação para as espécies exóticas (exceptuam-se os casos de viagens ou exportações). Em geral apenas são vacinados os coelhos, furões e *minipigs*.

Em coelhos destacam-se duas doenças virais – mixomatose e doença viral hemorrágica (DVH) - para as quais a prevenção assume grande importância. A vacinação tem o principal papel na prevenção destas doenças, no entanto também é importante o controlo de vetores e de fomites⁸. A mixomatose e a doença viral hemorrágica (DVH) são doenças contagiosas que afetam coelhos europeus e apresentam alta morbidade e mortalidade em animais suscetíveis. A mixomatose é causada pelo mixomavírus, um poxvírus do género *Leporipoxvirus*. A doença viral hemorrágica tem como agente etiológico um calicivírus, do género *Lagovirus*^{9,10,11}.

Já existe vacinação contra a mixomatose há algum tempo. Todas as vacinas são vacinas vivas, com o vírus da mixomatose atenuado ou com o vírus do fibroma de Shope. A vacina com vírus do fibroma de Shope depende da imunidade cruzada e é considerada menos imunogénica. A vacina com o vírus atenuado tem demonstrado ser muito imunossupressora, especialmente em coelhos jovens, podendo levar a graves problemas de infeção respiratória bacteriana. A duração descrita para estas vacinas é de quatro a seis meses. As vacinas para a DVH consistem em preparações do vírus inativado, proveniente do fígado de coelhos infetados, às quais é adicionado um adjuvante. Estas vacinas estimulam uma resposta imune eficaz, no entanto os adjuvantes utilizados podem provocar reações indesejadas no local da injeção.

Atualmente existe uma nova vacina recombinante com o vírus vivo da mixomatose vetorizado com o vírus da doença viral hemorrágica, conferindo imunidade contra ambas as doenças. Os estudos têm demonstrado ser segura e eficaz e tem a vantagem de assegurar protecção durante um ano. Esta nova vacina é atualmente a mais recomendada e está disponível em Portugal (Nobivac Myxo-RHD®). A vacina bivalente deve ser administrada pela primeira vez entre as 3 e as 4 semanas de idade, seguida de reforço anual^{11,12}.

O furão, como vários outros mamíferos carnívoros, é suscetível e capaz de transmitir raiva, pelo que a vacinação para esta doença é de extrema importância. Esta vacina é obrigatória em muitos dos países em que a detenção de furões é legal e, ainda que não seja obrigatória em Portugal, é indispensável para a maioria das viagens e exportações de furões.

Em Portugal existe uma vacina contra a raiva licenciada para mustelídeos - RABISIN® (Merial Portuguesa – Saúde Animal, LDA.). Outras vacinas monovalentes contra a raiva estão disponíveis em Portugal para cães e gatos e podem ser usadas *extra-label*¹².

Deve ser feita a primovacinação da raiva às 12 semanas de idade e depois o reforço deve ser anual, inclusivamente se for utilizada uma vacina para cães em que o reforço recomendado pelo fabricante seja de três em três anos^{13,14}.

Os furões são também suscetíveis ao vírus da esgana canino (CDV – Canine distemper virus). A esgana é uma doença com 100% de mortalidade em furões, pelo que a vacinação é extremamente importante em países onde a esgana é endémica. A escolha de uma vacina contra a esgana para furões não é simples. Existem várias vacinas caninas multivalentes que incluem proteção contra o vírus da esgana e em alguns países está ou esteve disponível uma vacina monovalente licenciada para furões. Em Portugal não está disponível nenhuma vacina contra a esgana para furões e nenhuma das vacinas caninas contra a esgana é monovalente. A utilização de vacinas *extra-label* pode ser justificada face à elevada mortalidade associada a esta doença. No entanto é importante a realização de uma análise cuidada dos riscos e benefícios em cada caso particular, envolvendo o proprietário na decisão de forma informada, e ter em especial atenção as possibilidades de efeitos adversos. No caso de se optar pela vacinação *extra-label* a combinação esgana/parvovirose canina parece ser a mais utilizada. Em Portugal está disponível a vacina Nobivac Puppy DP®^{12,13,14}.

O esquema vacinal pode ser semelhante ao da vacina da raiva, isto é, a primovacinação realizada às 12 semanas e o reforço anualmente. No entanto, em países em que a esgana é endémica está indicado um esquema com três administrações iniciais, às 6-8 semanas, às 10-12 semanas e às 13-14 semanas de idade, igualmente seguidas do reforço anual¹³.

É importante salientar a propensão desta espécie para reações vacinais. Estão descritas reações adversas à vacinação contra a raiva e esgana em furões, quer as vacinas sejam aplicadas separadamente ou em simultâneo, ainda que a vacina da esgana esteja descrita como mais frequentemente causadora de reações adversas. As reações dão-se geralmente imediatamente após a administração da vacina e são reações de hipersensibilidade e anafilaxia, incluindo hiperémia generalizada, salivação, vômito e diarreia, variando entre 0,5 a 1% e 5,6 a 5,9%, dependendo dos autores. Após a vacinação, é aconselhável permanecer vigilante por, pelo menos 10 a 25 minutos e estar preparado para tratar possíveis reações anafiláticas^{14,15,16}.

Os minipigs de companhia* não são mais do que diferentes raças do porco doméstico - *Sus domesticus* - e, como tal, são suscetíveis de contrair as mesmas doenças infecciosas que afetam porcos domésticos em regime de suinicultura. São várias as doenças infecciosas que podem acometer os suínos e existem licenciadas em Portugal vacinas para 16 doenças suínas diferentes. No entanto, algumas destas doenças só afetam animais em regime intensivo, e outras não têm importância clínica em porcos de companhia.

***Nota: Legalmente, em Portugal, não se prevê a detenção de porcos como animais de companhia, sendo permitidos apenas como animais de exploração.**

Os minipigs de companhia não estão geralmente em grupos nem em pares, são frequentemente animais solitários, adultos ou independentes (isto é, desmamados), que vivem em ambientes de higiene cuidada, estando muito menos expostos e não sendo, em geral, afetados pelas doenças dos suínos em explorações comerciais. Por outro lado, os animais de companhia têm uma relação bastante próxima com os humanos, e a sua conhecida semelhança biológica reforça, ainda mais do que para outras espécies, a importância da prevenção de doenças zoonóticas. É o caso da gripe^{12,17,18}.

A gripe suína é causada pelo vírus da Influenza A, subtipos H1N1, H3N2 ou H1N2, e é a principal causa de surtos de doença respiratória aguda em porcos. Frequentemente os minipigs são infetados pelo contacto com os proprietários doentes e, quando infetados, podem também transmitir o vírus a humanos com quem tenham contacto. A gripe suína raramente é fatal e é geralmente autolimitante, com sintomatologia muito semelhante à observada em humanos, incluindo sintomatologia respiratória, prostração, febre, anorexia, perda de peso, com maior ou menor gravidade. Os suínos podem ser vacinados contra a gripe, e em Portugal estão disponíveis duas vacinas: Gripork® (Arbuset - Produtos Farmacêuticos e Sanitários de Uso Animal, Lda.) e Gripovac 3® (Merial Portuguesa - Saúde Animal, Lda.).

A primovacinação consiste em duas administrações com 3 semanas de intervalo, entre as 8 e as 14 semanas de idade. A imunidade conferida pelas vacinas varia entre 4 a 6 meses, mas considerando a sazonalidade da doença, pode optar-se por vacinar anualmente no início do outono/inverno^{12,19}.

Alguns autores referem a importância da vacinação dos minipigs contra o mal rubro (*Erisipelotrix rhusiopathiae*) e a leptospirose suína. Quando se trata de animais em criação, nos reprodutores pode ser relevante a vacinação contra a parvovirose suína e em leitões assumem importância as colibaciloses, clostridioses e outras enterites e enterotoxémias. Em Portugal estão disponíveis vacinas contra o mal rubro e parvovirose suína e contra várias doenças causadoras de diarreias neonatais. A vacina contra a leptospirose suína não está disponível em Portugal.

É importante referir que, em qualquer dos casos, os minipigs devem ser vacinados com vacinas licenciadas para suínos. As vacinas caninas não conferem imunidade contra as doenças dos porcos^{12,17,18,20}.

Existe uma grande variedade de doenças virais às quais as aves de companhia são suscetíveis e estão descritas algumas vacinas aviárias, não só para animais de capoeira (galiformes e anseriformes), pombos (columbiformes) e rapinas (falconiformes e stringiformes), mas também para psitacídeos e passeriformes (maioria das aves de companhia).

Por exemplo, está descrita a utilização de vacinas contra PBFD nos Estados Unidos da América e na Austrália, existem vacinas contra herpesvirus que previnem a sintomatologia associada à doença de Pacheco embora não previnam a infeção latente e disseminação do vírus, a vacinação para newcastle está disponível na Europa e existem ainda licenciadas vacinas contra poxvirus para diversas aves de capoeira, pombos e papagaios-amazonas e contra poliomavirus para psitacídeos. É importante esclarecer que muitas vacinas aviárias indicadas para galinhas ou outras aves de capoeira ou pombos, não devem ser utilizadas em psitacídeos sob pena de não serem imunogénicas (por exemplo, por a estirpe do vírus não ser a mesma) ou de terem efeitos adversos (por exemplo, provocar a doença).

De qualquer modo, em Portugal a vacinação de aves de companhia não é prática corrente. Embora estejam licenciadas diversas vacinas para aves de capoeira, o mesmo não acontece em relação aos psitacídeos e passeriformes^{12,21}.

A utilização de vacinas para prevenção de doenças virais em répteis é uma área ainda pouco explorada. Ainda que existam registos da sua utilização, não é uma prática corrente²².

Desparasitação

A desparasitação profilática tem como objetivo prevenir a infeção/infestação e/ou eliminar ou reduzir cargas parasitárias existentes, por vezes ainda sem sintomatologia associada, de forma a evitar que se manifestem doenças parasitárias. Neste sentido, não se pretende abranger todos os agentes parasitários a que os animais são suscetíveis, mas sim os mais comuns e/ou mais importantes clinicamente.

De uma forma geral, as desparasitações profiláticas são feitas uma a duas vezes por ano, com um antiparasitário de largo espetro, preferencialmente alternando o princípio ativo. A ivermectina e o febendazol têm indicação para a maioria das espécies, na prevenção de uma grande variedade de doenças parasitárias.

- Mamíferos

Os coelhos podem ter pulgas do cão e do gato (*Ctenocephalides spp.*) ou, menos frequentemente, próprias do coelho (*Spilopsyllus spp.*), piolhos (*Haemodipsus ventriculosus*) e ácaros (*Psoroptes cuniculi* e *Cheyletiella parasitivorax*). A selamectina é eficaz contra pulgas e ácaros e a ivermectina é eficaz contra piolhos e ácaros. É de referir que o fipronil está descrito como estando associado a mortalidade em coelhos, pelo que não deve ser utilizado.

Os helmintes são muito pouco frequentes em coelhos, muito ocasionalmente podem encontrar-se oxiúros e cestodes de mamíferos como *Taenia spp.* no mesentério. Os coelhos podem ter coccidiose provocada por diversas espécies de *Eimeria*.

O *Encephalitozoon cuniculi* assume especial importância clínica em coelhos, podendo mais raramente infetar outros mamíferos. Este parasita é um microsporídio intracelular obrigatório que pode causar encefalite granulomatosa e nefrite. *E. cuniculi* é um parasita oportunista que se manifesta especialmente em indivíduos imunodeprimidos, muito frequentemente com quadros de síndrome vestibular. A encephalitozoonose dos coelhos é uma infecção persistente com prevalências que rondam os 60 a 70%. O tratamento com febendazol controla a sintomatologia, mas não elimina o parasita. A prevenção com febendazol geralmente evita a manifestação da doença em coelhos infetados e clinicamente saudáveis^{23,24}.

Em porquinhos-da-índia a sarna é dos problemas dermatológicos mais frequentes e é provocada por *Trixacarus caviae*, ou, menos frequentemente, *Chirodiscoides caviae*. Os piolhos *Gliricola porcelli* e *Gyropus ovalis* também podem ser encontrados. Ivermectina e selamectina são eficazes no controlo de parasitas externos. Podem encontrar-se ocasionalmente *Eimeria caviae*, o protozoário *Balantidium* e o nemátode *Paraspidodera uncinata*. O *Cryptosporidium wrairi* pode provocar diarreias e não há tratamento eficaz²⁵.

Em chinchilas é frequente a presença de *Giardia spp.* nas fezes que, em condições de stress, pode provocar doença. Febendazol é eficaz e mais seguro que o metronidazol em chinchilas. O pelo fino e denso das chinchilas confere proteção contra parasitas externos²⁶.

As sarnas são bastante comuns em hamsters. Com regularidade encontram-se *Demodex criceti* e *Demodex aurati* sem sintomatologia associada, mas em animais geriátricos ou submetidos a fatores de stress podem causar doença. *Notoedres spp.* também pode ser encontrado. O tratamento com ivermectina é o mais indicado²⁷.

Os furões podem ser infestados por pulgas (*Ctenocephalides spp.*), geralmente por contacto com cães ou gatos infestados. Podem desenvolver sarna otodécica e sarcoptica. Ivermectina é eficaz contra os ácaros e a selamectina é eficaz contra ácaros e pulgas. Os endoparasitas não são frequentes em furões de companhia. Estão descritas infeções por nematodes (incluindo ancilostomídeos), cestodes e protozoários (incluindo *Cryptosporidium* e *Sarcocystis*). As parasitoses mais comuns são a coccidiose e giardiose, especialmente em furões jovens. As infeções por helmintes são tão pouco frequentes que dificilmente se justifica o uso profilático de antihelmínticos^{28,29,30}.

Os minipigs não costumam ser muito afetados por endoparasitas. As desparasitações devem ser baseadas em análises de fezes de rotina (uma a duas vezes por ano) e dependem do parasita encontrado. Ivermectina é eficiente contra *Ascaris suum*, *Hyostrogylus sp.*,

Strongyloides ransomi, *Oesophagostomum spp.* e *Metastrongylus sp.* Para o tratamento de infecções por *Trichuris suis* o febendazol é eficaz¹⁸.

- Aves

Parasitas intestinais são pouco frequentes em psitacídeos domésticos, sendo um pouco mais comuns em pequenos psitacídeos como periquitos, caturras e agapornis. Podem encontrar-se coccídias (*Eimeria* e *Isospora*), *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Trichomonas*. A presença de nematodes (*Ascaridia* e *Capillaria*) só se costuma observar em aves de origem selvagem ou em aviários exteriores com contacto com aves silvestres. Nos grandes psitacídeos também é pouco habitual a presença de ácaros, mas por vezes *Knemidocoptes spp.* parasitam periquitos e caturras³¹.

Nos passeriformes, os ácaros (*Knemidocoptes pilae*, *Dermation spp.*, *Dermanyssus gallinae*, *Ornithonyssus sylviarum*) são bastante frequentes e a ivermectina é eficaz no seu controlo. Estes animais podem sofrer de coccidioses (*Isospora serini*, *Isospora canaria*, *Cryptosporidium spp.*). *Cochlosoma spp.* é um flagelado com importância clínica e *Giardia spp.* também se pode observar. Estão descritos helmintes da família Spiruroidea e cestodes em passeriformes insetívoros³².

Nos columbiformes os parasitas são mais frequentes. É comum a observação de piolhos (*Columbicola columbae*) e, menos frequentemente, de ácaros. *Trichomonas gallinae* var. *columbae* também está descrito. *Dermanyssus sp.* é comum em galiformes^{33,34}.

- Répteis

Em répteis os ácaros hematófagos são relativamente comuns e os ixodídeos (como *Amblyomma*) também podem ser encontrados nestes animais, especialmente se provenientes de captura selvagem. Ivermectina ou selamectina são eficazes no tratamento. Os ectoparasitas tornam comum a presença de hemoparasitas como *Haemogregarina*, *Hepatozoon* e *Ehrlichia*.³⁵

Quanto a endoparasitas, os protozoários são um achado frequente em análises fecais de répteis, no entanto, a maioria não é patogénica. As coccídeas (como *Eimeria*, *Isospora*) geralmente são patogénicas e espécie-específicas, estando descrita uma grande variedade de espécies em lagartos e cobras, mas também em tartarugas e crocodilos. A associação trimetropim sulfadiazina parece ser eficaz no tratamento.

Cryptosporidium é bastante comum e especialmente preocupante na criação de animais. É frequente em lagartos e cobras, mas também já foi descrito em tartarugas marinhas. Em répteis

não é autolimitante e está associado a elevada mortalidade. Não existe tratamento efetivo, pelo que a quarentena de animais e colheita de amostras fecais seriadas (devido à excreção intermitente) é essencial para prevenção^{35,36}.

Os nematodes são frequentes quer em animais de captura selvagem, quer em animais criados em cativeiro. Os mais comuns são os oxyurídeos que não são patogénicos excepto se presentes em elevada densidade, no entanto, podem ser causa de atrasos no crescimento. Strongilídeos estão associados a ulceração hemorrágica severa e perfuração da mucosa gastrointestinal e obstrução em cobras e lagartos e ascarídeos se presentes em cargas elevadas também podem provocar ulceração e perfuração gastrointestinal, especialmente em cobras. Febendazol e ivermectina são eficazes no tratamento de infeções por nematodes³⁶.

Nas tartarugas terrestres é frequente encontrarem-se nematodes, já em tartarugas semi-aquáticas os parasitas intestinais são menos abundantes. É de notar que a ivermectina está descrita como sendo neurotóxica em tartarugas, pelo que não deve ser utilizada nestes animais^{37,38}.

Os trematodes são frequentes em animais de captura selvagem mas em cativeiro são autolimitantes ou não têm expressão clínica. Os cestodes geralmente não causam doença clínica a menos que a carga parasitária seja muito elevada, mas podem afetar o crescimento do animal. Praziquantel é eficaz no tratamento de ambos³⁶.

2.2.4. Casuística por classes de animais

Num leque de espécies tão variado, faz sentido abordar também a casuística por classes. Assim, o gráfico 6 espelha a distribuição por áreas dos casos clínicos de mamíferos.

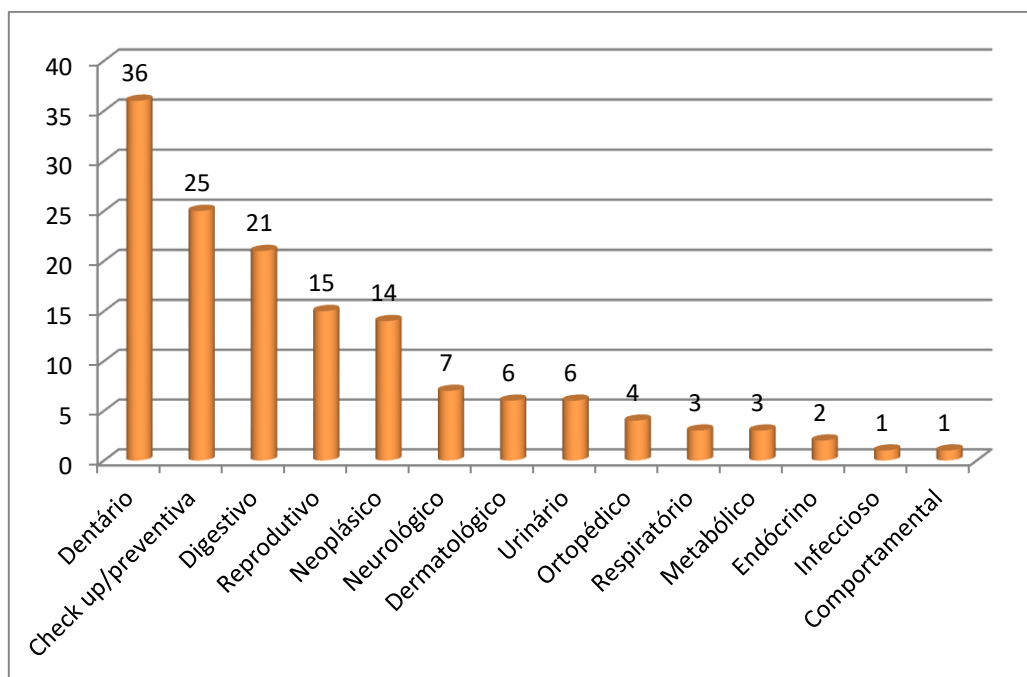


Gráfico 6 – Distribuição por área clínica dos casos clínicos de mamíferos – frequência absoluta (n=144)

As patologias dentárias, em mamíferos, assumem uma posição de grande destaque, tendo sido até mais frequentes que as consultas de medicina preventiva nesta classe. Pela expressão que apresenta, a patologia dentária em coelhos, porquinhos-da-índia e chinchilas será desenvolvida no subcapítulo 2.2.4.1..

No que respeita às aves, a seguir à medicina preventiva, as patologias infecciosas foram os casos mais frequentes, logo seguidas das patologias respiratórias e metabólicas como é evidente no gráfico 7.

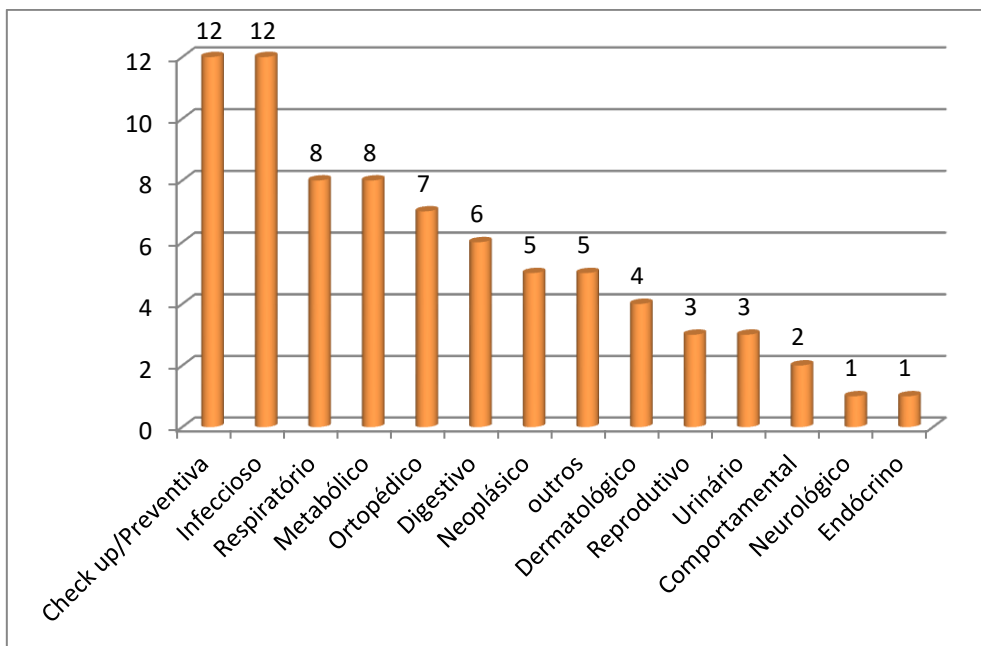


Gráfico 7 – Distribuição por área clínica dos casos clínicos de aves – frequência absoluta (n=77)

A maioria das patologias infecciosas em aves correspondeu a casos de PBFDF confirmado ou suspeito, pelo que o tema será apresentado no subcapítulo 2.2.4.2..

Na classe dos répteis (Gráfico 8), num total de 27 casos, foi acompanhado igual número de casos (6 casos) de medicina preventiva e relacionados com o sistema digestivo, tendo sido os mais frequentes. Seguem-se, por ordem de frequência, os casos dermatológicos (5 casos), reprodutivos (4 casos), metabólicos (4 casos) e respiratórios (2 casos).

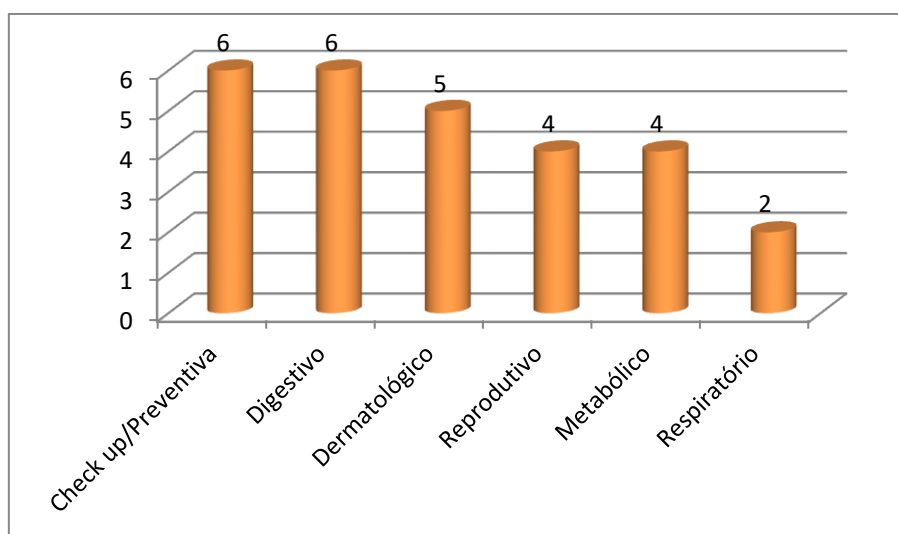


Gráfico 8 – Distribuição por área clínica dos casos clínicos de répteis – frequência absoluta (n=27)

Os casos classificados como digestivos não correspondem necessariamente a uma patologia digestiva primária, no entanto as queixas baseavam-se em sintomatologia digestiva. Todos os casos englobados nessa área clínica incluíram queixas de anorexia, em dois deles foi diagnosticada estomatite e noutros dois foi diagnosticada, por palpação, impactação intestinal. Estes temas são discutidos no subcapítulo 2.2.4.3..

2.2.4.1. Patologia dentária em coelhos, porquinhos-da-índia e chinchilas

Os mamíferos exóticos afetados por patologia dentária foram coelhos, porquinhos-da-índia e chinchilas. Estes animais apresentam uma considerável predisposição para patologia dentária que importa abordar.

Os coelhos são lagomorfos enquanto os porquinhos-da-índia e as chinchilas são roedores. A distinção prende-se com alguns aspetos da sua dentição: os coelhos são duplicidentata (isto é, têm dois pares de incisivos maxilares) e difiodontes (isto é, têm duas dentições – caduca e definitiva), enquanto os roedores são simplicidentata (têm apenas um par de incisivos maxilares) e monofiodontes (com apenas uma dentição durante toda a vida). No entanto, esta distinção não traz diferenças relevantes no que respeita à patologia dentária de lagomorfos e roedores caviomorfos. Lagomorfos (coelhos) e roedores caviomorfos (porquinhos da índia, chinchilas, degus) não têm dentes caninos e no lugar destes têm um espaço (diastema) entre os incisivos e os pré-molares e molares. Os dentes pré-molares e molares são semelhantes em anatomia e função, pelo que geralmente são chamados em conjunto de “*cheek teeth*”, dentes da bochecha. Lagomorfos e caviomorfos são hipsodontes arradiculares, isto é, possuem a coroa dentária muito desenvolvida e não têm verdadeiras raízes anatómicas. Ainda que frequentemente se chame raiz do dente à porção de dente sob a gengiva, em rigor estes animais possuem a coroa clínica (acima da gengiva) e a coroa de reserva (abaixo da gengiva). À raiz aberta dá-se o nome de ápice do dente. Finalmente, coelhos, porquinhos-da-índia e chinchilas têm em comum uma característica particularmente importante na fisiopatogenia da patologia dentária: são elodontes completos, isto é, todos os seus dentes são de crescimento e erupção contínuos.^{39,40}

À predisposição anatomofisiológica adiciona-se pelo menos uma das quatro causas primárias: má oclusão congénita (predisposição racial em verdadeiros coelhos anões, rara em roedores), trauma (exemplos: fraturas de incisivos, roer grades), doença óssea metabólica (reportada em coelhos, mas não em roedores) ou uso insuficiente da dentição por dieta inadequada. O ponto em comum é o desgaste insuficiente das coroas clínicas, conduzindo a sobrecrecimento dentário^{39,40,41}.

A causa primária mais frequente é a dieta ser inadequada, levando à impossibilidade de desgaste necessário dos dentes. O desgaste dos dentes pré-molares e molares (que são os mais frequentemente afetados, apesar dos incisivos serem mais evidentes para o proprietário) faz-se principalmente à custa de movimentos de lateralização da mandíbula durante a mastigação de alimentos fibrosos como o feno. O fornecimento excessivo de ração, sementes, fruta, ou alimentos inapropriados em detrimento do feno e vegetais frescos leva ao uso insuficiente e conseqüente sobrecrecimento dentário. Os músculos mastigadores e o aumento de pressão ao nível dos dentes da bochecha contrariam o crescimento das coroas clínicas, levando ao desvio do ápice e sobrecrecimento das coroas de reserva. Os dentes mandibulares curvam medialmente em direção à língua, enquanto os dentes maxilares curvam lateralmente, crescendo em direção às bochechas. Este fenómeno diminui a superfície de oclusão e os movimentos laterais da mastigação tornam-se insuficientes. Os animais rejeitam o feno e procuram alimentos mais fáceis de mastigar, diminuindo ainda mais os movimentos de lateralização da mandíbula. A falta de desgaste dos dentes leva à formação de espículas capazes de provocar úlceras na língua (dentes mandibulares) e na mucosa bucal (dentes maxilares). O desconforto e dor oral levam frequentemente à hiporexia ou anorexia.

Por outro lado, o sobrecrecimento das coroas de reserva leva à deformação do ápice e perfuração do osso cortical. O suporte vascular ao ápice do dente fica comprometido, levando a perda de função (os dentes deixam de crescer), fragilidade e propensão para fraturas. Além disso o aumento do espaço interdentário por desvio e laxitude dos dentes aumenta o risco de infecção periapical (possibilidade de osteomielite focal), que frequentemente leva a infecção dos tecidos moles, causando abscessos faciais, que constituem a complicação mais comum da patologia dentária^{39,40,41}.

É de notar que o sobrecrecimento de pré-molares e molares com frequência conduz a um prognatismo mandibular funcional, levando a má oclusão dos incisivos, que por essa razão se apresentam sobrecrecidos. Os incisivos mandibulares crescem em direção ao lábio, enquanto os incisivos maxilares tendem a curvar-se em direção ao palato. O sobrecrecimento dos incisivos também afeta as coroas de reserva, podendo causar obstrução do ducto nasolacrimal e lesões oculares. Ainda que possa ocorrer sobrecrecimento dos dentes incisivos devido a má oclusão primária congénita em coelhos, esta causa é muito menos frequente^{39,40,41}.

As apresentações clínicas mais comuns são a diminuição da ingestão de comida, anorexia ou disfagia (e conseqüente sialorreia), sobrecrecimento de incisivos e tumefação facial, e dependem da fase em que se encontra o processo patológico.

A patologia dentária adquirida apresenta várias fases que importa identificar no sentido de estabelecer um prognóstico e implementar um tratamento. Numa fase inicial observa-se

sobrecrescimento das coroas clínicas e os primeiros pré-molares começam a curvar. Nesta fase é frequente não haver qualquer tipo de sintomatologia, sendo o diagnóstico feito por observação da cavidade oral durante o exame físico e/ou por imagem radiológica. Numa fase um pouco mais avançada a formação de espículas começa a causar desconforto e, posteriormente, lesões na língua e mucosa oral. Nesta altura podem existir queixas relacionadas com a ingestão de alimento como hiporexia e apetite caprichoso, disfagia, sialorreia, anorexia e perda de peso. Entretanto, o crescimento das coroas de reserva, deformação apical e infeção periapical resultam em afeção dos tecidos moles envolventes, podendo aparecer sinais clínicos como tumefação facial ventrolateral ou lateral, exoftalmia e lesões oftálmicas decorrentes da formação de abscessos e/ou obstrução do ducto nasolacrimal.

Numa fase final ocorre reabsorção do tecido ósseo e dentário. Dependendo do número e localização dos dentes afetados, os animais podem ser incapazes de ingerir qualquer dos componentes da sua dieta normal, ficando dependentes de alimentação húmida (comercial ou caseira).

As complicações diretas mais frequentes são infeções periapicais, osteomielite e abscessos faciais. Indiretamente, devido à anorexia, é muito frequente a hipomotilidade gastrointestinal estar associada à patologia dentária adquirida^{39,41,42}. Este fenómeno explica que os casos clínicos relacionados com o sistema digestivo se encontrem em terceiro lugar (por ordem de frequência), logo a seguir à patologia dentária e medicina preventiva. A maioria desses casos consistiu em hipomotilidade gastrointestinal primária ou secundária a problemas de dentes.

A abordagem terapêutica geralmente deve passar por tratamento dentário cirúrgico, associado a tratamento médico. Em casos de sobrecrescimento ligeiro por uso insuficiente, detetado precocemente, sem espículas e sem sintomatologia associada pode optar-se pela introdução ou correção das percentagens de incorporação de feno na dieta. Se ainda existir um plano de oclusão adequado e os animais mantiverem um apetite normal, o incremento de alimento fibroso (feno) na dieta pode reverter ou, pelo menos, impedir o avanço do sobrecrescimento dentário. Animais nestas circunstâncias devem ser reavaliados com bastante frequência (intervalo máximo de 3 meses)^{39,41,43}.

O tratamento médico adequado à patologia dentária adquirida consiste em anitibioterapia, baseada em cultura e TSA sempre que possível; analgesia, de forma a combater a anorexia provocada por dor oral; e tratamento de suporte (alimentação forçada, fluidoterapia e tratamento específico para hipomotilidade gastrointestinal se for o caso).

O tratamento dentário pode incluir redução de coroas clínicas e/ou extração dentária, quer de incisivos, quer de pré-molares e molares. A redução de coroas é especialmente útil nas fases iniciais da patologia dentária e em animais com doença óssea metabólica. É possível limar as espículas, permitindo a cicatrização da mucosa lesada e reduzindo o desconforto oral, e

restaurar o comprimento e o ângulo normal das coroas, aproximando-os o mais possível do plano de oclusão normal. Embora não permita reverter as alterações ao nível das coroas de reserva e ápices dos dentes, este procedimento reduz a pressão nos dentes, possibilitando novamente os movimentos laterais de mastigação e contrariando alguns passos da fisiopatogenia descrita, como o “afrouxamento” do dente e a deformação apical e do osso cortical^{39,41,43}.

A extração está indicada se houver fratura ou luxação associada a infeção periapical ou se existirem deformações profundas difíceis de corrigir apenas por redução de coroa num dente particular. Deve evitar-se a extração de dentes da bochecha sempre que possível, extraíndo um máximo de dois dentes pré-molares ou molares em cada quadrante, recordando que os dentes opositores ficarão com o seu desgaste comprometido e podem necessitar de correções periódicas.

Casos com afeção dos tecidos moles envolventes e formação de abscessos, exigem, além do tratamento dentário, com extração do dente afetado, tratamento cirúrgico extraoral, incluindo desbridamento e marsupialização do abscesso^{39,41,43}.

2.2.4.2. Doença do bico e das penas dos psitacídeos (Pbfd)

A doença do bico e das penas dos psitacídeos (vulgarmente denominada por Pbfd, do inglês *Psittacine Beak and Feather Disease*) é causada por um circovírus que apenas afeta psitacídeos, particularmente os do “velho mundo” (Austrália e África), como papagaios-cinzentos, catatuas, agapornis, loris e periquitos. Alguns psitacídeos do novo mundo (Américas), como papagaios-amazonas, araras e conures, podem ser portadores assintomáticos, excretando o vírus para o ambiente sem desenvolver doença. A infeção pode dar-se por via aérea (inalação), oral (ingestão) ou por contacto com fomites. Os materiais infecciosos são fezes, várias excreções e secreções (como secreções do papo) ou pó das penas de animais infetados^{31,44}.

A doença pode apresentar-se de três formas distintas: hiperaguda, aguda e crónica. A forma hiperaguda caracteriza-se por pneumonia, entrite, septicémia, perda de peso e morte, por vezes leucopenia e necrose hepática também estão presentes. Em alguns casos pode ocorrer morte súbita. Esta forma é comum em aves jovens, especialmente em papagaios-cinzentos e catatuas neonatos.

A forma aguda da doença está associada a depressão (anorexia, estase de papo, enterite e pneumonia podem estar presentes) e alterações distróficas das penas, com progressão rápida (80-100% das penas afetadas no espaço de uma semana). Estas alterações consistem em

perda de penas por muda prematura, necrose e hemorragia dos canhões das penas. Pode estar presente anemia não regenerativa, com hematócrito de 14 a 25%.

A forma crónica caracteriza-se por uma distrofia progressiva e simétrica das penas em desenvolvimento, que piora sucessivamente a cada muda. Pode observar-se penas retidas, hemorragia do canhão das penas, penas encaracoladas e constrição circunferencial do eixo da pena, levando a necrose. As plumas e as penas de cobertura do corpo são geralmente as primeiras a ser afetadas, enquanto as remiges (penas de voo da asa) primárias são afetadas em último lugar. As aves podem desenvolver alopecia completa e por vezes alterações do bico, como sobrecrecimento e necrose do palato. Frequentemente os animais estão imunocomprometidos e morrem por infeção secundária. Aves que desenvolvem a forma crónica, geralmente são aves que sobreviveram à forma aguda da doença e desenvolvem uma infeção latente que pode demorar anos a expressar sintomatologia novamente^{21,31,45}.

O diagnóstico definitivo é feito por PCR em amostras de sangue total, biopsias de pele ou canhões de penas recém-retiradas. O teste por PCR também pode ser utilizado para detetar a presença do vírus no ambiente.

Não existe tratamento específico para PBF. O tratamento com imunoestimulantes (interferão aviário tem sido usado com sucesso em fases virémicas iniciais) e tratamento de suporte podem ajudar. Está descrita recuperação em periquitos, agapornis e loris.

A prevenção assume um papel muito importante. O circovirus causador da PBF é um vírus sem involucro, bastante resistente no ambiente, podendo manter-se viável durante vários anos. A desinfecção do ambiente com hipoclorito de sódio ou iodo a 10% parece ser eficaz na eliminação do vírus. É de extrema importância a testagem por PCR e o isolamento dos animais afetados e dos que estiveram em contacto com animais afetados. Deve ponderar-se eutanásia, especialmente em coleções, para evitar a disseminação do vírus. Animais com teste positivo para PBF e sem sintomas podem apresentar virémia transitória, devem ser isolados e testados novamente ao fim de 90 dias. Nessa altura um teste negativo indica que o animal está livre da infeção^{21,31,45}.

2.2.4.3. Anorexia em répteis

Nos casos relacionados com o sistema digestivo, por vezes pela sintomatologia e não por diagnóstico definitivo, as queixas de anorexia estiveram sempre presentes. Concomitantemente à anorexia, em dois deles foi diagnosticada estomatite e noutros dois impactação intestinal.

A estomatite infecciosa é muito frequente em boídeos e pitonídeos (como a *Python regius*, espécie em que foram diagnosticados os dois casos). A patologia apresenta uma fase inicial de hiperémia da mucosa e petéquias no palato, passando para gengivite com perda de dentes, edema das mucosas e tumefação mandibular, culminando com acumulação de pus na cavidade oral e dispneia em casos severos. A anorexia verifica-se desde fases muito iniciais, mesmo quando a restante sintomatologia ainda não é muito evidente. Pode estar envolvida uma grande diversidade de agentes infecciosos pelo que está indicada a cultura e TSA. O tratamento consiste em lavagens da cavidade oral com antisépticos e antibioterapia sistémica e local⁴⁶.

Os casos de impactação gastrointestinal, presumivelmente, estiveram associados a desidratação. A baixa humidade no terrário e as temperaturas reduzidas que diminuem a atividade dos animais, incluindo o consumo de água e de alimento podem conduzir a desidratação. A desidratação ligeira (ou hipohidratação, como também é designada por alguns autores), ainda que tenha sinais clínicos subtis, pode ser suspeitada pela anamnese. Os répteis não possuem ansa de Henle, pelo que não conseguem concentrar a urina. Em vez disso os nefrónios deixam de funcionar e a urina é reabsorvida dos túbulos distais e trato urinário inferior até que o equilíbrio hídrico seja repostado. As baixas temperaturas levam a uma diminuição da taxa metabólica que por sua vez diminui a filtração glomerular, agravando a desidratação. Por estes factos a desidratação é um processo crítico em répteis, que deve ser tido em consideração e tratado agressivamente desde as fases mais precoces.

As condições ambientais inapropriadas e consequente diminuição do metabolismo também afetam os processos digestivos, podendo predispor para impactação gastrointestinal. A impactação gastrointestinal também pode ocorrer por parasitismo elevado, sendo importante a realização de análises fecais regulares e desparasitações sempre que exista indicação⁴⁷.

A anorexia é um sinal clínico que pode estar presente numa grande variedade de doenças infecciosas e metabólicas, condições ambientais e de manejo inapropriadas e problemas comportamentais. As condições de manejo inadequadas são a causa mais frequente.

Condições de temperatura abaixo do adequado para a espécie podem levar a anorexia sazonal, assim como temperaturas demasiado elevadas sem possibilidade de local para fugir ao calor. A oferta de alimento inadequado à espécie, de tamanho incorreto ou em localizações ou horários inapropriados para a espécie também pode levar à falta de apetite (nesse caso o animal comerá se o alimento apropriado estiver presente no local certo durante o seu horário de atividade). Um ciclo diário adequado e iluminação de qualidade são importantes.

Além disso os répteis, em geral, necessitam de alimento com menos frequência do que os animais endotérmicos a que as pessoas mais estão habituadas. A oferta de comida em quantidade exagerada ou com demasiada frequência pode levar a que o animal não coma

simplesmente porque está saciado. Por outro lado, algumas espécies em cativeiro podem ficar “cansadas” de uma dieta repetitiva, necessitando de uma dieta mais variada. Maneio alimentar incorreto com desequilíbrios nutricionais, hipovitaminoses e/ou hipervitaminoses podem levar a doenças metabólicas e anorexia.

O terrário, os acessórios e a sua disposição (exemplo: falta de esconderijos) podem levar a anorexia. Um animal em condições de stress (demasiada exposição), com demasiada manipulação, recém-adquirido ou mudado de ambiente ou que não se adaptou ao cativeiro (síndrome de mal-adaptação) pode apresentar anorexia. Fatores sociais levam a que animais dominantes impeçam os restantes de comer, pelo que pode ser aconselhável que vivam ou sejam alimentados em separado.

Existem ainda casos de anorexia fisiológica, como é o caso do período da muda em muitas espécies de cobras ou durante processos reprodutivos. Fêmeas gestantes, durante ovulação e ovopostura ou a incubar ovos é normal não comerem. Machos em atividade reprodutiva também podem apresentar anorexia temporária⁴⁸.

Diminuição da alimentação e, conseqüentemente, do aporte energético, conduz a perda de tecido muscular e adiposo e a desidratação (excepto se o consumo de água for mantido). A mobilização do tecido adiposo leva a lipidose hepática, patologia que também contribui para anorexia⁶.

A anorexia não é uma doença, pelo que o seu tratamento deve ser dependente da determinação da causa primária. De qualquer modo, um animal debilitado por anorexia prolongada precisa de ser alimentado, com recurso a alimentação assistida ou alimentação entérica (por tubo orogástrico, esofagostomia ou faringostomia). É importante que a desidratação que está presente na maioria dos casos de anorexia seja corrigida antes de iniciar o suporte nutricional. A quantidade (2 a 10% do peso corporal) e tipo de alimento podem variar bastante com a espécie e as condições de debilidade do animal em causa. Em todo o caso, deve começar-se o suporte nutricional por quantidades pequenas e ir aumentando gradualmente. Animais em anorexia prolongada, quando sobrealimentados, podem desenvolver uma condição chamada síndrome de realimentação, que envolve hipocalémia e hipofosfatémia, que pode pôr em risco a vida do animal^{6,48}.

2.3. Coleção de répteis

O mês de março de 2016, último mês do estágio, foi dedicado ao acompanhamento das atividades desenvolvidas na coleção particular do Dr. Carlos Henriques. A coleção tem como

principal objetivo a reprodução e criação de algumas espécies de animais exóticos, especialmente répteis.

Foram desenvolvidas atividades de organização, como o auxílio na elaboração de listas de animais e outros registos. As atividades relacionadas com o manejo assumem grande expressão, incluindo instalação de animais, preparação de alojamentos (terrários, aquaterrários, etc.), respeitando as condições de temperatura, humidade, fotoperíodo, ambiente (arborícolas, desérticos, aquáticos, etc.) e outras necessidades adequadas à espécie em questão. No manejo é também incluído o manejo reprodutivo, como alteração das condições ambientais de acordo com a fase do ciclo reprodutivo, colocação dos animais em casais ou grupos de acasalamento, monitorização de posturas, incubação e eclosão de ovos. Foi possível ainda a colaboração na alimentação de animais e higiene dos *habitats* e o envolvimento nas questões de sanidade animal, realizando tratamentos preventivos e clínicos, quando necessário.

No desenvolvimento destas atividades foi possível contactar com uma considerável variedade de espécies, tendo sido dirigida especial atenção para os animais ectotérmicos (répteis e anfíbios), cujas espécies se encontram listadas a baixo (agrupadas taxonomicamente para facilidade de compreensão). A coleção inclui ainda algumas espécies de mamíferos, como ouriço-pigmeu-africano (*Ateleryx albiventris*, ver Figura 12), petauro-do-açúcar (*Petaurus breviceps*), doninha (*Mephitis mephitis*), rato espinhoso (*Neacomys spinosus*), ratazanas (*Rattus norvegicus*) e ratos (*Mus musculus*).



Figura 12 – Ouriço-pigmeu-africano (*Ateleryx albiventris*)

É de notar que não foram realizadas todas as atividades descritas na totalidade das espécies listadas. As várias atividades foram desenvolvidas nas diferentes espécies de acordo com as

necessidades e rotinas pré-estabelecidas. As figuras 13 a 21 mostram algumas das espécies abordadas.

Lista de Répteis e Anfíbios

Classe *Reptilia*

Ordem *Squamata*

Subordem *Ophidia (serpentes)*

Família *Pythonidae*

Python

P. regius

P. molurus

Aspidites

A. ramsayi

Morelia

M. viridis

M. spilota

Família *Boidae*

Acrantophis

A. dumerili

Epicrates

E. cenchria

Eryx

E. colubrinus

Família *Colubridae*

Lampropeltis

L. triangulum

Pantherophis

P. guttatus

Euprepiophis

E. mandarinus

Subordem *Lacertilia (lagartos)*

Infraordem *Iguania*

Família *Iguanidae*

Iguana

I. iguana

Brachylophus

B. fasciatus

Família *Agamidae*

Pogona

P. vitticeps

Moloch

M. horridus

Família *Chamaeleonidae*

Chamaeleo

Ch. calyptratus

Trioceros

T. jacksonii

Furcifer

F. pardalis

Infraordem Gekkota

Família Gekkonidae

Phelsuma

Ph. madagascariensis

Eublepharis

E. macularius

Família Diplodactylidae

Correlophus

C. ciliatus

Rhacodactylus

R. leachianus

Infraordem Scincomorpha

Família Teiidae

Salvador

S. marianae

Infraordem Varanoidea

Família Varanidae

Varanus

V. acanthurus

V. beccarii

V. exanthematicus

Ordem Chelonii / Testudines

Família Emydidae

Graptemys

G. pseudogeographica

Pseudemys

P. nelsoni

Família Kinosternidae

Sternotherus

S. carinatus

Família Testudinidae

Geochelone

G. sulcata

Agrionemys

A. horsfieldii

Classe *Amphibia*

Ordem Anura

Família *Hylidae*

Agalychnis

A. callidryas

Família *Dendrobatidae*

Dendrobates

D. azureus

D. leucomelas

Família *Ceratophryidae*

Ceratophrys

C. ornata

Ordem Caudata

Família *Ambystomatidae*

Ambystoma

A. mexicanum

A. tigrinum

Família *Salamandridae*

Cynops

C. orientalis



Figura 13 – Píton-carpete (*Morelia spilota*)



Figura 14 – Boa-de-dumeril (*Acrantophis dumerilii*)



Figura 15 – Iguana-verde (*Iguana iguana*)

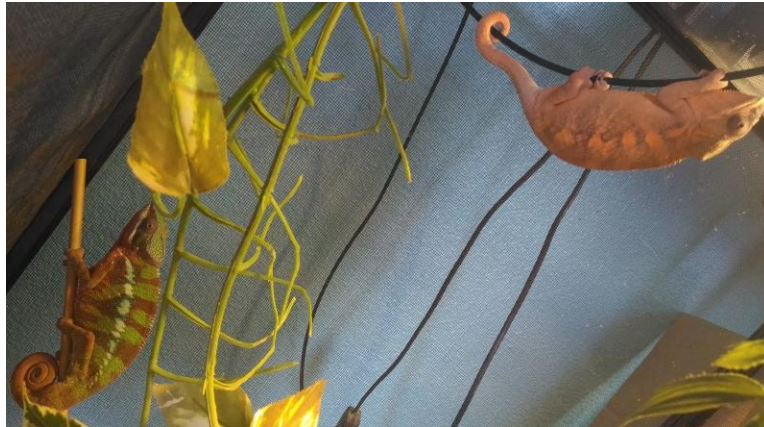


Figura 16 – Camaleão-pantera (*Furcifer pardalis*), macho (à esquerda) e fêmea (à direita)



Figura 17 - Camaleão de Jackson (*Trioceros jacksonii*)



Figura 18 – Gecko-de-crista (*Correlophus ciliatus*)



Figura 19 – Tegu preto e branco gigante (*Salvador marianae*)



Figura 20 – Axolotl (*Ambystoma mexicanum*)



Figura 21 – Salamandra-tigre (*Ambystoma tigrinum*)

3. Monografia

Neste capítulo pretende-se desenvolver o tema “Inseminação artificial em *Python regius*”, abordando-se as questões anatômicas e fisiológicas essenciais à compreensão do aparelho reprodutivo das cobras, assim como o comportamento reprodutivo e a sua influência no manejo reprodutivo em cativeiro. Os protocolos específicos para reprodução de cobras em cativeiro dependem bastante da espécie em questão, pelo que se discutem as condições específicas para a criação de *Python regius*. São ainda abordados métodos de avaliação reprodutiva dos indivíduos fundamentais para a prática da inseminação artificial, assim como métodos e técnicas de inseminação artificial propriamente dita.

Ao trabalho de revisão bibliográfica acrescenta-se a exposição de um ensaio prático, levado a cabo durante o período de estágio, que teve como objetivo a inseminação artificial de três fêmeas de *Python regius*. Nesse sentido fizeram-se colheitas de sémen em três machos a partir das quais se fez avaliação de alguns parâmetros do sémen e se inseminaram as fêmeas, e controlo folicular ecográfico de forma a monitorizar as fases do ciclo reprodutivo das fêmeas. Apresentam-se os métodos do estudo efetuado, os seus resultados e respetiva discussão.

3.1. Inseminação artificial em cobras: introdução

A herpetocultura é uma área que tem vindo a expandir-se ao longo das últimas três décadas. Com o crescente interesse em manter répteis como animais de estimação e conseqüente procura destes animais, tem crescido também o interesse pela sua reprodução e criação em cativeiro.

Além da sua cada vez maior importância no mundo do comércio de animais exóticos, a reprodução de répteis em cativeiro representa uma mais-valia para a conservação das espécies: por um lado, porque os conhecimentos utilizados nesta área podem ser utilizados em programas de conservação e recuperação de espécies; mas também porque ajudam a combater a captura e comércio ilegais de espécimes selvagens, uma vez que aumentam a disponibilidade de animais provenientes de reprodução em cativeiro de forma legal. Na nossa opinião, as ferramentas da área da reprodução devem ser utilizadas com responsabilidade e, preferencialmente, em conjunto com medidas de informação, educação e sensibilização da população para as problemáticas da conservação, das espécies ameaçadas e da manutenção de espécies em cativeiro.

A *Python regius* está entre as espécies mais comumente reproduzidas em cativeiro, juntamente com as cobras-do-milho, *kingsnakes*, geckos-leopardo, dragões-barbudos, tartarugas-leopardo e tartarugas-de-esporas-africanas e várias espécies de tartarugas semi-aquáticas⁴⁹.

A inseminação artificial, por sua vez, pode ser uma mais-valia na reprodução de cobras em cativeiro. Esta técnica pode ser uma solução para alguns problemas da reprodução em cativeiro como a ausência de cópulas (por vezes um casal com interesse reprodutivo não apresenta comportamento de corte e cópula) ou outros problemas com a conceção e risco para a saúde ou até para a vida dos animais em espécies em que o encontro e/ou a própria cópula se possam tornar bastante agressivos.^{50,51,52}

Como para outras espécies de animais, também em répteis e em cobras em particular há interesse em manter um banco de sémen, quer para fins de conservação de espécies, quer para fins comerciais. A partilha de genes entre cidades ou países diferentes sem necessidade de transporte dos animais, evitando *stress* e alterações das condições ambientais, pode ser outra vantagem da técnica.⁵¹

Além do mais, existe uma enorme variedade de espécies de répteis e, em particular, de cobras, com origem em ambientes muito diferentes e que desenvolveram adaptações específicas e características biológicas muito variáveis. Uma informação validada para uma determinada espécie ou grupo de animais, não é necessariamente válida para outros, ainda que sejam da mesma família, género ou mesmo da mesma espécie numa localização diferente e por isso as generalizações podem levar a erros.⁵⁰ Nesse sentido, é de extrema importância científica a realização de trabalhos de investigação nestas e noutras áreas da biologia destes animais, para tantas espécies quanto possível, seja em cativeiro ou em estado selvagem.

3.2. Anatomofisiologia reprodutiva e comportamento reprodutivo das cobras

Para nos dedicarmos não só à medicina de cobras em geral mas em especial à área da reprodução destes animais em cativeiro, recorrendo a inseminação artificial ou não, é essencial um conhecimento aprofundado da sua anatomia, fisiologia e comportamento reprodutivos.

É importante ressaltar desde já que, além de vários pormenores que variam entre espécies, existe uma diferença bastante relevante entre oviparidade e viviparidade. Existem cobras ovíparas que no termo da gestação fazem uma ovopostura e o final do desenvolvimento embrionário ocorre no ovo e fora do corpo da progenitora durante o período de incubação; e existem cobras vivíparas em que o desenvolvimento embrionário ocorre na sua totalidade dentro do corpo da progenitora. Ainda que grande parte da informação apresentada seja aplicável a ambos os casos, o trabalho de revisão bibliográfica aqui presente é dirigido às espécies ovíparas, como é o caso da *Python regius*, espécie abordada no ensaio prático que será discutido no decurso do presente trabalho^{53, 54}.

O início da época reprodutiva é ditado por estímulos externos. Os fatores ambientais que têm mais influência na reprodução diferem entre espécies. O fator mais comum é a mudança de temperatura, ainda que a quantidade de horas de luz também pareça ser bastante importante,

especialmente em espécies de climas temperados. Por outro lado, em espécies de climas tropicais o início da estação das chuvas parece ser um estímulo fundamental. Na maioria das espécies o comportamento reprodutivo começa na primavera, embora existam algumas exceções (exemplo: *Boa constrictor* e *Python molurus*).

Além da época do ano adequada, outros fatores parecem ser limitantes para a atividade reprodutiva. A disponibilidade alimentar ou, mais importante em cobras, a quantidade de reservas de gordura acumuladas é frequentemente um fator decisivo. Este fenômeno assegura que a fêmea tenha reservas suficientes para levar a termo a época reprodutiva mesmo sem se alimentar até ao final da reprodução. Caso contrário, em muitas espécies a fêmea nem sequer inicia o crescimento folicular. Outro fator que pode ter influência em algumas espécies é a presença de macho ou até a cópula. Algumas espécies apenas iniciam o crescimento folicular pré-vitelogénico na presença de um macho. Ainda que esta fase seja precoce para a fecundação, evita a mobilização de energia para a vitelogénese sem que haja a possibilidade de fertilização^{54,55}.

A reprodução é um processo extremamente exigente em termos energéticos (mais de 40% da massa corporal da fêmea é utilizada na reprodução) e, não sendo indispensável à sobrevivência do indivíduo, se as condições não forem ideais a energia é utilizada para o próprio metabolismo em detrimento da vitelogénese e restantes processos reprodutivos⁵⁴.

Os estímulos ambientais controlam a reprodução por mediação da glândula pineal e sistema hipotálamo-hipófise que alteram as hormonas em circulação. A produção de melatonina pela glândula pineal é a principal responsável pela regulação do ciclo circadiano. A melatonina é segregada durante a noite. Assim, a quantidade de horas de luz dita a quantidade de melatonina produzida. No inverno, quando os dias são mais curtos a produção de melatonina é maior, enquanto no verão a produção diminui devido ao aumento de horas de luz. A diminuição da produção de melatonina estimula o hipotálamo a produzir GnRH (hormona libertadora de gonadotrofina) que estimula a hipófise a produzir LH (hormona luteínizante) e FSH (hormona foliculoestimulante). Estas hormonas vão induzir o início da atividade reprodutiva tanto em machos como em fêmeas. A intervenção destas hormonas no aparelho reprodutivo do macho e no ciclo ovárico da fêmea é discutida à frente⁵⁵.

3.2.1. Aparelho reprodutivo do macho

Os testículos estão localizados dorsomedialmente na cavidade celómica, entre o pâncreas e os rins, situando-se o testículo direito cranialmente ao esquerdo. O testículo direito está ao lado da veia cava caudal e é suprido por ela por meio de pequenas vénulas, enquanto a gónada

esquerda tem suprimento sanguíneo próprio e está intimamente relacionada com a glândula adrenal esquerda. As gónadas masculinas são ovóides e constituídas por um aglomerado de túbulos seminíferos, células intersticiais e vasos sanguíneos, instalados numa matriz de tecido conjuntivo. Os testículos, estimulados pela FSH e LH, produzem espermatozóides e segregam hormonas sexuais que influenciam o comportamento reprodutivo e os caracteres sexuais secundários (quando presentes). O tamanho dos testículos varia ao longo do ano, em função da atividade sexual.

Os machos possuem um segmento sexual na metade caudal do rim que também aumenta de tamanho durante a época reprodutiva e produz secreções que são transportadas até à cloaca onde se misturam com os espermatozóides, contribuindo para o fluido seminal. As cobras não possuem epidídimo^{53,54,56}.

O órgão copulatório das cobras é composto por dois hemipénis localizados na base da cauda. Os hemipénis originam-se lateralmente à cloaca e permanecem invertidos caudalmente à mesma por ação do músculo retrator dos hemipénis. São órgãos em forma de saco cego, nas suas paredes proliferam vasos sanguíneos e linfáticos, e apresentam um sulco seminal. Os ureteres não têm relação com os hemipénis, desembocando diretamente na cloaca. Dorsalmente aos hemipénis localizam-se as glândulas anais bastante desenvolvidas. O músculo retrator estende-se desde as vértebras caudais até à extremidade e laterais de cada hemipénis. Os órgãos copulatórios, músculo retrator e glândulas anais são envolvidos pelo músculo propulsor maior. No momento da cópula, o hemipénis fica engurgitado e o músculo propulsor maior contrai, provocando a eversão e exteriorização do hemipénis. Após a cópula o músculo retrator contrai, de forma a retrain e inverter o hemipénis novamente^{53,54}.

3.2.2. Aparelho reprodutivo da fêmea

Nas fêmeas os ovários têm uma localização equivalente à dos testículos nos machos, sendo o suprimento sanguíneo providenciado ao ovário direito e esquerdo semelhante àquele que é observado para as gónadas masculinas. O ovário direito, além de mais cranial, também é mais desenvolvido. Em algumas espécies o ovário esquerdo pode ser rudimentar ou não se desenvolver de todo, nesse caso também só existe um oviduto.

Os ovários apresentam a forma de um saco com a superfície coberta por folículos e são constituídos por células epiteliais, tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e células germinativas embutidas numa túnica elástica. A aparência varia de acordo com a fase da oogénese: o ovário inativo tem um aspeto pequeno e granular, enquanto o ovário ativo tem aspeto de um grande saco lobular preenchido por folículos vitelogénicos de forma esférica. As gónadas femininas produzem gametas femininos e estrogénio.

Os ovidutos são compostos de infundíbulo, trompa uterina, istmo, útero e vagina, não existindo útero verdadeiro. Os ovidutos desembocam diretamente na cloaca através da papila genital. A função do oviduto é transportar os folículos e segregar albumina, outras proteínas e cálcio durante a formação do ovo^{53,54}.

Ciclo ovárico

A atividade ovárica é composta de diferentes fases. Enquanto não existem estímulos externos que desencadeiem a atividade reprodutiva, não há desenvolvimento do ovário nem do oviduto e a este período de inatividade ovárica dá-se a denominação de fase quiescente.

Quando se inicia a época reprodutiva, o aumento da concentração de hormona folículo-estimulante (FSH) estimula o desenvolvimento e crescimento folicular. Esta fase denomina-se de pré-vitelogénica e aos folículos em crescimento ainda sem deposição do vitelo dá-se o nome de folículos pré-vitelogénicos.

Entretanto, a hormona luteinizante (LH) em circulação provoca um aumento da produção de estrogénios que, por sua vez, vão estimular a vitelogénese e, por *feedback* positivo, a produção de LH. Durante a fase vitelogénica ocorre a hipertrofia dos ovários e ovidutos. Sob a influência dos estrogénios, o fígado converte os lípidos armazenados nos corpos de gordura em vitelo, que é transportado pela corrente sanguínea até ao ovário maduro onde é absorvido pelos folículos. Os folículos maiores e mais maduros revestem-se de uma grande quantidade de vitelo, sendo o ovo maduro 10 a 100 vezes maior que o folículo pré-vitelogénico. Por efeito dos estrogénios é também estimulada a mobilização de cálcio dos ossos para a circulação sanguínea. O cálcio em circulação é incorporado no vitelo e utilizado na formação da casca do ovo. Os níveis plasmáticos de cálcio e de lípidos apresentam-se fisiologicamente aumentados durante a vitelogénese.

A concentração de LH, que entretanto aumentou até ao seu pico máximo, provoca a ovulação. Após a ovulação existe pouca transferência de nutrientes entre a mãe e os folículos. A gestação consiste no conjunto de processos que ocorrem desde a fecundação até à ovopostura. Ocorre então a deposição de albumina e a formação da casca, assim como uma fase inicial do desenvolvimento embrionário. O folículo pós-ovulatório passa a denominar-se ovo após a deposição de albumina e casca no oviduto. Entretanto, após a ovulação, ocorre a formação dos corpos lúteos, que mantêm a gestação e inibem a ovopostura, através da produção de progesterona.

Quando o corpo lúteo regride, a arginina vasotocina induz a contração da musculatura lisa do oviduto (regulada por prostaglandinas), provocando a ovopostura^{53,54,55}.

3.2.3. Comportamento reprodutivo e Maneio reprodutivo em cativeiro

A maturidade sexual está mais relacionada com o tamanho e peso corporal do que com a idade. Em cativeiro os cuidados de manejo e a dieta podem diferir bastante, tornando a idade de maturidade sexual bastante variável (de 1,5 a 10 anos). No entanto, a idade média de maturidade sexual em cobras é entre 2 e 3 anos. O tamanho ao atingir a maturidade sexual também depende da espécie em questão, pelo que não existe um comprimento ou um peso de referência que possa ser generalizado. De qualquer modo, tendencialmente as espécies maiores e com maior longevidade atingem a maturidade mais tarde^{53,54}.

O comportamento de acasalamento é iniciado pela corte. O macho movimenta-se sobre a fêmea e enrola a cauda em volta da cauda da fêmea. Se a fêmea estiver receptiva levanta a cauda e dilata a cloaca. Um dos hemipénis é evertido e inserido na cloaca da fêmea. A cópula pode durar de 2 a 20 horas. O órgão copulatório possui estrias e espículas que possibilitam a aderência à cloaca da fêmea por grandes períodos de tempo, sendo posteriormente removido por ação do músculo retrator do hemipénis. Durante múltiplos encontros o macho pode usar alternadamente o hemipénis esquerdo e direito⁵³.

Nos répteis a fecundação é sempre interna, no entanto, em muitas espécies de cobras a fêmea tem a capacidade de armazenar sémen no oviduto, onde fica armazenado até existirem condições ideais para a reprodução. A fecundação dar-se-á quando os folículos vitelogénicos descerem ao oviduto. O sémen pode ficar armazenado por meses ou anos, o que explica a ocorrência de posturas férteis na ausência de macho. Pode acontecer que uma fêmea acasale numa época reprodutiva e só se reproduza na época seguinte^{53,54,67}.

Em muitas espécies, as fêmeas fazem uma muda (ecdise) após a ovulação e antes da postura, o que possibilita a previsão da data da ovopostura. Algumas cobras produzem mais do que uma ninhada por ano, mas o mais comum é a existência de apenas uma postura por época reprodutiva.

O comportamento maternal quer em relação aos ovos quer em relação às crias é, em geral, bastante reduzido e não parece ser essencial para a sobrevivência da ninhada. Em muitas espécies as fêmeas enrolam-se ao redor dos ovos até à eclosão providenciando proteção contra predadores e regulação das condições de temperatura e humidade. O mais frequente é as fêmeas deixarem os ovos de dia enquanto as temperaturas são mais elevadas e regressarem à noite para providenciar isolamento térmico enrolando-se à volta dos ovos de forma à perda de calor ser menor. Algumas espécies como *Python molorus*, conseguem gerar um aumento da temperatura pela contração espasmódica dos músculos ao redor da ninhada de ovos. Este comportamento é uma particularidade de poucas espécies e é possível incubar

artificialmente com sucesso os ovos destas espécies. Em cativeiro, pode optar-se por deixar a fêmea incubar os ovos mas a prática mais comum é retirar os ovos à fêmea após a postura para uma incubação artificial, com condições de temperatura e humidade controladas^{53,54}.

Os ovos das cobras são revestidos por uma casca impermeável à água, mas não ao ar, e possuem três membranas internas. A membrana amniótica é a mais interna, envolvendo o embrião. A mais externa, que reveste o interior do ovo junto à casca, é a membrana coriônica. Entre estas duas situa-se a membrana alantóide, para onde são excretados os dejetos ao longo do desenvolvimento embrionário. A casca do ovo tem função de proteção e serve como fonte de cálcio para o embrião. Os ovos das cobras têm a casca mole. Quando estão prontas para eclodir as crias usam um dente modificado (dente do ovo) para abrir caminho através da casca^{53,54}.

Em cobras, ao contrário de alguns outros répteis, existe determinação genotípica do sexo do embrião, isto é, o sexo é determinado pela informação genética primariamente contida nos cromossomas sexuais. A alternativa a esta realidade é a determinação do sexo dependente da temperatura de incubação dos ovos, como acontece em muitas espécies de tartarugas ou em geckos-leopardo. Por outro lado, e contrariamente ao que acontece nos mamíferos em que as fêmeas possuem um par de cromossomas sexuais XX e os machos têm XY, nas cobras o sexo heterogamético (ZW) são as fêmeas enquanto os machos são homogaméticos (ZZ)⁵⁴.

3.2.4. *Python regius*

A *Python regius*, também conhecida por píton-real ou píton-bola, é uma cobra da família *Pythonidae*, não venenosa e constritora (ver figura 22). Atingem geralmente os 100 a 140cm, embora possam raramente atingir os 150 a 180cm. As fêmeas tendem a atingir a maturidade sexual entre os 120 a 140cm, enquanto os machos são mais pequenos e atingem a maturidade aos 90 a 110cm. Esta espécie é originária de África, da zona do equador ou muito perto, sendo portanto considerada de clima tropical. Pode ser encontrada em países como o Senegal, Mali, Guiné-Bissau, Guiné, Serra Leoa, Libéria, Costa do Marfim, Gana, Benim, Nigéria, Camarões, Chade, Sudão, Uganda e a República Centro-Africana. As temperaturas ideais para a píton-real são de 30 a 32°C na zona quente e entre os 25 e os 27°C na zona fria. A humidade relativa deve ser superior a 50%, sendo que a humidade ótima é entre 55 e 60%⁵⁷.



Figura 22 – *Python regius*, *morph*: normal.

Ainda que atualmente se produzam em cativeiro uma grande variedade de espécies de répteis, a realidade é que os protocolos mais atuais de reprodução das diferentes espécies permanecem relativamente confidenciais. Diversos dados biológicos são conhecidos e estão publicados, quer pela área da biologia, quer da medicina veterinária. No entanto, os criadores de répteis frequentemente começam as suas criações como *hobby* e os protocolos utilizados resultam de conhecimento empírico e de troca de informações numa comunidade que é relativamente fechada.

Diversos criadores de *Python regius* são conhecidos no mundo da herpetologia e dos amantes desta espécie em particular. Contudo, não existem informações oficiais disponíveis sobre o número ou identidade desses criadores. Foi realizado um contacto com o ICNF no sentido de conhecer o número de criadores registados em Portugal; no entanto não foi obtida resposta até à data de conclusão do presente trabalho. O site “*world of ball pythons*”, dedicado especialmente às diferentes *morphs* (apresentações fenotípicas; mutações) de *P. regius*, está entre as plataformas digitais com mais informação sobre a espécie e com maior popularidade a nível mundial. Ainda que claramente incompleto, pois estes números correspondem apenas aos criadores inscritos no site, apresenta-se um total mundial de 1305 criadores de *Python regius*, sendo que os Estados Unidos da América contam com 595 criadores, a Alemanha com 136, a Inglaterra com 113, França com 41, Holanda com 36 e a Itália com 29. Estes números são meramente indicativos e não refletem a realidade. Por exemplo, em Portugal só está registado no site um criador, no entanto são conhecidos vários no país⁵⁷.

Para reprodução de *P. regius* em cativeiro devem ser respeitadas algumas condições de manejo reprodutivo adequadas à espécie, ainda que os protocolos possam variar.

Sendo os estímulos ambientais fatores importantes na regulação da reprodução, faz sentido que para tentar reproduzir animais em cativeiro se procure mimetizar essas condições. Uma sugestão de manejo reprodutivo para a *Python regius* é baixar gradualmente a temperatura ambiente em dezembro para uma temperatura diurna máxima de 28°C e noturna mínima de 24°C, com uma zona quente a temperatura constante entre os 29 e 32°C e fazer uma transição gradual de 15 horas de luz no verão para 9 horas de luz no inverno⁵⁸.

A esta diminuição da temperatura dá-se a denominação de arrefecimento sazonal. Ainda que para algumas espécies de cobras de climas temperados a mudança de temperatura e, inclusivamente a brumação, pareçam ser um estímulo essencial para que a reprodução ocorra, o mesmo não acontece com *Python regius*.

Embora a alteração da temperatura noturna possa ter alguma influência, é de notar que *P. regius* é originária de zonas tropicais na região do equador, onde as variações de temperatura são suaves e o número de horas de luz praticamente não varia ao longo do ano. É com base nesta justificação que alguns criadores defendem a manutenção da temperatura constante ao longo de todo o ano e não fazem ciclos de luz. Ambos os protocolos parecem ser efetivos na reprodução da espécie^{59,60}.

É de referir que a diminuição da temperatura e do número de horas de luz estimulam uma redução no metabolismo que vai também diminuir a ação do sistema imunitário e digestivo. Por este facto é frequente animais, com patologia subclínica não diagnosticada, apresentarem-se clinicamente doentes após o arrefecimento sazonal. Assim, geralmente não se aconselha o arrefecimento sazonal em cativeiro e quando se recorre à sua utilização para fins reprodutivos deve assegurar-se antecipadamente que os animais se encontram em perfeitas condições de saúde.

Sugere-se o fornecimento de maior quantidade de alimento (com maior frequência e/ou alimento mais pesado) no final da primavera, verão e outono e baixá-lo gradualmente em simultâneo com a diminuição das horas de luz⁵⁸. Contudo, diversos criadores parecem manter a quantidade e frequência de alimentação enquanto os animais aceitarem o alimento. Se um método pretende mimetizar um estímulo ambiental, o outro parece privilegiar a manutenção do aporte energético. À reprodução está associado um enorme consumo das reservas energéticas, pelo que o fornecimento de alimento durante o período reprodutivo ajuda a reduzir a perda de condição corporal da fêmea. Por outro lado, é de notar que a sobrealimentação e obesidade também têm efeitos negativos na reprodução e na saúde geral do animal, pelo que devem ser evitadas^{59,60}.

Com o objetivo de proporcionar a ocorrência de cópulas naturais devem juntar-se os casais ou grupos de reprodução desde o final de dezembro até março. Estão descritos pelo menos dois métodos diferentes. Pode introduzir-se um macho com cinco fêmeas e deixar o grupo junto

continuamente durante todo o período de acasalamento ou pode introduzir-se um macho para uma fêmea semanalmente, deixando sempre três dias de intervalo entre acasalamentos, também durante todo o período⁵⁸.

A ovulação ocorre, geralmente, de meio de março a abril, frequentemente 6 a 30 dias depois da última cópula, e pode durar cerca de 24 horas. A muda pós-ovulatória ocorre, em média, 20 dias depois da ovulação e auxilia na previsão da ovopostura que ocorre geralmente 24 a 34 dias após a muda pós-ovulatória (média 28 dias). A postura frequentemente ocorre à noite e dura cerca de 24 horas.

As fêmeas põem em média 6,5 (1 a 11) ovos por ninhada e enrolam-se à volta dos ovos para os incubar. Os ovos podem ser incubados artificialmente em vermiculite entre 30 a 32,8°C e a eclosão ocorre em 53 a 60 dias (média 57). É expectável um ganho de peso dos ovos de 10 a 40%⁵⁸.

3.3. Avaliação Reprodutiva

Para que os animais se reproduzam, quer por cópula natural, quer por inseminação artificial, é fundamental que se encontrem em boas condições de saúde. Nesse sentido, é essencial examinar os animais no início da época reprodutiva de forma a avaliar a sua aptidão para a reprodução.

Na avaliação reprodutiva a anamnese não perde a sua importância e deve procurar conhecer-se as condições ambientais a que os animais estão sujeitos, o alojamento em que se encontram e o tipo e a frequência da alimentação. Mas de uma forma geral, quando trabalhamos em coleções de criadores experientes estas condições são bastante controladas, ganhando mais importância no trabalho com principiantes ou proprietários de animais de companhia que pretendem reproduzir os seus animais.

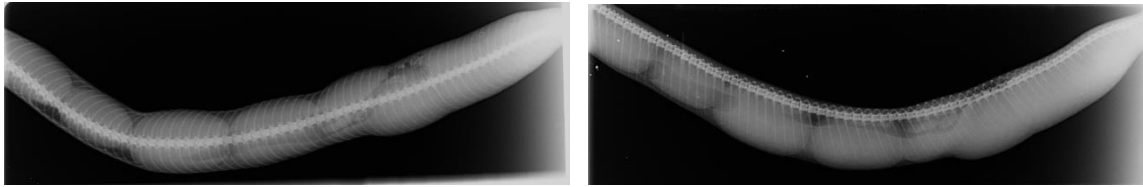
O exame físico deve ser completo e metódico (por exemplo, de cranial para caudal), avaliando todos os sistemas e órgãos, com especial atenção aos olhos, narinas, palpação abdominal, avaliação da condição corporal, determinação sexual e exame da cloaca. Ainda que a visão não seja o sentido mais apurado em cobras, em algumas espécies podem existir pistas visuais para iniciar o comportamento de corte ou a cópula, pelo que o exame oftálmico pode ser relevante. A avaliação das narinas é extremamente importante, não só por que narinas obstruídas podem prejudicar o olfato, bastante importante para o comportamento sexual, mas também porque as secreções nasais podem indicar afeções mais severas como doença respiratória ou estomatite. A avaliação da cavidade celômica é essencial; por palpação abdominal é possível investigar a condição dos corpos de gordura, reserva energética essencial à reprodução, eventuais folículos em desenvolvimento e presença de material

reprodutivo remanescente (ovos retidos), de fezes ou uratos (possíveis impactações). O exame da massa muscular e o peso permitem avaliar a condição corporal das cobras. Animais com baixa condição corporal são maus candidatos a reprodutores⁵⁸.

A determinação ou confirmação do sexo dos animais e a sua correta identificação são determinantes no sentido de não serem cometidos erros na formação de casais ou grupos de reprodução. A sexagem de cobras pode fazer-se utilizando vários métodos, sendo os mais comuns os caracteres sexuais secundários, sondagem e exteriorização dos hemipénis. O dimorfismo sexual é geralmente subtil em cobras, no entanto pode avaliar-se o tamanho total do animal, a distância da cloaca à base da cauda, o número de escamas ventrais totais e o número de escamas subcaudais, assim como a presença e tamanho dos esporões pélvicos em boídeos e pitonídeos. A sondagem consiste na introdução de uma sonda na cloaca em direcção caudal de forma a testar a presença de hemipénis através do comprimento da porção da sonda introduzida. Nos machos a sonda entra no lúmen dos hemipénis evertidos possibilitando maior penetração da sonda do que nas fêmeas. A exteriorização dos hemipénis confirma que estamos na presença de um macho, no entanto este método pode não ser viável em animais adultos e/ou muito grandes e musculados^{53,54,58}.

A avaliação da cloaca é bastante importante, uma vez que é a região corporal diretamente envolvida na cópula e na inseminação artificial. Devem ser descartadas a inflamação da cloaca, a impactação das glândulas anais, a impactação fecal ou por uratos e quaisquer outras afecções da cloaca que possam impedir ou diminuir o sucesso da reprodução⁵⁸.

Exames complementares podem trazer informação importante, pelo que se pode colher sangue para hematologia, bioquímica sanguínea e, eventualmente, microbiologia e analisar amostras fecais para pesquisa de parasitas intestinais. A radiografia pode ser útil para avaliar a presença e dimensão dos corpos de gordura celómicos em machos e fêmeas e pode, eventualmente, revelar material reprodutivo remanescente (ver Figura 23). No entanto os ovos das cobras não são demasiado mineralizados, pelo que a ecografia se mostra mais eficaz nesta avaliação. A ecografia tem especial interesse na avaliação reprodutiva das fêmeas (ver 3.3.1.), para deteção de material reprodutivo remanescente e no controlo folicular. Pode ser utilizada para a avaliação dos corpos de gordura em fêmeas e machos. Outro método complementar que pode ser utilizado é a endoscopia cloacal, para uma avaliação mais cuidada da cloaca, urodeu e papilas genitais. Este método possibilita ainda a colheita de amostras para cultura e TSA, citologia ou biopsia⁵⁸.



A

B

Figura 23 – Imagem radiográfica de cobra com retenção de ovos. A- projeção dorso-ventral; B – projeção latero-lateral esquerda.

3.3.1. Fêmea

Na avaliação reprodutiva da fêmea, além da anamnese e exame físico geral referidos no capítulo anterior, o controle folicular ecográfico pode ser uma grande mais-valia.

A ecografia é um método não invasivo de grande valor na examinação do trato genital das fêmeas. Os ovários encontram-se entre os órgãos mais bem visualizáveis por ecografia, sendo possível identificar o ovário, mesmo se inativo. Além de estar indicada para determinação do sexo do animal (sexagem) e da maturidade sexual, a ecografia do trato reprodutivo providencia informação relevante sobre a fase do ciclo ovárico dos animais.

Para realizar ecografia em cobras pequenas, geralmente uma sonda linear de 7,5 ou 10 MHz é adequada. Em animais muito pequenos, a colocação do animal dentro de água pode facilitar a obtenção de imagens de qualidade. A contenção de cobras é geralmente simples e não é necessário o recurso a sedação (excepto em animais muito ativos ou agressivos). Pode recorrer-se ao decúbito dorsal, contudo o posicionamento em decúbito esternal torna a contenção mais fácil, por ser mais confortável para o animal, e mantém os órgãos na sua posição fisiológica^{61,62}.

Para identificação do ovário, a vesícula biliar pode ser utilizada como marcador. Quando a sonda é colocada a cerca de três quintos do corpo da cobra (direção crânio-caudal), observa-se uma grande esfera anecogénica (vesícula biliar) e o ovário direito encontra-se logo distalmente à vesícula biliar e o esquerdo distalmente ao direito (ver Figura 24).



Figura 24 – Posicionamento em decúbito esternal, colocação da sonda a cerca de três quintos do corpo da cobra.

Animais com crescimento folicular são geralmente identificados rapidamente e podem ser classificados como pré-vitelogénicos ou vitelogénicos, avaliando o tamanho e a ecogenicidade dos folículos ovários. Os folículos pré-vitelogénicos são redondos e anecogénicos ou hipocogénicos, são pequenos (com 6 a 20mm) e geralmente apresentam-se agrupados em forma de cacho. Os folículos vitelogénicos pré-ovulatórios também são redondos e agrupados em cacho, mas o diâmetro é maior e são mais ecogénicos. Os folículos pós-ovulatórios são mais alongados e apresentam-se geralmente em linha, ocupando toda a metade caudal do corpo da cobra. Estes folículos apresentam o centro hipocogénico (vitelo) e a camada exterior hiperecogénica. Com experiência é possível detetar a formação da casca. Os ovos com casca formada ou em formação são visualizáveis através de ecografia, pois nestes animais a casca é pouco calcificada e contém muita água, pelo que a reflexão acústica não é total.

A ecografia do trato genital feminino está ainda indicada quando existe suspeita de quistos ovários ou alterações da formação dos ovos ou postura (estase folicular e retenção de ovos), ou de infeção ou tumor^{54,61,62}.

3.3.2. Macho

Na avaliação reprodutiva do macho, além do referido em 3.3., a avaliação dos hemipénis, quando possível, é importante. Por vezes a acumulação de secreções, esperma e mudas de pele pode originar a formação de rolhões nos hemipénis. Estes rolhões podem secar e ficar

retidos, inibindo a reprodução. A inspeção e limpeza dos hemipénis com remoção destes rolhões devem ser realizadas no início e durante a época reprodutiva⁵⁸.

Outros parâmetros da avaliação reprodutiva específicos do macho incluem a avaliação do sémen. Contrariamente ao que acontece com as fêmeas, os métodos de avaliação reprodutiva específicos do sexo masculino, nomeadamente com recurso à colheita de sémen, não são rotineiramente utilizados. Contudo, a colheita de sémen é um procedimento essencial, quer à inseminação artificial, quer à avaliação do sémen.

Diferentes métodos já foram descritos para colheita de sémen em cobras. O mais simples consiste apenas na massagem do terço caudal do corpo do animal, no entanto este método está associado a bastante contaminação do sémen com fezes e uratos. Outro método, utilizado primeiramente por Mengden *et al.* (1980) mas que tem vindo a ser referido em várias publicações mais atuais, consiste na massagem digital da região ventral do terço caudal do animal e colheita do sémen diretamente da cloaca com o auxílio de uma seringa. Este método parece promover a obtenção de amostras menos contaminadas. De forma a diminuir ao máximo a contaminação, está descrita a compressão do abdómen em direção crânio-caudal com a intenção de eliminar fezes e uratos da cloaca e posterior lavagem com solução salina. Zacariotti (2007) propôs a utilização deste método mas recorrendo à anestesia local da região da cloaca. A anestesia local com lidocaína a 1% parece produzir o relaxamento da cloaca com exposição da papila genital facilitando a colheita e reduzindo a contaminação.

Por outro lado, e porque estão descritas alterações do ejaculado em animais anestesiados, Tourmente (2007) não concorda com a utilização de anestesia e propõe a colheita de sémen através da exteriorização dos hemipénis com o auxílio de uma sonda de plástico. Também Mattson *et al.* (2007) provocaram a ejaculação após eversão dos hemipénis recorrendo apenas a massagem digital, de forma semelhante à descrita primeiramente^{50,52,63,64}.

Foi ainda descrita a colheita de sémen em cobras recorrendo à eletroestimulação seguida de massagem digital da região ventral, mas a contaminação foi frequente e esta técnica não parece ter vantagens relativamente às anteriores. A colheita de sémen diretamente dos ductos deferentes de machos previamente eutanasiados também está descrita, no entanto este método não serve o propósito da maioria dos projetos que envolvem a colheita de sémen⁵⁰.

Poucos estudos foram feitos relativamente à avaliação do sémen de répteis e, em particular, de cobras. Assim, têm sido aplicados genericamente os mesmos princípios que se aplicam para outras espécies animais. Contudo, todos os parâmetros de avaliação do sémen que se descrevem em seguida foram já relatados em cobras. Diversos parâmetros podem ser avaliados numa amostra de sémen e muitos são utilizados rotineiramente em avaliações de outras espécies animais. Nenhum dos parâmetros avaliados no espermograma pode, por si só,

predizer a fertilidade de um macho, no entanto, em conjunto possibilitam fazer uma estimativa bastante precisa da qualidade do sêmen^{50,64}.

Para uma primeira avaliação macroscópica do sêmen, que deve ser feita imediatamente após a colheita, os parâmetros mais referidos na literatura são o volume e a cor. Os principais parâmetros microscópicos a ser avaliados são a concentração, a motilidade, o vigor ou motilidade progressiva e a morfologia espermática^{50,63,64}.

Geralmente, para a avaliação dos parâmetros microscópicos faz-se uma diluição prévia da amostra obtida. A diluição é particularmente necessária em cobras, por um lado porque o sêmen destes animais apresenta concentrações muito elevadas, por outro, devido ao diminuto volume das amostras obtidas, a diluição aumenta o volume da amostra possibilitando a realização de maior quantidade de exames e/ou inseminações, se for o caso. A melhor proporção de diluição dependerá da concentração da amostra colhida, que pode ser estimada através de uma avaliação rápida da concentração aparente. De qualquer forma, a diluição de 1:500 tem sido usada com sucesso por diversos autores. Diferentes diluidores podem ser utilizados para diluir sêmen de cobras com aparente sucesso. Está descrita a utilização de meios de cultura de células, como o M199 e o Ham's F10, ou soluções tampão, como PBS (tampão fosfato salino, do inglês *phosphate-buffered saline*) ou solução TL-Hepes (solução comercial contendo o tampão de origem sintética Hepes - ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico)⁵⁰.

A concentração espermática pode ser determinada através de contagem em câmara de Neubauer ou, se possível, por espetofotometria. Os restantes parâmetros microscópicos podem ser avaliados por observação através de microscopia ótica. A motilidade consiste na percentagem de espermatozoides com mobilidade, enquanto o vigor ou motilidade progressiva avalia a quantidade de espermatozoides com movimentos progressivos e geralmente é avaliada numa escala de 0 a 5 ou de 1 a 5, desde a ausência de movimento até à existência de movimentos progressivos muito rápidos. Através do recurso a gravação em vídeo das imagens obtidas no exame microscópico e posterior utilização de software específico de tratamento de imagem, está também descrita a avaliação de parâmetros como a velocidade linear, velocidade curvilínea, linearidade e padrão de movimento^{50,63,64}.

A morfologia espermática pode ser avaliada em esfregaço direto, mas frequentemente recorre-se a colorações (por exemplo, eosina-nigrosina). Com esta avaliação pretende-se detetar defeitos na morfologia dos espermatozoides, ao nível da cabeça, peça intermédia ou cauda. Para uma avaliação menos subjetiva deve ser quantificado o número de defeitos em cada um dos componentes e o número de defeitos total. Podem ainda, com recurso a fotomicrografia, ser determinadas as medidas das várias componentes do espermatozoide. Outras avaliações possíveis são a integridade acrossomal, com recurso à coloração simples de acrossoma, e a integridade da membrana celular, com recurso à coloração eosina-nigrosina (esta avaliação

permite a distinção entre espermatozoides vivos e mortos, podendo apresentar-se esse resultado em percentagem).^{50,63}

3.4. Inseminação Artificial – Procedimento

O estudo de técnicas de reprodução assistida, e em particular a inseminação artificial, ainda que reconhecido como importante e promissor no sentido de melhorar a reprodução de animais em cativeiro, raramente tem sido levado a cabo no que respeita aos répteis.

Algumas publicações referem inseminação artificial bem-sucedida em duas espécies da família Colubridae (*Pantherophis guttatus* e *Thamnophis marcianus*) e numa espécie da família Viperidae (*Crotalus durissus*). No entanto, o resultado da inseminação artificial foram ninhadas com menor número de crias do que as produzidas por cópula natural. Está descrita uma tentativa de inseminação artificial em *Python anchietae* em 1980 mas sem sucesso. Não se conhece nenhum outro ensaio de inseminação artificial na família *Pythonidae*^{50,52,65}.

A inseminação artificial é a técnica de reprodução assistida menos invasiva e pode contornar alguns problemas físicos e comportamentais que prejudiquem a reprodução em diferentes espécies. A técnica descrita na publicação mais atual conhecida, e que foi aplicada com sucesso em cobras-do-milho (*Pantherophis guttatus*), consistiu na inseminação de 100µL de sémen diluído (fresco ou refrigerado) divididos igualmente pelos dois ovidutos com o auxílio de uma sonda metálica de alimentação onde se acoplou uma seringa de 1mL. Imediatamente antes da inseminação, foi induzida a expulsão de fezes e uratos através de massagem idêntica à descrita para os procedimentos de colheita de sémen nos machos e lavada a região da cloaca com PBS. Para a inseminação a fêmea foi contida e posicionada com a cauda em arco, expondo a cloaca no topo do arco. A sonda utilizada deve ser adequada ao tamanho do animal. Neste caso a inseminação foi feita diretamente em cada oviduto, tendo sido utilizada uma sonda de alimentação metálica pequena (também denominada de agulha de alimentação) com a ponta em bola de forma a evitar a lesão dos tecidos. A sonda foi introduzida lenta e gentilmente na cloaca e movimentada em círculos promovendo o relaxamento muscular e posteriormente penetrou na entrada de cada oviduto (através da papila genital), dorsalmente na cloaca^{51,52}.

As cobras estudadas neste caso foram *Pantherophis guttatus*, uma espécie de climas temperados para a qual está indicada a hibernação, especialmente para fins reprodutivos. A inseminação artificial foi realizada uma semana após a hibernação.⁵² O momento mais adequado para a realização da inseminação em répteis não está ainda bem definido, pelo que tem sido utilizado como referência o período em que normalmente acontece a cópula na espécie a ser inseminada⁵⁰.

3.5. Ensaio prático

O ensaio prático aqui relatado teve como objetivo estudar a possibilidade e viabilidade da inseminação artificial em *Python regius*, não só experimentando a técnica propriamente dita, mas também avaliando alguns parâmetros da qualidade do sémen dos machos com diferentes meios de diluição, em vários momentos ao longo da época reprodutiva e em diferentes tempos após a colheita, e recorrendo a avaliação ecográfica do desenvolvimento folicular nas fêmeas com o intuito de estabelecer uma relação entre a fase do ciclo ovário e a data ideal de inseminação. O estudo foi levado a cabo utilizando três fêmeas e três machos da coleção particular do Dr. Carlos Henriques.

É importante referir que o estudo foi desenvolvido sem nenhum tipo de financiamento, pelo que o material e equipamentos utilizados foram gentilmente cedidos ou disponibilizados pela clínica Exoclinic e/ou pelo Dr. Carlos Henriques e pela Professora Doutora Joana Reis. Além disso, o estudo decorreu durante o período de estágio, dentro e fora dos horários do estágio e durante o período de trabalho do Dr. Carlos Henriques, pelo que as datas e horários dos vários procedimentos foram estipulados não só de acordo com o que se julgou mais proveitoso para o ensaio, mas também condicionados pela disponibilidade dos espaços e pessoas intervenientes. As ecografias para controlo folicular nas fêmeas foram realizadas com a gentil colaboração da Dra. Carolina Monteiro, médica veterinária dedicada à imagiologia e, em particular, ecografia, desde 2002 e colaboradora do Espaço Ecovet, que aceitou realizá-las também mediante a sua disponibilidade, dos equipamentos e dos espaços.

Os seis animais envolvidos no ensaio foram sujeitos às mesmas condições de manejo das restantes *Python regius* em reprodução, com a diferença que os machos foram manipulados para colheitas de sémen e as fêmeas foram deslocadas periodicamente para ecografia e sujeitas a inseminação artificial em vez da cópula natural. O alojamento consiste no sistema de gavetas (Figura 25), comumente utilizado por criadores.



Figura 25 – sistema de gavetas

A temperatura é normalmente mantida nos 31-32°C na zona quente, por meio de cabos de aquecimento controlados por termóstato e a humidade relativa ronda os 60%. O ciclo de horas de luz é conferido pelas horas de luz solar através de janela para o exterior, não sendo fornecido outro ponto de luz, à exceção da iluminação da sala, apenas quando necessária aos trabalhos lá realizados.

Os animais são alimentados com ratazanas vivas de tamanho adequado ao peso da cobra, a cada uma a duas semanas, durante a maior parte do ano, aumentando a frequência para uma vez por semana ao longo da época reprodutiva, sem aumentar a quantidade de alimento (peso da ratazana) por refeição.

No sentido de estimular o início da época reprodutiva, no início de novembro baixou-se a temperatura noturna para 28°C e posteriormente para 25°C, mantendo a temperatura máxima diurna nos 31°C.

3.5.1. Amostra e avaliação geral

Os animais envolvidos no ensaio foram três machos adultos (Figura 26) identificados como Banana (B), Lemonblast calico (L) e Yellowbelly (Y) e três fêmeas normais adultas (Figura 27) identificadas como F1, F2 e F3.



Figura 26 – Machos utilizados no ensaio. B – Banana; L – Lemonblast calico; Y - Yellowbelly



Figura 27 – Fêmea F2 (*morph*: normal) utilizada no ensaio.

No início do ensaio foi realizada uma avaliação geral a todos os animais, que incluiu exame físico, registrando o peso e a condição corporal, e colheita de sangue para hematócrito e algumas análises bioquímicas. Os resultados desta avaliação são apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Parâmetros gerais da avaliação reprodutiva – exame clínico (fêmeas e machos)

ID.	Sexo	Data	Exame físico	Peso (g)	C. Corporal
F1	Fêmea	11-02-2016	Normal	1946	4
F2	Fêmea	11-02-2016	Normal	1775	4
F3	Fêmea	11-02-2016	Normal	1967	4
B	Macho	26-02-2016	Normal	625	4
L	Macho	26-02-2016	Normal	946	4
Y	Macho	26-02-2016	Normal	1173	3

Tabela 5 – Parâmetros gerais da avaliação reprodutiva – hematócrito e bioquímicas sanguíneas (fêmeas e machos)

ID.	Sexo	Data	Hematócrito	Bioquímicas				
				Cálcio (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)	PT (g/dl)	Albumina (g/dL)	AST (U/L)
Valores de Referência*			22 (10-30)	15,3 (10,8-22,2)	3,8 (0,9-7,2)	6,7 (3,2-10,5)	2,5 (1-8,4)	55 (2-118)
F1	Fêmea	11-02-2016	24%	>16	3,3	7,5	2,1	-
F2	Fêmea	11-02-2016	21%	>16	3,2	7,3	2	-
F3	Fêmea	11-02-2016	25%	>16	4,5	8	2	-
B	Macho	26-02-2016	20%	-	5,4	5,5	1,6	78
L	Macho	26-02-2016	22%	-	4,1	6,9	2,1	24
Y	Macho	26-02-2016	31%	-	3,6	7,7	2,5	35

*Valores de referência para *P. regius*, segundo Carpenter (2013)⁶⁶

Todos os animais apresentavam um exame físico normal, sem nenhum achado sugestivo de doença, e em geral uma boa condição corporal. Todas as fêmeas e dois dos machos apresentavam uma condição corporal de 4 (escala de 1 a 5) e apenas um dos machos foi avaliado com uma condição corporal de 3 (de 1 a 5). Todos os hematócritos se encontravam dentro dos valores considerados normais para a espécie. Os valores de cálcio obtidos nas fêmeas estavam no limite superior de leitura da máquina, podendo indicar que estavam dentro da normalidade ou aumentados. De qualquer forma, é fisiológica a subida dos níveis plasmáticos de cálcio durante a vitelogênese. Os valores de fósforo, proteínas totais, albumina e AST de todos os indivíduos avaliados apresentavam-se dentro dos valores de referência para *P. regius*. Os valores representados na tabela com “-” não foram avaliados por questões de disponibilidade de material.

O peso dos animais foi registrado no início e no final da época reprodutiva a fim de se avaliar a diferença. A redução de peso verificada encontra-se dentro da normalidade, considerando o desgaste energético associado à reprodução. Os dados encontram-se expressos na tabela 6.

Tabela 6 - Peso dos animais no início e no fim da época reprodutiva.

ID.	Sexo	Data	Peso (g)	Data	Peso (g)
F1	Fêmea	11-02-2016	1946	26-04-2016	1698
F2	Fêmea	11-02-2016	1775	26-04-2016	1685
F3	Fêmea	11-02-2016	1967	26-04-2016	1682
B	Macho	26-02-2016	625	26-04-2016	536
L	Macho	26-02-2016	946	26-04-2016	867
Y	Macho	26-02-2016	1173	26-04-2016	1025

3.5.2. Colheita e avaliação de sémen (Machos)

Foram realizadas colheitas de sémen em diferentes datas para inseminação artificial e para avaliação de alguns parâmetros do sémen. As primeiras três colheitas de sémen (dias 15-12-2015 e 26-01-2016) foram realizadas por massagem digital da região ventral do terço caudal do animal, colhendo o sémen diretamente da cloaca com o auxílio de uma seringa de 1mL. As

amostras obtidas apresentavam espermatozoides, porém o volume obtido foi extremamente limitado e apresentava reduzida concentração aparente e bastante contaminação. As colheitas realizadas posteriormente foram conseguidas por massagem ventral digital na região cranial e caudal à cloaca, provocando eversão dos hemipénis. O sémen foi colhido diretamente dos hemipénis com o auxílio de uma micropipeta automática e o volume obtido foi maior.

Nas primeiras colheitas realizadas (a 15-12-2015) o objetivo, além da inseminação que também foi realizada nessa data, foi averiguar a viabilidade de soluções salinas como diluidores de sémen. Para o efeito foram feitas colheitas de sémen em dois machos (B e L) e as amostras foram diluídas em NaCl a 0.9% (macho B) e em NaCl a 0,45% (macho L). Avaliou-se através de microscopia ótica a motilidade do sémen mantido em lâmina de microscópio no momento da colheita (t0) e 30 minutos após a colheita (t30). O sémen diluído com NaCl 0,9% apresentava uma motilidade de 10% imediatamente após colheita, enquanto o sémen diluído com NaCl a 0,45% apresentava, para o mesmo momento de avaliação, uma motilidade de 90%, que rapidamente decresceu para 10% nos 30 minutos após a colheita. É importante referir que estas avaliações, em t0 e t30, foram realizadas com a mesma gota de sémen mantida em lâmina de microscópio, pelo que a rápida diminuição da motilidade terá a ver, entre outros fatores, com a dessecação da amostra.

A 26-02-2016 foi realizada nova colheita de sémen, neste caso apenas do macho L, com o objetivo de testar a viabilidade da utilização de meio de cultura celular (Alpha MEM sem L-Glutamina, BioWhittaker®) como diluidor de sémen, além de também ter servido para inseminação artificial. Os métodos utilizados foram semelhantes aos utilizados para tratamento das duas amostras anteriores, tendo a amostra sido mantida em lâmina de microscópio no decurso das várias avaliações da motilidade ao longo de 105 minutos (de t0 a t105). A amostra diluída em meio de cultura celular apresentou uma motilidade de 90% no momento da colheita, que se manteve constante nos primeiros 15 minutos e que foi decrescendo a longo dos 90 minutos que se seguiram. A informação relativa à avaliação do sémen obtido nas três primeiras colheitas realizadas é apresentada na tabela 7.

Tabela 7 - Motilidade do sémen ao longo do tempo com diferentes diluidores

Diluidor	Data	Macho	Motilidade							
			t0	t15	t30	t45	t60	t75	t90	t105
NaCl 0,9%	15-12-2015	Banana	10%	-	0%	-	-	-	-	-
NaCl 0,45%	15-12-2015	Lemonblast calico	90%	-	10%	-	-	-	-	-
Meio cultura	26-01-2016	Lemonblast calico	90%	90%	70%	50%	35%	20%	1%	0%

Após estes ensaios, foi realizada uma série de mais cinco colheitas em cada um dos três machos. Nestas colheitas foi utilizada a técnica que envolve a exteriorização dos hemipénis e os volumes obtidos foram maiores. Para colheita do sémen e medição dos respetivos volumes utilizou-se uma micropipeta automática de pontas descartáveis com volume de 10 a 100µL.

Obtiveram-se volumes entre 1 e 5µL que foram colocados em *ependorfs* onde foram adicionados 500µL de diferentes soluções de diluição, resultando em diluições que variaram entre 1:500 e 1:100. Para cada um dos três machos fez-se uma colheita usando como diluidor meio de cultura de células Alpha MEM sem L-Glutamina, BioWhittaker® (MCC), uma usando PBS (pH7,2), uma usando NaCl 0,45% e duas usando meio de cultura de células enriquecido com glutamina, de acordo com o que se pode observar na tabela 8. Para cada um dos momentos de colheita, o sémen foi guardado em *ependorfs* que foram deixados à temperatura ambiente (que variou de acordo com as datas de realização das colheitas e cujos valores mínimo e máximo registados são apresentados na tabela 8) e avaliado em diferentes períodos de tempo após colheita.

Tabela 8 - Esquema de colheitas efetuadas para avaliação da motilidade do sémen ao longo do tempo após colheita (indicando data da colheita, diluidor e temperaturas de armazenamento das amostras)

Macho	Data	Diluição	Diluidor	Temperaturas
Banana Lemonblast calico Yellowbelly	17-02-2016	1-5µL em 500	M. Cultura Celular	16,1 - 17,3
Banana Lemonblast calico Yellowbelly	26-02-2016	1-5µL em 500	PBS	16,3 - 17,7
Banana Lemonblast calico Yellowbelly	19-04-2016	1-5µL em 500	NaCl 0,45%	18,5 - 19,4
Banana Lemonblast calico Yellowbelly	26-04-2016	1-5µL em 500	MCC + glutamina	18,3 - 20,8
Banana Lemonblast calico Yellowbelly	03-05-2016	1-5µL em 500	MCC + glutamina	20,0 - 24,9

Para cada uma das datas de colheita as amostras foram avaliadas periodicamente entre os 30 minutos e as 30 horas após colheitas, de forma a avaliar a motilidade do sémen, isto é a percentagem de espermatozóides móveis. Os horários das colheitas e das avaliações foram escolhidos em função da disponibilidade das pessoas intervenientes, do material e dos espaços, pelo que não foi possível respeitar o mesmo padrão de intervalos de tempo entre uns grupos de colheitas e os outros. De qualquer modo, foram sempre feitas avaliações até que a motilidade de todas as amostras fosse 0% ou até que todo o volume da amostra fosse gasto impedindo a realização de novas avaliações.

Para cada momento de avaliação foi retirada uma gota (5µL) da amostra reservada no *ependorf* à temperatura ambiente e colocada numa lâmina de microscópio, onde foi observada a fresco com uma ampliação de 400X. A figura 28 mostra o aspeto das amostras de sémen observadas com a objetiva de 10X, 40X e de 100X.

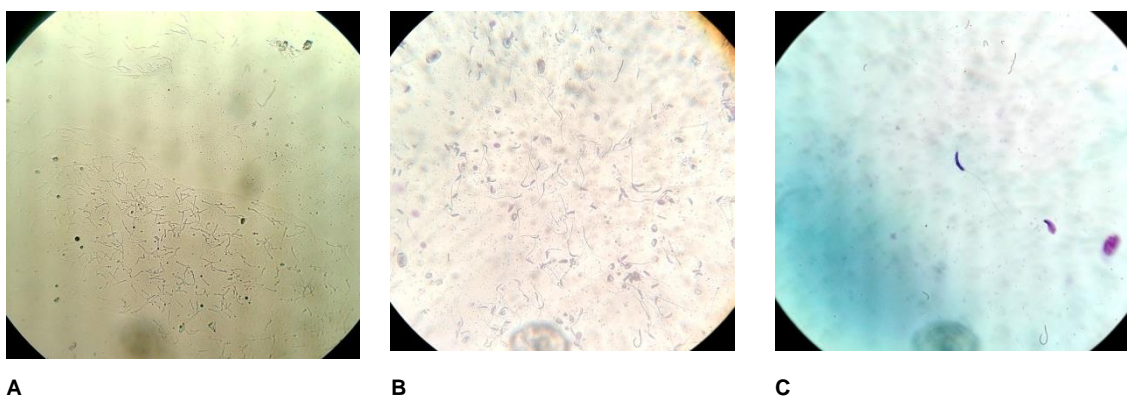


Figura 28 – Aparência das amostras de sêmen ao microscópio ótico. A – amostra fresca, ampliação 100X; B – amostra corada com Diff-Quick®, ampliação 400X; C – amostra corada com Diff-Quick®, ampliação 1000X.

Os resultados das avaliações da motilidade a diferentes tempos após colheita para as várias datas de colheita apresentam-se na coluna “Registos” da tabela 9. De forma a facilitar a compreensão dos dados, os valores superiores a 50% são apresentados a verde, os valores iguais ou inferiores a 50% e maiores que 0% são apresentados a laranja e as avaliações de 0% são apresentadas a vermelho.

Tabela 9 - Avaliação da motilidade ao longo do tempo após colheita, para as diferentes datas de colheita.

Macho	Data	Diluidor	Registos						
Banana	17-02-2016	M. Cultura Celular	t12h = 80%	t18h = 0%					
Lemonblast calico			t12h = 85%	t18h = 50%	t26h = 0%				
Yellowbelly			t12h = 95%	t18h = 90%	t26h = 65%*				
Banana	26-02-2016	PBS pH7,2	t2h = 90	t6h = 75%	t12h = 10%	t24h = 2%	t30h = 1%		
Lemonblast calico			t2h = 75%	t6h = 60%	t12h = 0%				
Yellowbelly			t2h = 50%	t6h = 35%	t12h = 5%	t24h = 5%	t30h = 3%		
Banana	19-04-2016	NaCl 0,45%	t1h = 70%	t3h = 70%	t5h = 80%	t20h = 0%			
Lemonblast calico			t1h = 50%	t3h = 40%	t5h = 50%	t20h = 50%	t22h = 50%	t24h = 0%	
Yellowbelly			t1h = 80%	t3h = 70%	t5h = 70%	t20h = 5%	t22h = 0%		
Banana	26-04-2016	MCC + glutamina	t1h = 10%	t4h = 5%	t19h = 0%				
Lemonblast calico			t1h = 100%	t4h = 100%**	t19h = 0%				
Yellowbelly			t1h = 90%	t4h = 65%	t19h = 1%	t24h = 0%			
Banana	03-05-2016	MCC + glutamina	t0,5h = 95%	t1h = 95%	t4h = 65%	t19h = 0%			
Lemonblast calico			t0,5h = 50%	t1h = 50%	t4h = 45%	t19h = 0%			
Yellowbelly			t0,5h = 95%	t1h = 95%	t4h = 85%	t19h = 40%	t21h = 5%	t22h = 1%	t24h = 0%

*No dia 17-02-2016, além das avaliações do sêmen, foram feitas inseminações, pelo que só ficou disponível para avaliar o volume residual da amostra após a inseminação

**Amostra muito pouco concentrada, apenas se encontrava um espermatozóide.

Quase todas as amostras apresentavam algum grau de contaminação, ainda que residual, e em três delas o grau de contaminação foi considerado elevado. As amostras contaminadas parecem apresentar um padrão aleatório, pelo que não foi possível estabelecer relação da maior contaminação com nenhum dos três machos ou associá-la a algum dos diluidores. Provavelmente este fenómeno terá mais relação com a higiene da cloaca do animal no

momento da colheita e/ou com a própria técnica de colheita. Em várias amostras foi possível observar protozoários flagelados em maior ou menor número, indicando contaminação fecal.

Durante as avaliações foi possível constatar que o sémen que permanece na lâmina de microscópio começa por ter um aumento da motilidade e só depois, com a dessecação, a motilidade começa a decrescer. É possível que este aumento da motilidade se deva ao aumento de temperatura causado pela luz do microscópio ótico durante a observação.

Há que referir que existem vários fatores de enviesamento dos dados que devem ser tidos em consideração ao analisá-los. Por um lado, salientemos que as amostras foram sempre guardadas à temperatura ambiente, contudo essa temperatura não foi sempre a mesma, tendo vindo a aumentar gradualmente entre avaliações de acordo com a época do ano. Ainda que o fator temperatura não pareça ser decisivo para a conservação do sémen de répteis por estes animais serem ectotérmicos e o seu sémen ser viável a um intervalo de temperaturas consideravelmente maior que o dos mamíferos, poderá ter influência na motilidade. Por outro lado, uma questão que provavelmente terá mais influência é o facto de as amostras terem sido colhidas em datas bastante diferentes, o que também correspondeu a um período diferente da época reprodutiva. É sabido que o testículo e o segmento sexual do rim nos machos apresentam maior ou menor desenvolvimento em função da atividade reprodutiva e, portanto, em função da época do ano e que essa alteração poderá corresponder a um decréscimo na motilidade e na motilidade progressiva como acontece em *Bothrops insularis*⁶³.

Ainda assim, com base nos resultados obtidos podem constatar-se alguns factos interessantes. Foi possível obter, para todos os diluidores utilizados, motilidades iguais ou superiores a 80% em pelo menos uma avaliação. Para todos os meios de diluição testados verificou-se uma motilidade igual ou superior a 50% na primeira avaliação (com exceção da amostra colhida do macho Banana a 26-04-2016, cuja concentração em espermatozóides era muito baixa). Podemos afirmar que é possível conservar sémen à temperatura ambiente e obter valores de motilidade superiores a 50% em meio de cultura celular (Alpha MEM sem L-Glutamina, BioWhittaker®) por pelo menos 26 horas, em PBS pH7,2 por pelo menos 6 horas, em NaCl 0,45% por pelo menos 5 horas e em meio de cultura de células enriquecido com glutamina por pelo menos 4 horas. Podemos ainda constatar uma motilidade superior a 0% em meio de cultura de células por pelo menos 26 horas, em PBS pH7,2 por 30 horas, em NaCl 0,45% por 22 horas e em meio de cultura de células enriquecido com glutamina por 22 horas. Os gráficos (9 a 13) que se seguem mostram os resultados da evolução da motilidade ao longo do tempo para as cinco datas de avaliação.

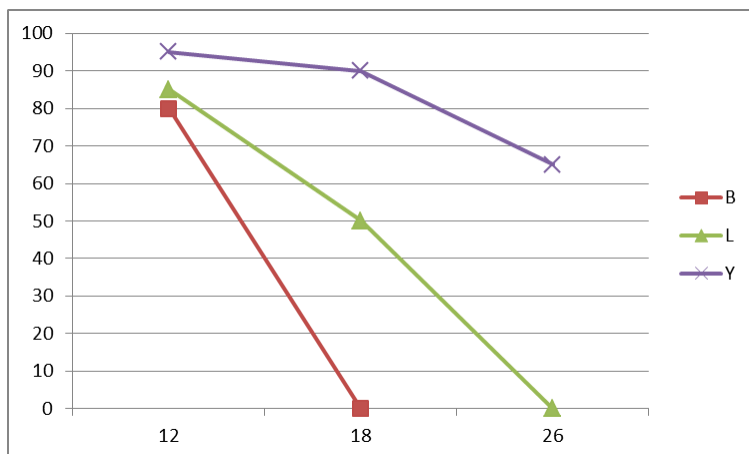


Gráfico 9 – Colheita 17-02-2016 (diluidor: meio de cultura de células Alpha MEM, BioWhittaker®) - Evolução da motilidade ao longo do tempo

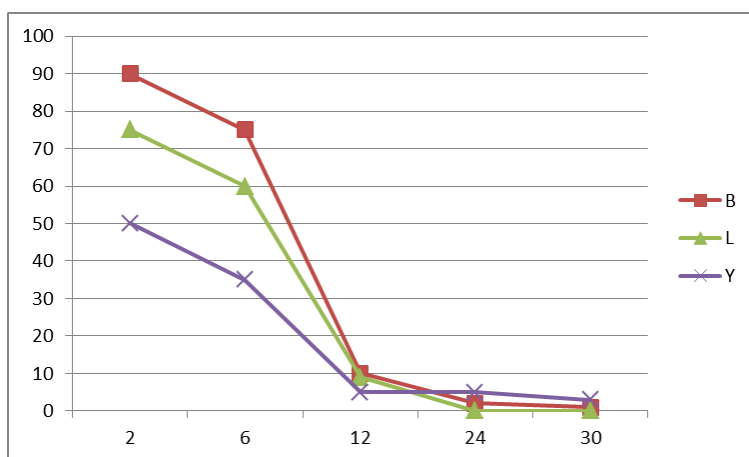


Gráfico 10 - Colheita 26-02-2016 (diluidor: PBS pH7,2) - Evolução da motilidade ao longo do tempo

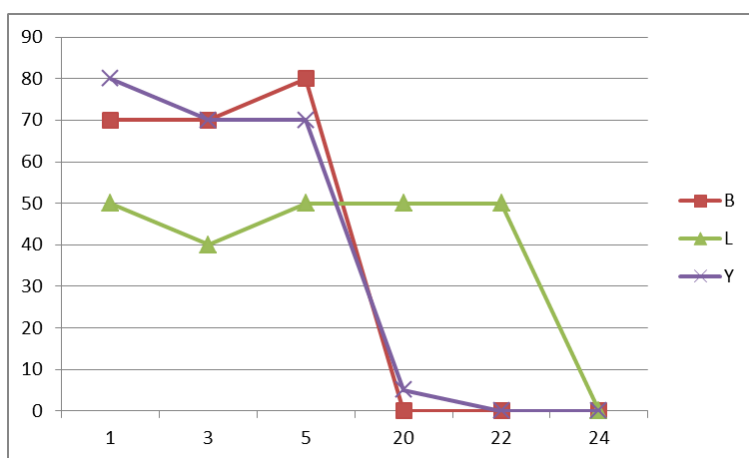


Gráfico 11 - Colheita 19-04-2016 (diluidor: NaCl 0,45%) - Evolução da motilidade ao longo do tempo

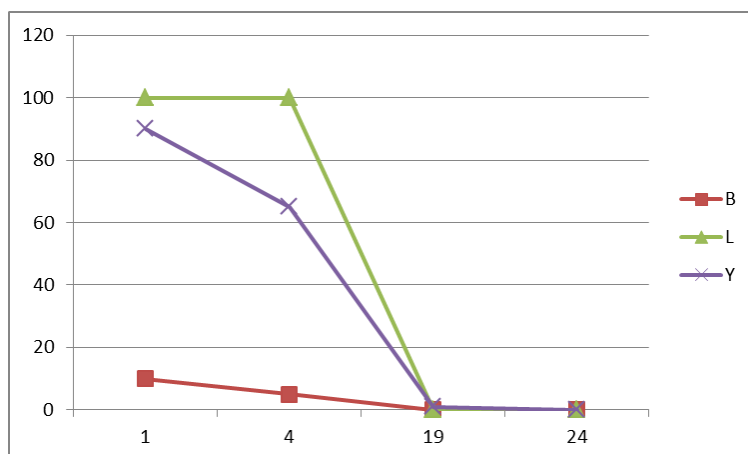


Gráfico 12 - Colheita 26-04-2016 (diluidor: meio de cultura de células Alpha MEM, BioWhittaker® enriquecido com glutamina) - Evolução da motilidade ao longo do tempo

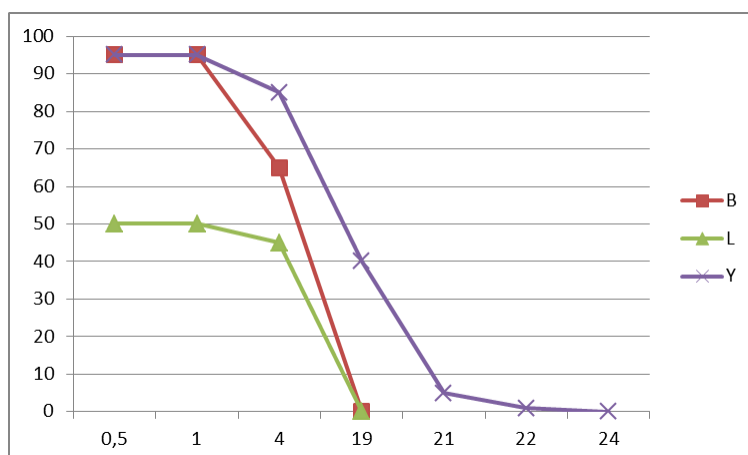


Gráfico 13 - Colheita 03-05-2016 (diluidor: meio de cultura de células Alpha MEM, BioWhittaker® enriquecido com glutamina) - Evolução da motilidade ao longo do tempo

Quanto ao papel destas avaliações no potencial reprodutivo dos machos, sabe-se que a motilidade do sémen por si só não permite avaliar a fertilidade de um macho. É possível verificar que na grande maioria das amostras obtidas a motilidade na primeira avaliação foi igual ou superior a 50% e todos os machos apresentaram pelo menos uma amostra com motilidade igual ou superior a 95%. Estes factos provam que todos os machos têm a capacidade de produzir espermatozóides vivos e móveis, o que certamente será um fator favorável para a viabilidade do seu sémen. Nenhum dos machos apresentou avaliações consistentemente superiores ou inferiores aos outros, pelo que os dados não permitem seleccionar nenhum dos machos como melhor ou pior reprodutor.

3.5.3. Controlo folicular ecográfico (Fêmeas)

As três fêmeas foram sujeitas a ecografia para controlo folicular em cinco datas diferentes ao longo da época reprodutiva. Em cada sessão foi registado o número de folículos que se conseguiam contar, o tamanho do maior folículo encontrado e o aspeto ecográfico dos folículos. Os dados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Registos do controlo folicular ecográfico.

Fêmea	Data	Nº folículos	Tamanho > folículo (mm)	Aspeto dos folículos
1	07-01-2016	10	9,6	folículos redondos e anecogénicos
2		5	11,2	
3		14	13,8	
1	22-01-2016	11	12,4	folículos redondos ligeiramente ecogénicos (mais marcado em F1)
2		12	13,6	
3		11	13,7	
1	17-02-2016	6(11)	15,3	folículos redondos com alguma ecogenicidade (mais marcado em F1)
2		5(10)	13,7	
3		5(9)	15,0	
1	18-03-2016	4(11)	14,5	folículos com interior hiperecogénico (aspeto alongado em F2)
2		5(12)	16,2	
3		8(13)	15,0	folículos com ecogenicidade variável e aspeto amorfo
1	22-04-2016	4(10)	10,4	folículos mais pequenos e alguma perda de ecogenicidade
2		5(9)	15,6	folículos hiperecogénicos
3		2	7,8	folículos mais pequenos e com perda de ecogenicidade

Nota: Na coluna “Nº de folículos” para as últimas três avaliações apresenta-se o número de folículos mais desenvolvidos e entre parêntesis o número total.

Na primeira avaliação, realizada a 7 de janeiro de 2016, as três fêmeas apresentavam um número variável de folículos relativamente pequenos (9,6 a 13,8mm) redondos e anecogénicos, compatíveis com folículos pré-vitelogénicos (Figura 29). A 22 de janeiro, data da segunda avaliação, todas as fêmeas apresentavam entre 11 e 12 folículos redondos com aumento da ecogenicidade, mais acentuada na fêmea 1, indicando o início da vitelogénese. À data da terceira avaliação, 17 de fevereiro, todas as fêmeas apresentavam entre cinco e seis folículos vitelogénicos pré-ovulatórios, redondos com ecogenicidade aumentada relativamente à avaliação anterior, novamente mais acentuada na fêmea 1 (Figura 30) Estes folículos diferenciavam-se de alguns outros mais pequenos e anecogénicos. Em março, aquando da quarta sessão, as fêmeas começaram a apresentar diferenças significativas. As fêmeas 1 e 2 apresentavam quatro e cinco folículos hiperecogénicos (respetivamente), compatíveis com uma fase mais avançada da vitelogénese, sendo que a fêmea 2 apresentava folículos com um aspeto mais alongado, fazendo suspeitar que se pudesse tratar de folículos vitelogénicos pós-ovulatórios (Figura 31). Por outro lado, na avaliação ecográfica da fêmea 3 observaram-se oito folículos maiores com um aspeto amorfo e de ecogenicidade variável, imagem compatível com reabsorção folicular (Figura 32). Finalmente, aquando da última avaliação, a 22 de abril a fêmea 1 apresentava os mesmos quatro folículos observados na avaliação anterior mas mais pequenos e com alguma perda de ecogenicidade, fazendo suspeitar de regressão dos folículos

(Figura 33); na ecografia realizada à fêmea 2 era possível observar os cinco folículos hiperecogênicos que mantinham a forma alongada da ecografia anterior (Figura 34) e a fêmea 3 apresentava apenas dois folículos pequenos e pouco ecogênicos, sugerindo que os folículos observados anteriormente já teriam regredido (Figura 35).



Figura 29 – Folículos pré-vitelogênicos. Primeira avaliação (07-01-2016), fêmea 3.



Figura 30 – Folículos ligeiramente ecogênicos redondos e agrupados em cacho, início da vitelogenese. Terceira avaliação (17-02-2016), fêmea 3.



A **B**
 Figura 31 – Quarta avaliação (18-03-2016). A - Folículo vitelogênico hiperecogênico (rodeado de folículos anecogênicos, mais pequenos), fêmea 1; B - Folículos hiperecogênicos com aspeto alongado, compatíveis com folículos pós-ovulatórios, fêmea 2.



Figura 32 – Folículos com aspeto amorfo e ecogenicidade variável. Quarta avaliação (18-03-2016), fêmea 3.



Figura 33 - Folículos com perda de ecogenicidade relativamente à avaliação anterior. Quinta avaliação (22-04-2016), fêmea 1.



Figura 34 - Folículos hiperecogénicos com aspeto alongado. Quinta avaliação (22-04-2016), fêmea 2.



Figura 35 - Folículos pequenos e pouco ecogênicos. Quinta avaliação (22-04-2016), fêmea 3.

O gráfico 14 demonstra a evolução do tamanho do maior folículo, em milímetros, ao longo da época reprodutiva para cada uma das três fêmeas. As alterações no tamanho folicular acompanharam as alterações morfológicas descritas.

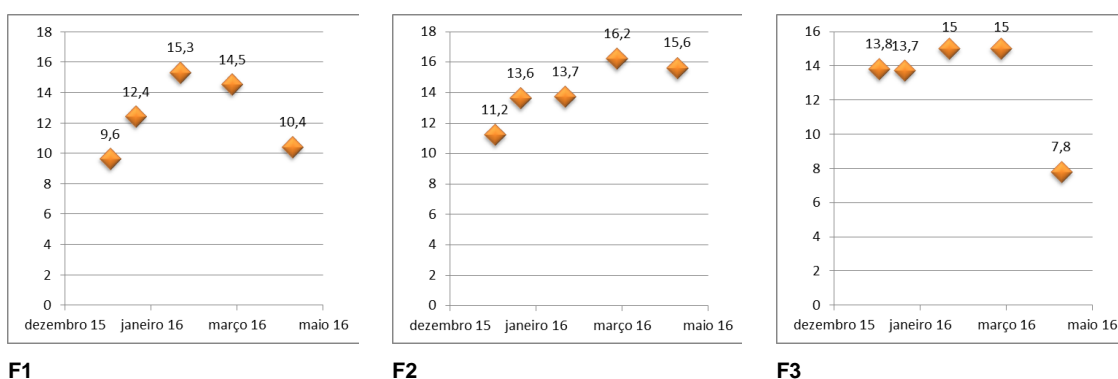


Gráfico 14 – Evolução do tamanho do maior folículo (mm) ao longo da época reprodutiva nas fêmeas 1, 2 e 3 (F1, F2 e F3, respectivamente)

3.5.4. Inseminação artificial

As inseminações foram realizadas segundo o esquema apresentado na tabela 11, com três momentos de inseminação para a fêmea 1, dois para a fêmea 2 e apenas um para a fêmea 3. As inseminações foram realizadas durante o período em que geralmente ocorrem as cópulas naturais. Todas as cobras foram inseminadas a 17 de fevereiro, altura em que a avaliação ecográfica revelou o início da vitelogênese, e duas delas já tinham sido inseminadas uma ou duas vezes anteriormente (a 15 de dezembro e 26 de janeiro).

Tabela 11 - Esquema de inseminações realizadas nas fêmeas 1, 2 e 3.

Fêmea	Inseminações	Macho
1	15-12-2015	Lemonblast calico
	26-01-2016	
	17-02-2016	
2	15-12-2015	Banana
	17-02-2016	
3	17-02-2016	Yellowbelly

As inseminações foram realizadas com as amostras de sémen diluído colhidas dos machos à data e no momento imediatamente antes da inseminação. Para cada momento de inseminação, a fêmea foi contida por uma pessoa, apenas segurando o animal em dois pontos de apoio, enquanto outra pessoa realizou a inseminação. As fêmeas foram inseminadas com volumes de 0,5mL utilizando uma seringa de 1mL introduzida diretamente na cloaca e direccionando o sémen dorsocranialmente, no sentido da papila genital.

A evolução do processo reprodutivo foi acompanhado por controlo folicular ecográfico (descrito em 3.5.3.) e por palpação na fase final do ciclo reprodutivo. Verificou-se desenvolvimento folicular até à fase vitelogénica em todas as fêmeas, e é possível suspeitar pelas imagens ecográficas que a fêmea 2 tenha ovulado. Contudo, na fêmea 3 verificou-se reabsorção folicular e na fêmea 1 foi possível observar uma regressão dos folículos que leva a crer que se tenha seguido reabsorção folicular. A fêmea 2 apresentava, na última avaliação (abril), folículos com aspeto de folículos vitelogénicos pós-ovulatórios saudáveis; no entanto registou-se uma diminuição do tamanho do maior folículo (de 16,2mm para 15,6mm) que não seria de esperar.

Por palpação, em maio e junho, não foi possível detetar folículos nas fêmeas 1 e 3, enquanto a palpação da fêmea 2 deixava algumas dúvidas. Nenhuma das três fêmeas pôs ovos, não havendo indício de retenção de ovos em nenhuma delas. Nas restantes reprodutoras da coleção, fêmeas em regime de cobrição natural, ocorreram as primeiras posturas em maio e esperam-se posturas até ao final de agosto.

3.5.5. Discussão dos resultados e investigação futura

Vários fatores podem estar na origem do insucesso das inseminações artificiais. Por um lado, as fêmeas estão instaladas numa sala em que estão outras fêmeas e machos, mas não tiveram contacto direto com nenhum macho no decorrer da presente época reprodutiva. Como discutido em 3.2., a presença de macho ou a própria cópula podem servir de estímulos à reprodução. É referido que algumas fêmeas podem não chegar a iniciar a vitelogénese ou

mesmo o crescimento folicular pré-vitelogénico na ausência de macho^{53,54,55}. As fêmeas estudadas no presente ensaio iniciaram a vitelogénese como se pôde verificar através da ecografia (ver 3.5.3.), contudo não se sabe até que ponto a presença de macho e/ou a cópula podem ter um papel na manutenção do crescimento folicular e vitelogénese.

Por outro lado, as datas e o número de inseminações e/ou a própria técnica de inseminação utilizada poderão ter relação com o seu insucesso^{50,52}. Não é conhecida a altura ideal para inseminação em *Python regius* ou em cobras em geral, sendo utilizado como referência o período em que geralmente ocorrem as cópulas. Sabe-se que o período de acasalamento se inicia em dezembro (altura em que foram inseminadas as fêmeas 1 e 2), tem o seu auge em janeiro e fevereiro (período em que todas as fêmeas foram inseminadas pelo menos uma vez) e pode durar até março. As fêmeas 1, 2 e 3 foram inseminadas três, duas e uma vez, respetivamente. Há registos de inseminação artificial em *Pantherophis guttatus* com apenas uma inseminação por fêmea. Contudo, nesse ensaio foram inseminados 10 animais e apenas se obtiveram três posturas, das quais apenas duas eclodiram com sucesso (correspondendo a uma taxa de sucesso de 20%)⁵².

Apesar da conhecida capacidade de armazenamento de sémen das fêmeas poder estar na origem de posturas férteis vários meses ou anos após a cópula, esse fenómeno nem sempre acontece. Os folículos pós-ovulatórios são fertilizados no oviduto e as avaliações ecográficas indicam que as fêmeas 1 e 3 não tenham chegado a ovular, o que explica que não pudesse sequer ter ocorrido a fecundação. Por outro lado, a fêmea 2 apresentava em março e abril imagens compatíveis com folículos pós-ovulatórios, pelo que estaria em condições para ocorrer a fertilização. Este facto leva-nos a questionar a disponibilidade de sémen viável no oviduto da fêmea. Nada nas avaliações da motilidade do sémen efetuadas aos machos indica que o sémen utilizado não fosse viável e os três machos produziram já descendência no passado. Contudo, o sémen introduzido via cloaca poderá não ter alcançado o oviduto das fêmeas, impossibilitando assim a ocorrência de fecundação^{53,54,67}.

Outro fator que poderá ter tido influência no sucesso das inseminações é a manipulação e o *stress* a ela associado. Os seis animais foram sujeitos a exame físico e colheita de sangue, os machos foram manipulados para cinco a sete colheitas de sémen e as fêmeas foram sujeitas a uma a três inseminações artificiais e cinco sessões de ecografia. Os exames físicos, colheitas de sangue e de sémen e inseminações foram feitos no local onde os animais se encontram alojados, pelo que as alterações das condições ambientais foram mínimas, devendo considerar-se essencialmente o *stress* associado à manipulação. Os animais são calmos e estão habituados à manipulação pelo que os esforços na contenção foram mínimos, não parecendo estar associado grande *stress* a estas manipulações. Contudo, para realização das ecografias, as fêmeas foram retiradas das suas instalações por períodos não superiores a três horas. Durante essas cinco deslocações não puderam ser controladas as condições ambientais, pelo que os animais estiveram sujeitos a temperaturas diferentes da sua

temperatura ótima. Nestes animais ectotérmicos as alterações das condições ambientais são um fator de *stress* a ter em consideração. Estes fatores de *stress* por si só ou, mais provavelmente, em conjunto com outras causas poderão ter estado associados ao insucesso das inseminações^{58,68}.

A reprodução assistida e inseminação artificial em répteis, assim como a colheita, conservação e avaliação do sémen, são temas ainda pouco explorados, pelo que investigações futuras serão uma mais-valia para o progresso científico nesta área da reprodução de répteis e de cobras em particular. Ensaio envolvendo colheita de sémen, avaliando de forma sistemática um maior número de parâmetros do sémen e/ou investigando potenciais meios de diluição e melhores formas de conservação do sémen, serão um enorme contributo para o progresso das técnicas de inseminação artificial, possibilitando, por exemplo, a criação de bancos de genes. Por outro lado, muito há a explorar relativamente à própria viabilidade da inseminação artificial em cobras e répteis em geral, sendo útil determinar com maior rigor os vários fatores condicionantes, sejam estímulos externos ou o momento e a técnica ideal para a inseminação. Estudos mais aprofundados da fisiologia reprodutiva de cada espécie, por exemplo, recorrendo a avaliações ecográficas para controlo folicular e sua associação com os restantes fenómenos ocorrentes no ciclo reprodutivo, poderiam auxiliar o estabelecimento mais rigoroso da calendarização do maneio reprodutivo.

4. Conclusões gerais

O estágio, através da aplicação prática contínua ao longo dos cinco meses na clínica, possibilitou o avigoramento de conhecimentos teóricos obtidos durante a componente letiva do curso, mas também a obtenção de uma enorme quantidade de saberes específicos da medicina de animais exóticos que até então só tinham sido vislumbrados, por meio do interesse e gosto pessoal, em conferências, *workshops*, palestras ou estudo autónomo.

A descrição das atividades desenvolvidas e análise estatística dos dados e em especial a investigação e o estudo mais aprofundado sobre os casos clínicos mais frequentes, permitiu fortalecer os conhecimentos adquiridos durante a prática clínica e, inclusivamente, o esclarecimento de algumas dúvidas sobre aspetos mais específicos da fisiopatogenia de alguns dos processos estudados.

O mês de atividades desenvolvidas na coleção de répteis, possibilitou através do contacto direto, o conhecimento de uma maior variedade de espécies de répteis e anfíbios, e suas especificidades. Esta oportunidade proporcionou ainda a familiaridade com a realidade da reprodução e criação de animais e com a medicina da reprodução.

No mesmo sentido, o desenvolvimento da monografia sobre “Inseminação artificial em *Python regius*” veio satisfazer o gosto e a curiosidade pessoal sobre a reprodução de répteis em cativeiro e as ferramentas médicas e tecnológicas que podem ser utilizadas em seu auxílio.

O estudo desenvolvido sobre a anatomofisiologia da reprodução em répteis e em cobras em particular, sobre as possibilidades de manejo reprodutivo em cativeiro, sobre avaliação reprodutiva com tudo o que esse tema engloba, tanto em machos como em fêmeas, e sobre as técnicas de inseminação artificial, foi muito enriquecedor pessoal e academicamente e extremamente útil no desenvolvimento e posterior análise dos resultados do ensaio prático.

A realização do ensaio prático foi uma experiência muito pedagógica, tendo servido como primeira abordagem à investigação científica. Os achados e conclusões retirados nas avaliações ao sêmen e controlo folicular trouxeram ensinamentos mas também novas dúvidas e vontade de descobrir mais e o insucesso da inseminação artificial propriamente dita deixa a determinação de prosseguir os estudos nesta área.

Referências bibliográficas

- ¹ Morais, AS (2002) Grande dicionário da língua portuguesa. Editora Kuidnovi, Lisboa.
- ² Portaria n.º 7/2010 de 5 de Janeiro. *Diário da República n.º 2*, Série I – Ministérios das Finanças e da Administração Pública, da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas e do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa.
- ³ Portaria n.º 1226/2009 de 12 de Outubro. *Diário da República n.º 197*, Série I — Instituto da conservação da Natureza e das Florestas, Ministérios do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- ⁴ Pilny, AA (2015) Small Exotic Companion Mammal Wellness Management and Environmental Enrichment. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(2): 245-254.
- ⁵ Rupley, AE & Simone-Freilicher, E (2015) Psittacine Wellness Management and Environmental Enrichment. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(2): 197-211.
- ⁶ Mans, C & Braun, J (2014) Update on common nutritional disorders of captive reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 17(3): 369-395.
- ⁷ Wilkinson, SL (2015) Reptile Wellness Management. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(2): 281-304.
- ⁸ Meredith, A (2012) A vaccine against myxomatosis and RHD: a step forward for rabbit health. *Veterinary Record*, 170(12): 307-308.
- ⁹ Quesenberry, KE & Carpenter, JW (2012) Chapter 15 Gastrointestinal Diseases. In *Ferrets, rabbits and rodents. Clinical Medicine and Surgery*. Third Edition, Ed. Saunders, pp.194-204.
- ¹⁰ Quesenberry, KE & Carpenter, JW (2012) Chapter 18 Dermatologic Diseases. In *Ferrets, rabbits and rodents. Clinical Medicine and Surgery*. Third Edition, Ed. Saunders, pp. 232-244.
- ¹¹ Spibey, N, McCabe, VJ, Greenwood, NM, Jack, SC, Sutton, D & van der Waart, L (2012) Novel bivalent vectored vaccine for control of myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease. *Veterinary Record*, 170(12): 309-309.
- ¹² Simpósio Veterinário da Apifarma:
<http://www.apifarma.pt/simposiumvet/Paginas/default.aspx>, consultado pela última vez a 01-07-2016
- ¹³ Jepson, L (2016) Exotic Animal Medicine: a quick reference guide, second edition. Elsevier Health Sciences, pp. 25-74.
- ¹⁴ Harris, LM (2015) Ferret Wellness Management and Environmental Enrichment. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(2): 233-244.
- ¹⁵ Moore, GE, Glickman, NW, Ward, MP, Engler, KS, Lewis, HB, Glickman, LT (2005) Incidence of and risk factors for adverse events associated with distemper and rabies vaccine administration in ferrets. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(6): 909-912.

- ¹⁶ Greenacre, CB (2003) Incidence of adverse events in ferrets vaccinated with distemper or rabies vaccine: 143 cases (1995-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(5): 663-665.
- ¹⁷ Taylor, DJ, Meredith, A, Redrobe, S & others (2002) 11 Fancy pigs. In *BSAVA Manual of exotic pets*, British Small Animal Veterinary Association.
- ¹⁸ Braun, WF & Casteel, SW (1993) Potbellied pigs: miniature porcine pets. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 23(6): 1149-1177.
- ¹⁹ Van Reeth, K & Ma, W (2012) Swine influenza virus vaccines: to change or not to change - that's the question. *Swine Influenza*. Springer, 173-200.
- ²⁰ Carpenter, JW (2013) Chapter 11 Miniature Pigs. In *Exotic animal formulary*, Elsevier Health Sciences, pp. 595-613.
- ²¹ Greenacre, CB (2005) Viral diseases of companion birds. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 8(1): 85-105.
- ²² Wellehan, JF & Johnson, AJ (2005) Reptile virology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 8(1): 27-52.
- ²³ Jimenez, J, Domingo, r, Crosta, L, Martínez-Silvestre, A (2009). Capítulo 1. Conejos. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 1-22.
- ²⁴ Lavazza, A, chiari, M, Nassuato, C, Giardiello, D, Tittarelli, C & Grilli, G (2016) Serological Investigation on Encephalitozoon cuniculi in pet Rabbits in North-Central Italy. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 25(1): 52-59.
- ²⁵ Jimenez, J, Domingo, R, Crosta, L, Martínez-Silvestre, A (2009) Capítulo 2. Cobayas. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 23-32.
- ²⁶ Jimenez, J, Domingo, R, Crosta, L, Martínez-Silvestre, A (2009) Capítulo 3. Chinchillas. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 33-40.
- ²⁷ Jimenez, J, Domingo, R, Crosta, L, Martínez-Silvestre, A (2009) Capítulo 4. Hámsters. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp.40-51.
- ²⁸ D' Ovidio, D, Pepe, P, Ianniello, D, Noviello, E, Quinton, JF, Cringoli, G & Rinaldi, L (2014) First survey of endoparasites in pet ferrets in Italy. *Veterinary parasitology*, 203(1): 227-230.
- ²⁹ Jimenez, J, Domingo, R, Crosta, L, Martínez-Silvestre, A (2009) Capítulo 5. Hurones. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 53-69.
- ³⁰ Vinke, CM & Schoemaker, NJ (2012) The welfare of ferrets (*Mustela putorius furo* T): A review on the housing and management of pet ferrets. *Applied animal behaviour science*, 139(3): 155-168.
- ³¹ Domingo, R & Crosta, L, Jimenez, J, Martínez-Silvestre, A (2009) Capítulo 7. Psitácidas. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 105-142.
- ³² Domingo, R & Crosta, L, Jimenez, J, Martínez-Silvestre, A (2009) Capítulo 10. Paseriformes. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 161-173.

- ³³ Domingo, R & Crosta, L, Jimenez, J, Martínez-Silvestre, A (2009) Capítulo 8. Palomas y Tórtolas. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, 143-152.
- ³⁴ Domingo, R & Crosta, L, Jimenez, J, Martínez-Silvestre, A (2009) Capítulo 12. Gallináceas y Anátidas. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 181-188.
- ³⁵ Martínez-silvestre, A, Jimenez, J, Domingo, R, Crosta, L (2009) Sección 3. Reptiles. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 221-285.
- ³⁶ Mitchell, MA & Diaz-Figueroa, O (2005) Clinical reptile gastroenterology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 8(2): 277-298.
- ³⁷ Martínez-silvestre, A, Jimenez, J, Domingo, R, Crosta, L (2009) Capítulo 20. Tortugas Terrestres. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 269-278.
- ³⁸ Martínez-silvestre, A, Jimenez, J, Domingo, R, Crosta, L (2009) Capítulo 21. Tortugas Acuáticas. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 279-285.
- ³⁹ Quesenberry, KE & Carpenter, JW (2012) Chapter 32 Small Mammal Dentistry. In *Ferrets, rabbits and rodents. Clinical Medicine and Surgery*. Third Edition. Ed. Saunders, pp.452-471.
- ⁴⁰ Reiter, AM (2008) Pathophysiology of dental disease in the rabbit, guinea pig, and chinchilla. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 17(2): 70-77.
- ⁴¹ Capello, V (2008) Diagnosis and treatment of dental disease in pet rodents. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 17(2): 114-123.
- ⁴² Harcourt-Brown, FM (2007) The progressive syndrome of acquired dental disease in rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 16(3): 146-157.
- ⁴³ Verstraete, FJ (2003) Advances in diagnosis and treatment of small exotic mammal dental disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 37-48.
- ⁴⁴ Worell, AB (2013) Dermatological conditions affecting the beak, claws, and feet of captive avian species. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16(3): 777-799.
- ⁴⁵ Koski, MA (2002) Dermatologic diseases in psittacine birds: an investigational approach. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 105-124.
- ⁴⁶ Martínez-silvestre, A, Jimenez, J, Domingo, R, Crosta, L (2009) Capítulo 19. Serpientes. In *Manual clínico de animales exóticos*. Barcelona: Multimédica SA, pp. 257-268.
- ⁴⁷ Mader, DR (2006) Chapter 18. Nutrition. In *Reptile medicine and surgery*, Second edition. Elsevier Health Sciences, pp.251-298.
- ⁴⁸ Mader, DR (2006) Chapter 44. Anorexia. In *Reptile medicine and surgery*, Second edition. Elsevier Health Sciences, pp. 739-741.
- ⁴⁹ Stahl, SJ (2001) Reptile production medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 140-150.
- ⁵⁰ Zacariotti, RL, Guimarães, MABL (2010) Aplicações da biotecnologia na reprodução de serpentes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34(2): 98-104.

- ⁵¹ Durrant, B (2009) The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). *Theriogenology*, 71(1):113–122.
- ⁵² Mattson, KJ, De Vries, A, McGuire, SM, Krebs, J, Louis, EE & Loskutoff, NM (2007) Successful artificial insemination in the corn snake, *Elaphe gutatta*, using fresh and cooled semen. *Zoo biology*, 26(5): 363–9.
- ⁵³ O'Malley, B (2007) Capítulo 5. Serpientes. In *Anatomía y fisiología clínica de animales exóticos*, S.L. Servet Diseño y Comunicación, Zaragoza, pp. 99-119.
- ⁵⁴ Mader, DR (2006) Chapter 23. Reproductive Biology. In *Reptile medicine and surgery*, Second edition. Elsevier Health Sciences, pp. 376-390.
- ⁵⁵ O'Malley, B (2007) Capítulo 2. Anatomía y fisiología de los reptiles. In *Anatomía y fisiología clínica de animales exóticos*, S.L. Servet Diseño y Comunicación, Zaragoza, pp. 23-54.
- ⁵⁶ Mader, DR (2006) Chapter 5. Snakes. In *Reptile medicine and surgery*, Second edition. Elsevier Health Sciences, pp. 42-58.
- ⁵⁷ World of Ball Pythons: <http://www.worldofballpythons.com/>, consultado pela última vez em 23-07-2016
- ⁵⁸ Stahl, SJ (2002) Veterinary management of snake reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 5(3): 615-636.
- ⁵⁹ Markus Jayne: <http://ballpython.ca/breeding/>, consultado pela última vez em 30-07-2016
- ⁶⁰ World of Ball Pythons: <http://www.worldofballpythons.com/python-regius/breeding/>, consultado pela última vez em 30-07-2016
- ⁶¹ Mader, DR (2006) Chapter 37. Ultrasonography. In *Reptile medicine and surgery*, Second edition. Elsevier Health Sciences, pp. 665-674.
- ⁶² Pees, M, Krautwald-Junghanns, ME, Reese, S & Tully, T (2012). Capítulo 23. Ecografía. In *Diagnóstico por imagen en animales exóticos: aves, pequeños mamíferos, reptiles.*, pp. 331-352.
- ⁶³ Silva, KB, Zogno, MA, Camillo, AB, Pereira, RJG & Almeida-Santos, SM (2015) Annual changes in seminal variables of golden lancehead pitvipers (*Bothrops insularis*) maintained in captivity. *Animal reproduction science*, 163:144-150.
- ⁶⁴ Tourmente, M, Cardozo, GA, Guidobaldi, HA, Giojalas, LC, Bertona, M & Chiaraviglio, M (2007) Sperm motility parameters to evaluate the seminal quality of *Boa constrictor occidentalis*, a threatened snake species. *Research in veterinary science*, 82(1): 93-8.
- ⁶⁵ Quinn, H, Blasedel, T & Platz, CC (1989) Successful artificial insemination in the checkered garter snake *Thamnophis marcianus*. *International Zoo Yearbook*, 28(1): 177-183.
- ⁶⁶ Carpenter, JW (2013) Chapter 4 Reptiles. In *Exotic animal formulary*, Elsevier Health Sciences, pp. 83-182.
- ⁶⁷ Holt, W & Lloyd, R (2010) Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well? *Theriogenology*, 73(6): 713-722.

⁶⁸ Sykes, JM (2010) Updates and practical approaches to reproductive disorders in reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13(3): 349-373.