RESSALVA

Atendendo solicitação do
autor, o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
somente a partir de 26/10/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

Thermal regimes effects over stress indicators in rattlesnakes, *Crotalus durissus* (Serpentes: Viperidae)

AILTON FABRÍCIO NETO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia).

Novembro - 2018

AILTON FABRÍCIO NETO

Thermal regimes effects over stress indicators in rattlesnakes, *Crotalus durissus* (Serpentes: Viperidae)

Orientador: Dr. Denis Otávio Vieira de Andrade

Coorientador: Dr. Fernando Ribeiro Gomes

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

Rio Claro
2018

F126t

Fabrício Neto, Ailton
Thermal regimes effects over stress indicators in rattlesnakes, Crotalus durissus (Serpentes: Viperidae) / Ailton Fabrício Neto. -- Rio Claro, 2018
37 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Denis Otávio Vieira Andrade
Coorientador: Fernando Ribeiro Gomes

1. Snakes. 2. Ectothermic. 3. Circadian Cycle. 4. Corticosterone. 5. Innate Immmunity. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Thermal regimes effects over stress indicators in rattlesnakes, Crotalus durissus (Serpentes: Viperidae)

AUTOR: AILTON FABRÍCIO NETO
ORIENTADOR: DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE
COORIENTADOR: FERNANDO RIBEIRO GOMES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. JOSE EDUARDO DE CARVALHO
Ecologia e Biologia Evolutiva / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Profa. Dra. STEFANNY CHRISTIE MONTEIRO TITON
Departamento de Fisiologia Geral / US/SP

Rio Claro, 26 de outubro de 2018

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a ciência, que estimula o pensamento crítico e através do método científico tem desafiado o obscurantismo dogmático perpetuado por pseudociências perigosas como o movimento antivacina, além de outras potencialmente nocivas, como homeopatia e astrologia.

Agradeço a minha família, pelo apoio durante o mestrado e, previamente, durante toda a vida. Meu irmão, minha mãe e meu pai são responsáveis pelo tipo de pessoa que sou hoje, e por isso sou eternamente grato a todos.

Ao amor da minha vida, pelo incentivo para escrever esse texto quando a vontade faltava, pelas viagens e passeios gastronômicos (gordices), por ouvir minhas reclamações, enfim, por ser a pessoa maravilhosa que ela é.

Ao meu orientador, professor Denis, por todas as conversas relacionadas ao projeto, por ter me ajudado a treinar para coletar sangue das cascavéis, pelos serviços de marcenaria para construção de novos abrigos para as serpentes e pelas reuniões do laboratório na sua casa, sempre alegradas pelo Nick (saudades dele, *in memorian*), nas quais sempre pudemos conversar sobre os mais diversos temas.

Ao meu coorientador, professor Fernando, por ter acreditado no projeto nos passos iniciais e durante toda sua execução. Por todas as conversas sobre o design experimental do estudo, pela calma transmitida, pela recepção sempre acolhedora no laboratório de fisiologia da USP... Muito obrigado =D

Agradeço ao professor Pizo pela supervisão e orientação durante o processo de estágio docência, no qual tive a oportunidade de participar de uma experiência que julguei extremamente positiva... Acredito que o futuro do nosso país depende não só de maiores investimentos em educação, mas também de tornarmos as aulas mais práticas e interessantes, estimulando a curiosidade e o pensamento crítico dos estudantes, fugindo da tradicional “decoreba”. Agradeço também a turma de Ecologia de 2017, pelo interesse demonstrado no decorrer na disciplina e pela amizade desenvolvida.

Agradeço de maneira muito especial às alunas e alunos do laboratório do professor Fernando. Em especial, agradeço a Carla (Skol) por toda a ajuda com as análises estatísticas desenvolvidas nesse trabalho e o treinamento para as técnicas de capacidade bactericida do plasma, além das padronizações para este ensaio. A Bruna (Itubaína), pelo treinamento e ajuda para a execução dos primeiros kits de corticosterona. Também agradeço a recepção dada por Ronyelle, Stefane, Stefanny, Aymam, Braz, Caroline, Faride, Diego, Adriana, Felipe e Débora, muito obrigado a todas e todos.

Agradeço ao Centro de Controle de Zoonoses de Itu (CCZ) pela doação de cascavéis para a realização desse estudo. Em especial, agradeço ao biólogo Diogo, que sempre nos recebeu muito bem no CCZ e se manteve em constante comunicação conosco, facilitando muito a fase de aquisição de animais para a execução dos experimentos.

Aos colegas de laboratório do jacarezário: Rafaela (Paquita), Amanda (Pink), Thiago (Pezinho), Juliana (Jujuba), Miguel, Luá, Rodolfo (Muzambinho) e Rodrigo (Penapolense), por todas as conversas, risadas, doces de carolina e saudações à mandioca realizadas durante esse período de mestrado.

Aos ajudantes durante as coletas de sangue, vitais para a execução desse trabalho e a quem espero ter transmitido uma visão mais realista sobre serpentes, abandonando preconceitos propagados através de alguns conhecimentos tradicionais e religiões: Sophia (Afilhadinha / Fuzuê), Augusto (Bad), Fernanda (Saúde), Vinícius (Bin Laden), Jade (Mística), Rafaela (Porteira), Nathália (Kiwi) e Maria Teresa (Vó), além das já citadas Paquita, Pink e Pezinho.

Agradeço ao Pedro (C3PO), Gabriel (Bebê) e Matheus pela ajuda com os materiais necessários para a montagem de esfregaços, além do treinamento para montar lâminas de qualidade.

Agradeço aos doutores Guilherme Gomes, Rafael Bovo e Célio Haddad, pelos comentários feitos na primeira avaliação desse projeto, os quais já foram incorporados durante a execução do mesmo, na medida do possível. Também agradeço aos membros da banca de qualificação, Ariovaldo Neto e Guilherme Gomes (novamente) por todas as sugestões oferecidas.

Agradeço aos técnicos do jacarezário Ayrton e Fernando pelas conversas e cafezinhos. Também agradeço aos técnicos da Zoologia, Fernando e Emygdio, por ceder alguns materiais importantes para a execução dos experimentos (heparina, por exemplo) e também pelos momentos de descontração.

Também agradeço ao pessoal da seção técnica de pós-graduação, em especial a Rosangela, Ivana e Felipe, por toda a ajuda nos tramites mais “burocráticos” e pela calma e atenção transmitidas quando ficamos aflitos pelos prazos que estão se aproximando.

Agradeço aos queridos amigos e amigas de São Paulo: Roberto (Beto), Luiz, Tadashi, Lia e agora a Iolanda (Ioio), por todas as hospedagens solidárias quando precisei ir até lá para execução dos experimentos.

Um agradecimento muito especial às amizades mais verdadeiras que já tive: Sally, Meg (saudades de você pretinha), Nina, Pituca, Bóris, Tarzan, Groselha e em Rio Claro, Beta e Luke. E as que não estão mais em minha vida, mas nunca serão esquecidas: Miranda, Pixuinha, Tobias, Neguinha, Coca e Remela.

As pessoas que não estão mais conosco, porém sempre lembradas: Vó Laide, Tia Ana, Bisa Henriqueta, Michel, Tia Lígia, Maria Isabela, Tio Pedro, Tio Nego, Murilão... Quantas saudades deixaram.

Ao CNPq pela bolsa concedida (Processo 134635/2016-7) e a FAPESP, ao auxílio da técnica Raphaela e novamente ao professor Fernando pela compra dos kits de corticosterona utilizados nesse estudo (Processo 2014/16320-7).

Por fim, agradeço as serpentes... Sem as quais esse estudo não seria possível. Minha esperança é que um dia os seres humanos abandonem sua ignorância e aprendam mais sobre esses animais.

Table of Contents

ABSTRACT

Ectothermic animals have their physiological functions closely related to temperature. For example, metabolic and growth rates of these animals may be affected by body temperature. Studies focusing on the measurement of metabolic rates in snakes, for example, are usually performed by subjecting animals to constant temperature regimes. However, ectotherms (snakes included) are known to exhibit wide variations in their body temperature throughout the circadian cycle. This disagreement between thermal biology and experimental conditions could act as a potential stressor agent for ectotherms. The present study tested the effects of different thermal regimes, constant and fluctuating, throughout the circadian cycle on stress indicators in rattlesnakes (*Crotalus durissus*). A group of animals was exposed to the constant-to-fluctuating treatment, composed by a constant temperature regime (30°C) followed by a fluctuating regime (25°C, 1800 to 0600h, 35°C, 0600h to 1800h, mean 30°C); the second group was subjected to the fluctuating-to-constant treatment, composed of a fluctuating regime and, after, the constant. The animals were exposed to the treatments for a period of 24 days, and on the 12th day the change of thermal regime occurred. We collected blood samples on days 2, 10, 14 and 22 to measure heterophil:lymphocyte ratio (H:L), plasma bacteria killing ability (BKA) and corticosterone plasmatic levels (CORT). The shift between constant and fluctuating thermal regime acted as an acute stressor for snakes, promoting an increase in plasma CORT levels. Exposure to a fluctuating thermal regime at the onset of the experiment induced a decrease in the BKA of rattlesnakes that persists for the whole experiment, and males also present higher levels of BKA than females. H:L was not affected by any of the treatments, therefore it is possible to postulate that the shift between constant and fluctuating thermal regimes acted as a low intensity stressor. Our results highlight that acute shifts in thermal regimes can promote a stress response in snakes, even after long times of maintenance in captivity.

Keywords: Snakes. Ectothermic. Circadian cycle. Corticosterone. Innate Immunity.

RESUMO

Animais ectotérmicos têm suas funções fisiológicas fortemente influenciadas pela temperatura. Por exemplo, taxas metabólicas e de crescimento destes animais podem ser afetadas pela temperatura corpórea. Estudos com foco na medição de taxas metabólicas em serpentes, por exemplo, geralmente são realizados através da submissão dos animais a regimes constantes de temperatura. No entanto, ectotérmicos (serpentes inclusas) são conhecidos por apresentarem variações amplas de sua temperatura corpórea ao longo do ciclo circadiano. Esta discordância entre biologia termal e condições experimentais poderia funcionar como um potencial agente estressor para os ectotérmicos, o que poderia comprometer os resultados e interpretações de estudos, pois um aumento nos níveis de glucocorticóides pode afetar diversos atributos de vertebrados, como taxas metabólicas e resposta imune. O presente estudo testou os efeitos de diferentes regimes térmicos, constante e flutuante, ao longo do ciclo circadiano sobre indicadores de estresse em cascavéis (*Crotalus durissus*). Para tanto, um grupo de animais foi exposto ao tratamento constante-flutuante, composto por um regime constante de temperatura (30°C) seguido por um flutuante (25°C, 1800 às 0600h; 35°C, 0600h às 1800h, média de 30°C); o segundo grupo foi submetido ao tratamento flutuante-constante, composto por um regime flutuante e, após, o constante. Os animais foram expostos aos tratamentos por um período de 24 dias, sendo que no 12° dia ocorreu a mudança de regime termal. Efetuamos coletas de sangue nos dias 2, 10, 14 e 22 para medição da taxa heterófilo:linfócito (H:L), capacidade bactericida do plasma (CBP) e níveis plasmáticos de corticosterona (CORT). A mudança entre o regime termal constante e o flutuante agiu como um agente estressor para as serpentes, causando um aumento nos níveis plasmáticos de CORT. A exposição a um regime flutuante no início do experimento causou uma diminuição na CBP das cascavéis que persistiu por todo o experimento, e machos também apresentaram maior CBP do que fêmeas. H:L não foi afetada por nenhuma das variáveis independentes, portanto é possível que a mudança entre regimes termais agiu como um estressor de baixa intensidade. Nossos resultados demonstram que mudanças agudas em regimes termais podem causar uma resposta ao estresse em serpentes, mesmo após longos tempos de manutenção em cativeiro.

Palavras-chave: Serpentes. Ectotérmicos. Ciclo Circadiano. Corticosterona. Imunidade Inata.

INTRODUCTION

The environmental temperature is an important abiotic factor influencing living organisms, as it broadly affects behavioral and physiological aspects (Huey and Stevenson, 1979; Kingsolver and Woods, 1997; Angilletta et al., 2002). The relation between environmental temperature and behavioral or physiological attributes is particularly relevant for ectothermic animals, since their body temperatures generally are correlated with the environmental temperature and its fluctuations (Angilletta et al., 2002; Andrade, 2016). Thus, the effects of temperature on a wide variety of functions and physiological processes, such as metabolic (Dorcas et al., 2004) and growth (Niehaus et al., 2012) rates, for example, have been studied in ectothermic animals (Angilletta et al., 2002).

The influence of temperature on different physiological parameters in ectothermic animals is usually tested by submitting the animals to constant temperature regimes throughout the study, often for several consecutive days (Secor, 2009; Saxon et al., 2018). However, under natural conditions, the body temperature of ectotherms generally exhibits circadian variation (Niehaus et al., 2012; Kingsolver et al., 2015; Colinet et al., 2015), snakes included (Tozetti and Martins, 2008; Gomes and Almeida-Santos, 2012; Andrade, 2016; Brischoux et al., 2016). Thus, the maintenance of ectothermic animals under constant temperature regime during experimentation can be quite different from what is experienced under natural conditions. This discrepancy, we suspect, may lead to bias in data acquisition and mislead interpretations. Indeed, differences in thermal regime are known to affect metabolic (Gavira and Andrade, 2013; Stahlschmidt et al., 2015), growth rates (Niehaus et al., 2012; Kingsolver et al., 2015) and thermal tolerance (Zatsepina et al., 2000; Manenti et al., 2018) of ectothermic animals. Therefore, it is possible that the absence of temperature fluctuations by denying a thermally changing environment or the possibility for thermoregulation could be perceived as a stressor by these animals (Andrade, 2016).

The exposure of different vertebrates to stressful situations triggers the activation of the hypothalamic-hypophysis-adrenal axis (HHA), resulting in secretion of glucocorticoids (GC) into the bloodstream (Wingfield et al., 1998; Wingfield, 2013). The effects of this increase in GC levels can be adaptive or deleterious (Dickens et al., 2010; Lucas and French, 2012) depending on its temporal pattern (Martin, 2009;

Dickens et al., 2010). A short-term increase in GC may improve the immune response during the post-stress recovery (Dhabhar and McEwen, 1999; Sapolsky et al., 2000; Moore and Jessop, 2003) and may also increase energy recruitment trough an enhancement of the intermediary metabolism (Durant et al., 2008; Preest and Cree, 2008). However, long-term exposure to stressors can lead to a chronic elevation of GC levels in the bloodstream, resulting in deleterious effects on reproduction, growth rates, and the immune system (Guillette et al., 1995; Sapolsky et al. 2000; French et al., 2007; Dickens et al., 2010). In reptiles, changes in environmental temperature may also be associated with changes in GC levels (Dupoué et al., 2013; Jessop et al., 2016), which can in turn affect diverse physiological attributes, as metabolism (DuRant et al., 2008; Preest and Cree, 2008), digestive performance (Bonnet et al., 2013), reproductive behavior (Brischoux et al., 2016) and immune response (Graham et al., 2012). Therefore, the experimental exposure of ectotherms to constant thermal regime might represent a stressor factor, and this would potentially influence physiological parameters, but this possibility remains unverified.

The magnitude of the stress response in reptiles generally has a positive correlation with plasma levels of corticosterone (CORT), the main GC in these animals (Romero, 2004; Lind et al., 2018). Handling and restraint (Kreger and Mench, 1993; Schuett et al., 2004; Sykes and Klukowski, 2009), translocation (Heiken et al., 2016), water deprivation (Dupoué et al., 2014) and acute temperature changes (Dupoué et al., 2013) are considered stressors for snakes, by increasing CORT plasma levels, which can affect the immune response in a complex manner (Martin, 2009). For example, the maintenance of chronically elevated GC levels can lead to a decrease of plasma bacteria killing ability (BKA) (Neuman-Lee et al., 2015). Additionally, the release of CORT leads to an increase in the ratio between circulating heterophils to lymphocytes (H:L rate; Davis and Maerz, 2008; Davis et al., 2008). Given that changes in GC and leukocyte profile in the bloodstream show a different temporal dynamic in response to a stressor (Seddon and Klukowski, 2012; Sparkman et al., 2014), increase in H:L usually requires longer exposure to an stressor agent, and may also be associated to stressor agents with higher levels of intensity (Assis et al., 2015). Therefore, the determination of H:L ratio, plasma CORT levels, and BKA may help to evaluate the potential stress caused by exposure of ectotherms to constant temperature regimes.

Different thermal regimes can affect physiological attributes in ectothermic animals in divergent ways (Niehaus et al., 2012; Kingsolver et al., 2015; Saxon et al., 2018), including stress and immune response (Jessop et al., 2016; Stahlschmidt et al, 2017). More specifically, in snakes, metabolic rates (*Bothrops alternatus*, Gavira and Andrade, 2013; *Pantherophis guttatus*, Stahlschmidt et al., 2015; *Crotalus durissus*, Fabrício-Neto et al., unpublished data) and innate immunity (*P. guttatus*, Stahlschmidt et al, 2017) may present differences according to the exposure to a constant or fluctuating thermal regime. Therefore, the aim of the present study was to investigate how different thermal regimes affected stress indicators and parameters of the immune system in the South American rattlesnake (*C. durissus*). These indicators included the determination of plasma CORT levels, H:L ratio and also an indicator of innate immunity (BKA). The rattlesnakes (*C. durissus*) is relevant to this study since it presents a circadian variation of body temperature, of up to 10°C (Tozetti and Martins, 2008; Andrade, 2016), which can even affect the selection of microhabitats for this species (Tozetti and Martins, 2008; Gomes and Almeida-Santos, 2012). Our hypothesis is that the exposure of rattlesnakes to constant thermal regime will act as a stressor, promoting changes associated with acute and chronic effects on the immune response. To test our hypothesis, we divided the experimental animals into two groups: 1) Constant-to-fluctuating, in which snakes were exposed to a constant thermal regime (30°C), followed by a fluctuating thermal regime (25-35°C, in a 12:12h cycle). 2) Fluctuating-to-constant, in which the snakes were exposed to a fluctuating thermal regime, followed by a constant thermal regime. In both cases, treatments lasted for 24 days, with the change in thermal regimes happening at day 12. This experimental design was done to allow the assessment of a previous acclimation, to either constant or fluctuating conditions, over the exposure to a new thermal regime. We forecast that: 1) CORT and BKA will increase in the short term under the constant regime both at constant-to-fluctuating and fluctuating-to-constant treatments. 2) CORT and H:L will increase in the long term in the constant thermal regime at both treatments, and BKA will decrease. 3) CORT levels, BKA and H:L ratio will not change during the exposure to the fluctuating regime of the fluctuating-to-constant treatment and CORT and H:L will decrease in the constant-to-fluctuating treatment, whereas BKA will increase.

ALMEIDA-SANTOS, S. M.; ORSI, A. M. Reproductive cycle in *Crotalus durissus* and *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae): morphology and function oviductal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v. 26, p. 109-112, 2002.

ANDRADE, D. V. Temperature effects on the metabolism of amphibians and reptiles. In: **Amphibian and Reptile Adaptations to the Environment: Interplay Between Physiology and Behavior.** Andrade, D.V., Bevier, C. R., Carvalho, J. E., Eds, CRC Press. Cap. nº 6, p. 129-154, 2016.

ANGILLETTA, M. J.; NIEWIAROWSKI, P.H.; NAVAS, C.A. The evolution of thermal physiology in ectotherms. **Journal of Thermal Biology**, v. 27, p. 249-268, 2002.

ANGILLETTA, M.J. Thermal Adaptation: a Theoretical and Empirical Synthesis. Oxford University Press, Oxford, 2009.

ASSIS, V. R.; MONTEIRO, S. C. G.; BARSOTTI, A. M. G.; SPIRA, B.; GOMES, F. R. Antimicrobial capacity of plasma from anurans of the Atlantic Forest. **South American Journal of Herpetology**, v. 8, p. 155-160, 2013.

ASSIS, V. R.; TITON, S. C. M.; BARSOTTI, A. M. G.; TITON Jr., B.; GOMES, F. R. Effects of acute restraint stress, prolonged captivity stress and transdermal corticosterone application on immunocompetence and plasma levels of corticosterone on the Cururu Toad (*Rhinella icterica*). **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0121005, 2015.

BATES D; MÄCHLER M.; BOLKER B.; WALKER, S. lme4: Linear Mixed-Effects Models Using Eigen and S4. **R package version 1.1-7, URL http://CRAN.R-project.org/package=lme4**, 2014.

BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. **arXiv preprint arXiv:1406.5823**, 2015.

BONNET, X.; FIZESAN, A.; MICHEL, C. L. Shelter availability, stress levels and digestive performance in the aspic viper. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 815-822, 2013.

BONNET, X.; EL HASSANI, M. S.; LECQ, S.; MICHEL, C. L.; EL MOUDEN, E. H.; MICHAUD, B.; SLIMANI, T. Blood mixtures: impact of puncture site on blood parameters. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 186, n. 6, p. 778-800, 2016.

BRISCHOUX, F.; DUPOUÉ, A.; LOURDAIS, O.; ANGELIER, F. Effects of mild wintering conditions on body mass and corticosterone levels in a temperate reptile, the aspic viper (*Vipera aspis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 192, p. 52-56, 2016.

BROWN, C. Cardiac blood sample collection from snakes. Lab animal, v. 39, n. 7, p. 208-209, 2010.

BRUSCH, G. A.; DENARDO, D. F. When less means more: dehydration improves innate immunity in rattlesnakes. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, p. 2287-2295, 2017.

BURHAM, K.P.; ANDERSON, D. R. **Model selection and multimodel inference: a practical information – Theoretic approach**. Springer Press, New York, 2002.

BUTLER, M. W.; STAHLSCHMIDT, Z. R.; ARDIA, D. R.; DAVIES, S.; DAVIS, J.; GUILLETTE JR., L. J.; JOHNSON, N.; McCORMICK, S. D.; McGRAW, K. J.; DENARDO, D. F. Thermal sensitivity of immune function: evidence against a generalist-specialist trade-off among endothermic and ectothermic vertebrates. **The American Naturalist**, v. 181, p. 761-774, 2013.

COLINET, H.; SINCLAIR, B. J.; VERNON, P.; RENAULT, D. Insects in Fluctuating Thermal environments. **Annual Review Entomology**, v. 60, p. 123-140, 2015.

DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. Comparison of Hematological Stress Indicator in Recently Captured and Captive Paedomorphic Mole Salamanders, *Ambystoma talpoideum*. **Copeia**, v. 3, p. 613-617, 2008.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, p. 760-772, 2008.

DHABHAR, F. S.; McEWEN, B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 1059-1064, 1999.

DICKENS, M. J.; DELEHANTY, D. J.; ROMERO, L. M. Stress: an inevitable component of animal translocation. **Biological Conservation**, v. 143, p. 1329-1341, 2010.

DORCAS, M.E.; HOPKINS, W.A.; ROE, J.H. Effects of body mass and temperature on standard metabolic rate in the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **Copeia,** v. 1, p. 145–151, 2004.

DUPOUÉ, A.; BRISCHOUX, F.; LOURDAIS, O.; ANGELIER, F. Influence of temperature on the corticosterone stress-response: an experiment in the Children's python (*Antaresia childreni*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 193, p. 178-184, 2013.

DUPOUÉ, A.; ANGELIER, F.; LOURDAIS, O.; BONNET, X.; BRISCHOUX, F. Effect of water deprivation on baseline and stress-induced corticosterone levels in the Children's python (*Antaresia childreni*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 168, p. 11-16, 2014.

DURANT, S. E.; ROMERO, L. M.; TALENT, L. G.; HOPKINS, W. A. Effect of exogenous corticosterone on respiration in a reptile. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, p. 126-133, 2008.

DYER, S. M.; CERVASIO, E. L. An Overview of Restraint and Blood Collection Techniques in Exotic Pet Practice. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 423-443, 2008.

FERGUSON, L. V.; KORTET, R.; SINCLAIR, B. J. Eco-immunology in the cold: the role of immunity in shaping the overwintering survival of ectotherms. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, doi: 10.1242/jeb.163873, 2018.

FRENCH, S. S.; McLEMORE, R.; VERNO, B.; JOHNSTON, G. I. H.; MOORE, M. C. Corticosterone modulation of reproductive and immune systems trade-offs in female tree lizards: long-term corticosterone manipulations *via* injectable gelling material. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 2859-2865, 2007.

FRENCH, S. S.; NEUMAN-LEE, L. A. Improve ex vivo method for microbiocidal activity across vertebrate species. **Biology Open,** v. 000**,** p. 1-6**,** doi: 10.1242/bio.2012919, 2011.

GAVIRA, R. S. B.; ANDRADE, D. V. Temperature and thermal regime effects on the specific dynamic action of *Bothrops alternatus* (Serpentes, Viperidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 34, p. 483–491, 2013.

GOMES, C. A.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Microhabitat use by species of the genera *Bothrops* and *Crotalus* (Viperidae) in semi-extensive captivity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 4, p. 393-398, 2012.

GRAHAM, S. P.; KELEHEAR, C.; BROWN, G. P.; SHINE, R. Corticosterone-immune interactions during captive stress in invading Australian cane toads (*Rhinella marina*). **Hormones and Behavior**, v. 62, p. 146-153, 2012.

GRAHAM, S. P.; FIELMAN, K. T.; MENDONÇA, M. T. Thermal performance and acclimatization of a component of snake (*Agkistrodon piscivorus*) innate immunity. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 327, p. 351-357, 2017.

GUILLETTE Jr., L. J.; Cree, A.; ROONEY, A. A. Biology of stress: interactions with reproduction, immunology and intermediary metabolism. In: **Health and welfare of captive reptiles**. Warwick C., Frye F. L., Murphy J. B., editors, London: Chapman and Hall., p. 32-81, 1995.

HEIKEN, K. H.; BRUSCH IV, G. A.; GARTLAND, S.; ESCALLÓN, C.; MOORE, I. T.; TAYLOR, E. N. Effectos of long distance translocation on corticosterone and testosterone levels in male rattlesnakes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 237, p. 27-33, 2016.

HUEY, R. B.; STEVENSON, R. D. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. **American Zoology**, v. 19, p. 357-366, 1979.

ISAZA, R.; ANDREWS, G. A.; COKE, R. L.; HUNTER, R. P. Assessment of Multiple Cardiocentesis in Ball Pythons (*Python regius*). **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 35-38, 2004.

JESSOP, T. S.; LANE, M. L.; TEASDALE, L.; STUART-FOX, D.; WILSON, R. S.; CAREAU, V.; MOORE, I. T. Multiscale evaluation of thermal dependence in the glucocorticoid response of vertebrates. **The American Naturalist**, v. 188, p. 342-356, 2016.

JOHNSON, R. Clinical Technique: handling and treating venomous snakes. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, n. 2, p. 124-130, 2011.

KEARNEY, M.; SHINE, R.; PORTER, W. P. The potential for behavioral thermoregulation to buffer "cold-blooded" animals against climate warming. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 3835-3840, 2009.

KINGSOLVER, J. G.; WOODS, H. A. Thermal sensitivity of growth and feeding in *Manduca sexta* caterpillars. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 70, n. 6, p. 631-638, 1997.

KINGSOLVER, J. G.; HIGGINS, J. K.; AUGUSTINE, K. E. Fluctuating temperatures and ectotherm growth: distinguishing non-linear and time-dependend effects. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 2218-2225, 2015.

KÖBÖLKUTI, L.; SPINU, M.; CADAR, D.; CZIRJAK, G.; KISS, T.; URICARU, A.; CSEGEZY, B. Tail venipuncture and cardiocentesis techniques for blood sample collection in horned viper (*Vipera ammodytes*). **Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara**, v. 42, n. 2, p. 228-230, 2009.

KREGER, M. D.; MENCH, J. A. Physiological and behavioral effects of handling and restraint in the ball python (*Python regius*) and the blue-tongued skink (*Tiliqua scincoides*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 38, p. 323-336, 1993.

LIND, C. M.; BEAUPRE, S. J. Natural variation in the steroid hormone profiles of male Timber Rattlesnakes, *Crotalus horridus*, in northwest Arkansas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 206, p. 72-79, 2015.

LIND, C. M.; MOORE, I. T.; VERNASCO, B. J.; FARRELL, T. M. Seasonal testosterone and corticosterone patterns in relation to body condition and reproduction in a subtropical pitviper, *Sistrurus miliaris*. **General and Comparative Endocrinology**, *article in press*, https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.027, 2018.

LUCAS, L. D.; FRENCH, S. S. Stress-Induced Tradeoffs in a Free-Living Lizard across a Variable Landscape: Consequences for Individuals and Populations. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e 0049895, 2012.

LUKE, S. G. Evaluating significance in linear mixed-effects models in R. **Behavior Research Methods**, v. 49, p. 1494-1502, 2017.

MANENTI, T.; LOESCHCKE, V.; SØRENSEN, J. P. Constitutive up-regulation of Turandot genes rather than changes in acclimation ability is associated with the evolutionary adaptation to temperature fluctuations in *Drosophila simulans*. **Journal of Insect Physiology**, v. 104, p. 40-47, 2018.

MARTIN, L. B. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. **General and Comparative Endocrinology**, v. 163, p. 70-76, 2009.

MOORE, I. T.; MASON, R. T. Behavioral and hormonal responses to corticosterone in the male red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*. **Physiology and Behavior**, v. 72, p. 669-674, 2001.

MOORE, I. T.; JESSOP, T. S. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 39-47, 2003.

NEUMAN-LEE, L. A.; FOKIDIS, H. B.; SPENCE, A. R.; WALT, M. V.; SMITH, G. D.; DURHAM, S.; FRENCH, S. S. Food restriction and chronic stress alter energy use and affect immunity in an infrequent feeder. **Functional Ecology**, v. 29, p. 1453-1462, 2015.

NIEHAUS, A. C.; ANGILLETTA Jr., M. J.; SEARS, M. W.; FRANKLIN, C. E.; WILSON, R. S. Predicting the physiological performance of ectotherms in fluctuating thermal environments. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 694-701, 2012.

PREEST, M. R.; CREE, A. Corticosterone treatment has subtle effects on thermoregulatory behavior and raises metabolic rate in the New Zealand common gecko, *Hoplodactylus maculatus*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, p. 641-650, 2008.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **URL** **https://www.R-project.org/**, 2018.

RAFFEL, T. R.; ROHR, J. R.; KIESECKER, J. M.; HUDSON, P. J. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. **Functional Ecology**, v. 20, p. 819-828, 2006.

RAFFEL, T. R.; ROMANSIC, J. M.; HALSTEAD, N. T.; McMAHON, T. A.; VENESKY, M. D.; ROHR, J. R. Disease and thermal acclimation in a more variable and unpredictable climate. **Nature Climate Change**, v. 3, p. 146-151, 2013.

ROMERO, L. M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, p. 249-255, 2004.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SAXON, A. D.; O'BRIEN, E. K.; BRIDLE, J. R. Temperature fluctuations during development reduce male fitness and may limit adaptive potential in tropical rainforest *Drosophila*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 31, p. 405-415, 2018.

SCHUETT, G. W.; TAYLOR, E. N.; KIRK, E. A. V.; MURDOCH, W. J. Handling stress and plasma corticosterone levels in captive male western diamond-backed rattlesnakes (*Crotalus atrox*). **Herpetological Review**, v. 35, p. 229-233, 2004.

SECOR, S. M. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, n. 1, p. 1-56, 2009.

SEDDON, R. J.; KLUKOWSKI, M. Influence of stressor duration on leukocyte and hormonal responses in male southeastern five-lined skinks (*Plestiodon inexpectatus*). Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, v. 317, p. 499-510, 2012.

SPARKMAN, A. M.; BRONIKOWSKI, A. M.; WILLIAMS, S.; PARSAI, S.; MANHART, W.; PALACIOS, M. G. Physiological indices of stress in wild and captive garter snakes: Correlations, repeatability, and ecological variation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 174, p. 11-17, 2014.

STAHLSCHMIDT, Z. R.; JODREY, A. D.; LUOMA, R. L. Consequences of complex environments: temperature and energy intake interact to influence growth and metabolic rate. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 187, p. 1-7, 2015.

STAHLSCHMIDT, Z. R.; FRENCH, S. S.; AHN, A.; WEBB, A.; BUTLER, M. W. A simulated heat wave has diverse effects on immune function and oxidative physiology in the corn snake (*Pantherophis guttatus*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 90, p. 434-444, 2017.

SYKES, K. L.; KLUKOWSKI, M. Effects of Acute Temperature Change, Confinement and Housing on Plasma Corticosterone in Water Snakes, *Nerodia sipedon* (Colubridae: Natricinae). **Journal of Experimental Zoology**, v. 311A, p. 172-181, 2009.

SZWEJSER, E.; KEMENADE, B. L. V.; MACIUSZEK, M.; CHADZINSKA, M. Estrogen-dependent seasonal adaptations in the immune response of fish. **Hormones and Behavior**, v. 88, p. 15-24, 2017.

TITON, S. C. M.; ASSIS, V. R.; TITON Jr., B.; BARSOTTI, A. M. G.; FLANAGAN, S. P.; GOMES, F. R. Calling rate, corticosterone plasma levels and immunocompetence of *Hypsiboas albopunctatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 201, p. 53-60, 2016.

TOZETTI, A.M.; MARTINS, M. Habitat use by the South-American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in south-eastern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 42, nos. 19-20, p. 1435-1444, 2008.

VASSEUR, D. A.; DELONG, J. P.; GILBERT, B.; GREIG, H. S.; HARLEY, C. D. G.; McCANN, K. S.; SAVAGE, V.; TUNNEY, T. D.; CONNOR, M. I. Increased temperature variation poses a greater risk to species than climate warming. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 281, p. 20132612, 2014.

WINGFIELD, J. C.; MANEY, D. L.; BREUNER, C. W.; JACOBS, J. D.; LYNN, S.; RAMENOFSKY, M.; RICHARDSON, R. D. Ecological Bases of Hormone-Behavior Interactions: The "Emergence Life History Stage". **American Zoologist**, v. 38, n. 1, p. 191-206, 1998.

WINGFIELD, J. C. Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. **Functional Ecology**, v. 27, p. 37-44, 2013.

ZATSEPINA, O. G.; ULMASOV, KH. A.; BERESTEN, S. F.; MOLODTSOV, V. B.; RYBTSOV, S. A. Thermotolerant desert lizards characteristically differ in terms of heat-shock system regulation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 1017-1025, 2000.

ZIMMERMAN, L. M.; PAITZ, R. T.; VOGEL, L. A.; BOWDEN, R. M. Variation in the seasonal patterns of innate and adaptive immunity in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 1477-1483, 2010.

ZIMMERMAN, L. M.; CARTER, A. W.; BOWDEN, R. M.; VOGEL, L. A. Immunocompetence in a long-lived ectothermic vertebrate is temperature dependent but shows no decline in older adults. **Functional Ecology**, v. 31, p. 1383-1389, 2017.