

Francisco Pires de Oliveira Laia Franco

**Influência da exposição à radiação ultravioleta B e
da suplementação oral com vitamina D e cálcio em
Eublepharis macularius (Geco leopardo)**

Orientadora: Professora Doutora Ana Faustino

Co-orientador: Professor Drº Rui Patrício

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

Francisco Pires de Oliveira Laia Franco

**Influência da exposição à radiação ultravioleta B e
da suplementação oral com vitamina D e cálcio em
Eublepharis macularius (Gecos leopardo)**

Dissertação defendida para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 4 de setembro de 2020, com o despacho reitoral nº 213/2020, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Maria João Pires

Orientadora: Professora Doutora Ana Faustino

Coorientador: Professor Drº Rui Patrício

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

De que vale ao homem ganhar o mundo
inteiro se vier a perder a sua alma?

São Marcos, 8, 36

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, a todos os docentes e colaboradores, em especial à Professora Doutora Laurentina Pedroso, pela oportunidade e por todos estes anos de exigência, profissionalismo e transmissão de conhecimentos.

À Professora Doutora Ana Faustino e ao Professor Rui Patrício por toda a amizade, dedicação, disponibilidade e apoio na elaboração desta dissertação de mestrado.

Ao Hospital Veterinário das Laranjeiras, em especial à Dra. Ana e à Inês, pela disponibilidade, simpatia e prontidão na execução das análises, proporcionando-me livre acesso ao hospital quando me era mais conveniente.

A toda a equipa da Clínica Veterinária de Tires e do Hospital Veterinário de Gaia pelos conhecimentos partilhados, pela forma como me receberam e por me incutirem valores importantes na prática clínica.

Aos tutores dos Gecos leopardo, Gonçalo, Inês, Manuel, Patrícia, Pedro e Rui, que aceitaram participar neste estudo, por toda a disponibilidade, companheirismo e dedicação.

À minha família, em especial aos meus pais pela educação, pelos valores que me transmitiram e por todo o apoio. Aos meus queridos avós por sempre acreditarem em mim, por serem exemplo de alegria, bondade e humildade. À minha irmã, aos meus tios e aos meus primos pela força e entusiasmo que me transmitiram. À Prada e ao West pela alegria constante.

Aos meus amigos de curso, Beatriz Taborda, Diogo Paulino, João Santos, Margarida Martins, Nuno Santos e Rita Bruno por todo o companheirismo, noitadas, espírito académico e amizade.

Diogo, obrigado pela amizade, pela companhia nas intermináveis horas à frente do computador, pelas semanas na Prainha e pelos jantares na Ericeira, pelas horas de almoço, alegadamente curtas, por todas as idas ao cinema e por toda a diversão sempre que estamos juntos. Hoje Portugal, amanhã Nova Zelândia!

João, obrigado pela amizade, pelas semanas na Prainha e Rio Torto, pelos resgates (os que já fizemos e os que estão por vir) e pelas noites na alameda com o Tommy e com o Bolinha.

Aos dois agradeço a partilha constante de conhecimentos que muito nos facilitou este percurso e por todo o companheirismo ao longo destes anos.

Carlitos, obrigado pela amizade, pelas noites em Óbidos, Caminha, Deixa-o-Resto e Prainha, por todos estes anos em que escolhemos vestir o traje académico e transmitir os valores da praxe, pelas noitadas no waves e pelas viagens (as que fizemos e as que estão por vir).

Mariana, obrigado pela amizade, pelas noitadas no waves, pelas conversas tardias, pelas noites sem rumo, pelo conselho das sombras, e por em conjunto termos concretizado o desejo que tínhamos de implementar a Missão País na nossa universidade.

A todos os colegas e amigos que estiveram a meu lado por toda a amizade, apoio e alegria, em especial ao JP, Dinis e Manel, à Marta e à Inês, ao Guga e à Teresa, ao Miguel e à Rute, à minha madrinha Filipa e aos meus afilhados.

A mis amigos, Debanhi, Yazmín, Florian, Matheus e Samia, por toda la amistad y por haceren de Chile un lugar que siempre llevo en mi corazón. Agradeço, também, à Dra. Elisabete Lourenço por toda a amizade e paciência, e pela ajuda incansável na concretização desta experiência.

Ao Colégio São João de Brito por me educar para servir. Aos meus amigos do colégio, Francisco, Matilde, Rita, Mia e Ana Filipa, que sempre estiveram comigo, por todos os momentos que passámos, pelos valores que partilhamos e pela certeza de que, independente de tudo, vamos continuar juntos por muito tempo.

À Missão País pelas conversas, jogos, partilhas e amigos que fiz em Pontével e Santa Eufémia. Que nunca me deixe de arder o coração.

Obrigado.

RESUMO

A vitamina D regula diversas funções fisiológicas fundamentais nos vertebrados, nomeadamente a homeostase do cálcio. Devido à grande diversidade de espécies de répteis e às várias adaptações ambientais, têm sido realizados diversos estudos para compreender as necessidades e adaptações individuais de cada espécie no que diz respeito à vitamina D e à sua importância e aquisição no estado selvagem. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da exposição à radiação ultravioleta (UV) e da suplementação oral com vitamina D e cálcio nos níveis plasmáticos de cálcio ionizado (iCa^{++}) em *Eublepharis macularius* (Geco leopardo).

Foram recolhidas amostras sanguíneas na veia jugular externa em duas consultas de *check-up* com cinco semanas de diferença e analisada a concentração de iCa^{++} em 15 Gecos leopardo de diferentes tutores e submetidos a diferentes condições ambientais: animais suplementados ($n=5$), animais submetidos à radiação UV ($n=5$) e animais não suplementados nem submetidos a radiação (controlo) ($n=5$). A concentração sanguínea de iCa^{++} não variou significativamente ($p>0,05$) entre grupos, ou dentro de cada grupo no decorrer do estudo.

O Geco leopardo tem a capacidade de manter a concentração de iCa^{++} sem qualquer tipo de suplementação, durante pelo menos 42 dias, sem desenvolver sinais de doença óssea metabólica (MBD), e os animais suplementados parecem não ter beneficiado da suplementação durante este período de tempo.

Palavras-chave: Cálcio ionizado; Geco leopardo; radiação ultravioleta; répteis; vitamina D

ABSTRACT

Vitamin D regulates many fundamental physiologic functions in vertebrates, mainly calcium homesotasis. Because of the big diversity of reptile species and the various environmental adaptations, many studies have been conducted to understand the individual necessities and adaptations of each specie regarding vitamin D, its importance and acquisition in the wild. This study aimed to evaluate the influence of exposure to ultraviolet (UV) radiation and vitamin D and calcium oral supplementation on plasma levels of ionized calcium in *Eublepharis macularius* (Leopard gecko).

Blood samples were collected from the jugular vein in two check-up appointments five weeks apart and the concentration of ionized calcium (iCa^{++}) was analyzed in 15 Leopard geckos from different tutors and submitted to different environmental conditions: supplemented animals ($n = 5$), animals exposed to UV radiation ($n = 5$) and animals not supplemented or exposed to radiation (control) ($n = 5$). Ionized calcium plasma levels did not vary significantly ($p > 0.05$) among groups, or within each group during the study.

The Leopard gecko has the ability to maintain iCa^{++} concentration, without any supplementation, for at least 42 days, without developing signs of metabolic bone disease, and the supplemented animals seem not to have benefited from supplementation during this period of time.

Keywords: Ionized calcium; Leopard gecko; reptiles; ultraviolet radiation; vitamin D

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α -MSH - Hormona estimulante dos melanócitos-alfa, do inglês “alpha-melanocyte-stimulating hormone”

1,25(OH)₂D₃ - 1,25-dihidroxicolecalciferol

25(OH)D₃ - 25-hidroxicolecalciferol

7-DHC - 7-dehidrocolesterol

BE - Excesso de base, do inglês “base excess”

CEBEA - Comissão de Ética e Bem Estar Animal

D.P. - Desvio padrão

EC - Estrato córneo

EFOMV - Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários

EG - Estrato germinativo

Et al. - E outros, da locução latina “*et alii*”

EUA - Estados Unidos da América

FGF23 - Fator de crescimento dos fibroblastos, do inglês “fibroblast growth factor 23”

Glu - Glucose

HCO₃⁻ - Bicarbonato

Hct - Hematócrito

Hgb - Hemoglobina

HVG - Hospital Veterinário de Gaia

iCa⁺⁺ - Cálcio ionizado

K⁺ - Ião potássio

MBD - Doença óssea metabólica, do inglês “metabolic bone disease”

n - Número absoluto

Na⁺ - Ião sódio

NSHP - Hiperparatireoidismo secundário nutricional, do inglês “nutritional secondary hyperparathyroidism”

PCO₂ - Pressão parcial de dióxido de carbono

PO₂ - Pressão parcial de oxigénio

PTH - Paratormona, do inglês “parathormone”

sO₂ - Saturação de oxigénio

TCO₂ - dióxido de carbono total

UV - Ultravioleta

UVA - Ultravioleta A

UVB - Ultravioleta B

UVC - Ultravioleta C

ZI - Zona intermédia

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	13
CASUÍSTICA E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. GECO LEOPARDO.....	19
1.1.1. TAXONOMIA.....	19
1.1.2. HABITAT.....	20
1.1.3. ORGANIZAÇÃO SOCIAL E REPRODUÇÃO.....	21
1.1.4. ALIMENTAÇÃO.....	22
1.1.5. AMEAÇAS NA NATUREZA.....	22
1.1.6. CATIVEIRO.....	22
1.2. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	24
1.2.1 TRANSMISSÃO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	25
1.2.2. BENEFÍCIOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	27
1.2.3. EFEITOS ADVERSOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.....	28
1.3. VITAMINA D E CÁLCIO.....	29
1.3.1. AQUISIÇÃO DE VITAMINA D.....	29
1.3.2. TRANSPORTE DA VITAMINA D.....	32
1.3.3. FUNÇÕES DA VITAMINA D.....	32
1.3.4. FOTOISOMERIZAÇÃO E FOTODEGRADAÇÃO DA VITAMINA D.....	34
1.3.5. INTOXICAÇÃO POR VITAMINA D.....	34
1.3.6. DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D.....	35
1.4. A RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E A VITAMINA D NAS DIFERENTES ESPÉCIES.....	37
1.5. OBJETIVOS.....	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3. RESULTADOS.....	45
3.1. ANIMAIS.....	45
3.2. CÁLCIO IONIZADO.....	46
4. DISCUSSÃO.....	48
5. CONCLUSÃO.....	53
6. BIBLIOGRAFIA.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Número de animais em cada grupo e idade no início do estudo	45
TABELA 2. Massa corporal dos animais no início e no final do estudo	45
TABELA 3. Concentração sanguínea de cálcio ionizado (iCa^{++}) no início e no final do estudo	46
TABELA 4. Valores iniciais e finais dos restantes parâmetros sanguíneos	47

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Geco leopardo com coloração selvagem	20
FIGURA 2. Exemplos de colorações de Gecos leopardo	20
FIGURA 3. Distribuição natural do Geco leopardo	21
FIGURA 4. Habitat natural do Geco leopardo em Kirana Hills, Sargodha, Punjab, Pakistan	21
FIGURA 5. Espectro electromagnético.....	24
FIGURA 6. Anatomia da pele do Geco	26
FIGURA 7. Estrutura química da vitamina D2 e da vitamina D3	30
FIGURA 8. Síntese e ativação da vitamina D nos animais	31
FIGURA 9. Intoxicação por vitamina D numa iguana verde	35
FIGURA 10. Geco leopardo com sinais clínicos de hiperparatiroidismo secundário nutricional	36
FIGURA 11. Iguana verde com hiperparatiroidismo secundário nutricional	37
FIGURA 12. Habitação “tipo” dos Gecos leopardo incluídos no estudo	44
FIGURA 13. Venopunção da veia jugular externa direita para recolha de sangue num Geco leopardo	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Distribuição das consultas por especialidade	15
GRÁFICO 2. Distribuição das cirurgias por área	15
GRÁFICO 3. Distribuição dos exames complementares de diagnóstico	16
GRÁFICO 4. Proporção entre as consultas de animais exóticos e animais de companhia	17
GRÁFICO 5. Distribuição das consultas de animais de companhia por especialidade ...	17
GRÁFICO 6. Animais exóticos consultados durante o estágio curricular	17
GRÁFICO 7. Distribuição dos exames complementares de diagnóstico	18

CASUÍSTICA E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

A presente dissertação foi elaborada no âmbito da disciplina de Estágio, com vista à conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

O estágio decorreu em duas instituições diferentes. A primeira parte do estágio foi realizada na área de clínica e cirurgia de animais de companhia no Hospital Veterinário de Gaia (HVG), entre 15 de outubro e 21 de dezembro, sob a orientação da Dra. Ana Guimarães. A segunda parte do estágio foi realizada nas áreas de clínica e cirurgia de animais de companhia e de exóticos na *All Pets* - Clínica Veterinária de Tires, entre 7 de janeiro e 29 de março, sob a orientação do Dr. Rui Patrício. As atividades desenvolvidas em cada um dos locais serão apresentadas individualmente.

Hospital Veterinário de Gaia

O HVG possui uma sala de espera/recepção, três consultórios, sendo um deles utilizado também como sala de ecografia, um laboratório de análises clínicas, uma sala de radiologia, duas salas de cirurgia, uma sala de preparação pré-cirúrgica, uma sala de tomografia computadorizada, uma sala de internamento para cães, uma sala de internamento para gatos, uma sala de internamento para cães com doenças infecto-contagiosas, uma sala de internamento para gatos com doenças infecto-contagiosas, uma farmácia, um escritório e uma biblioteca.

Durante o estágio neste hospital tive a oportunidade de assistir a consultas de diversas especialidades, acompanhar vários procedimentos cirúrgicos, auxiliar na realização dos diversos exames complementares necessários e acompanhar os animais que se encontravam internados.

Assim, assisti a um total de 167 consultas de diversas especialidades, tais como: consultas de medicina preventiva, urgências, gastroenterologia, dermatologia, acompanhamento pós-cirúrgico, neurologia, oncologia, ortopedia, nefrologia/urologia, pneumologia, oftalmologia, cardiologia e comportamento. Após cada consulta, o caso era discutido com o Médico Veterinário responsável e com outros estagiários presentes, debatendo os possíveis diagnósticos diferenciais, exames complementares de diagnóstico e tratamentos.

Na área de cirurgia acompanhei os casos, quer durante a cirurgia (assistindo e auxiliando sempre que necessário, como circulante ou ajudante de cirurgião), quer nos períodos pré e pós-cirúrgicos, tendo tido a oportunidade de assistir a um total de 32 cirurgias.

No decorrer das consultas e/ou do período de internamento tive a oportunidade de realizar ou auxiliar na realização de inúmeras análises sanguíneas (hemograma, análises

bioquímicas e ionogramas), citologias e exames complementares de diagnóstico de imagiologia (radiografia, ecografia, tomografia computadorizada e endoscopia), culminando num total de 174 exames complementares de diagnóstico.

No internamento tive a possibilidade de monitorizar animais em estado crítico, administrar medicações, colocar cateteres, recolher amostras sanguíneas para a realização de exames complementares, preparar animais para futuros procedimentos, desinfetar e lavar feridas, trocar pensos e, ainda, assistir e auxiliar em várias sessões de fisioterapia.

Nos seguintes gráficos está representada a frequência relativa das especialidades das consultas (Gráfico 1), a frequência relativa das diferentes áreas de cirurgia (Gráfico 2), e a frequência relativa dos exames complementares de diagnóstico realizados (Gráfico 3).

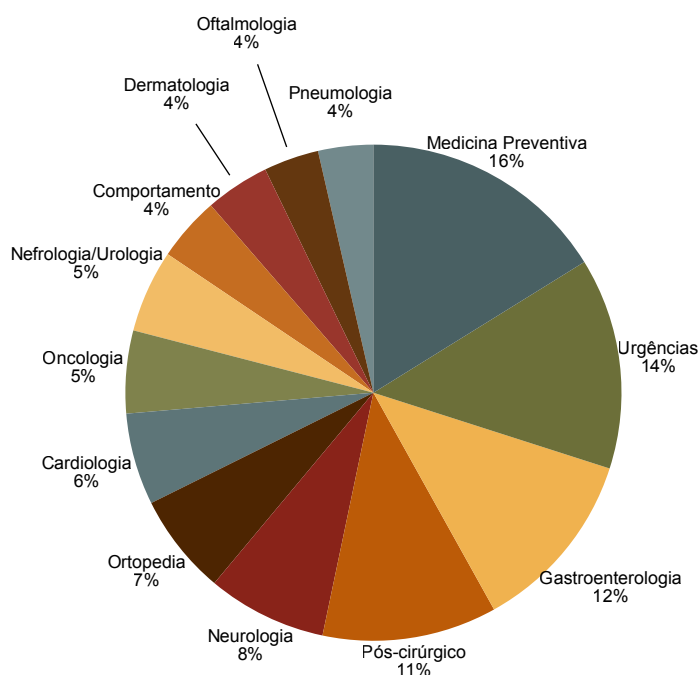


Gráfico 1. Distribuição das consultas por especialidade.

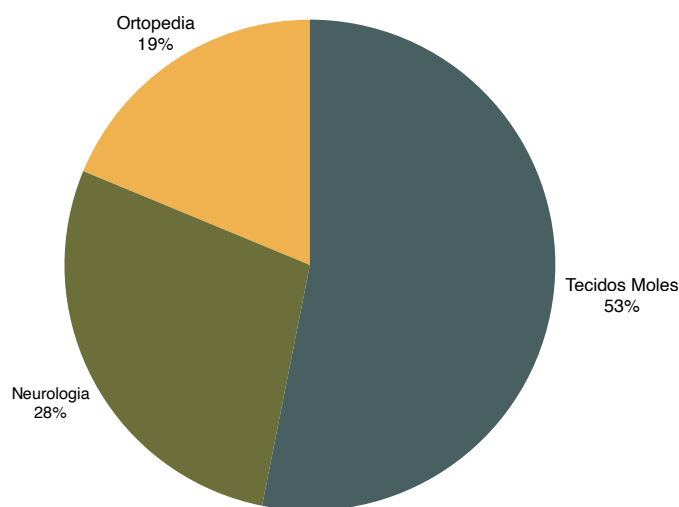


Gráfico 2. Distribuição das cirurgias por área.

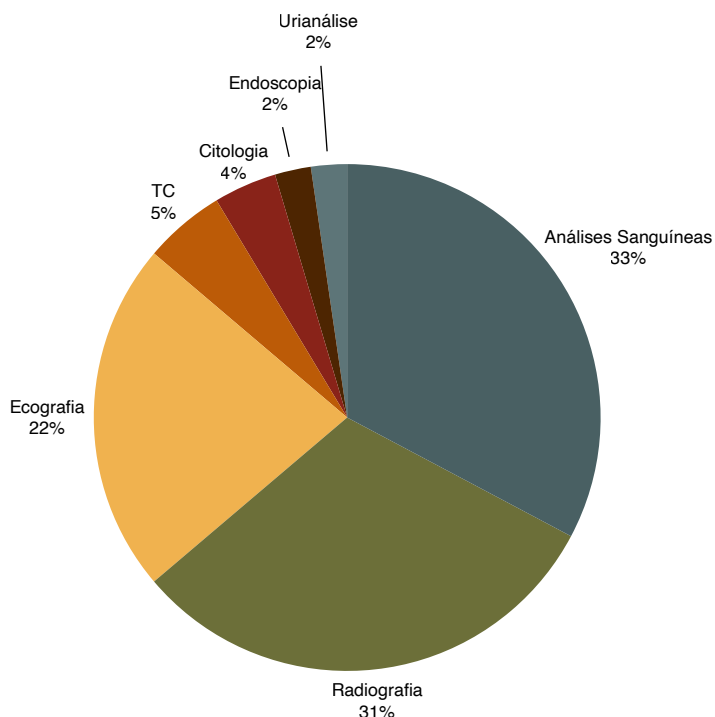


Gráfico 3. Distribuição dos exames complementares de diagnóstico.

All Pets - Clínica Veterinária de Tires

A *All Pets* - Clínica Veterinária de Tires possui uma sala de espera/recepção, dois consultórios, uma sala de radiologia, uma sala de cirurgia, uma sala de internamento mista, uma sala de internamento de doenças infecto-contagiosas e uma sala de banhos e tosquiadas.

À semelhança do primeiro estágio, na *All Pets* - Clínica Veterinária de Tires assisti a consultas de diversas áreas, acompanhei vários procedimentos cirúrgicos, auxiliei na realização de diversos exames complementares e acompanhei os animais que se encontravam internados.

Assim, assisti a um total de 136 consultas, incluindo: consultas de medicina de animais exóticos (mamíferos, aves e répteis) e de animais de companhia (medicina preventiva, ortopedia, gastroenterologia, urgências, oncologia, dermatologia, acompanhamento pós-cirúrgico, estomatologia, pneumologia, nefrologia/urologia e neurologia). Após cada consulta, o caso era discutido com o Médico Veterinário responsável, debatendo os possíveis diagnósticos diferenciais, exames complementares de diagnóstico e tratamentos. Os gráficos seguintes representam a proporção entre consultas de medicina de animais exóticos e consultas de animais de companhia (Gráfico 4), a frequência relativa de cada especialidade nas consultas de animais de companhia assistidas durante o estágio (Gráfico 5) e a frequência relativa dos animais exóticos nas consultas (Gráfico 6).

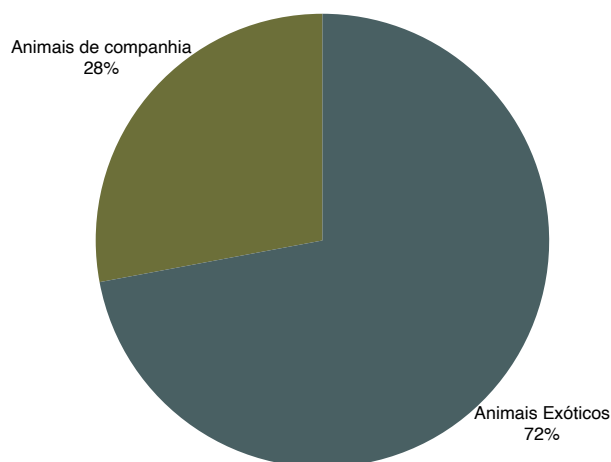


Gráfico 4. Proporção entre as consultas de animais exóticos e animais de companhia.

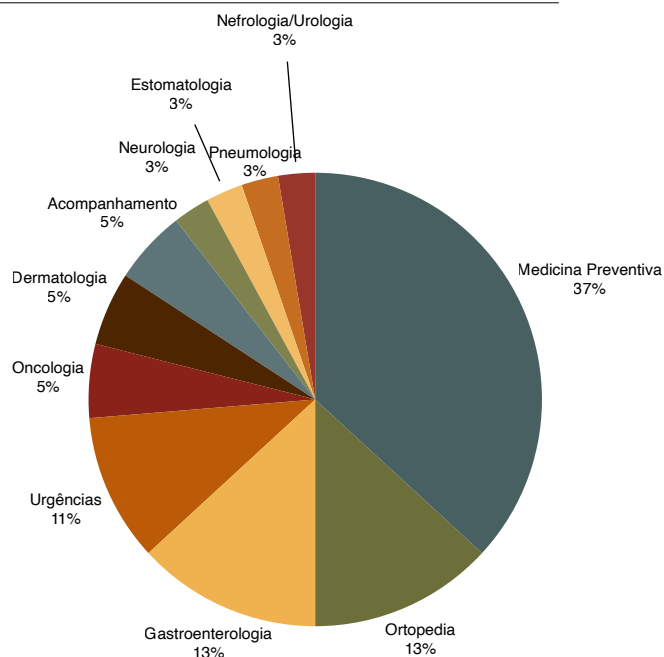


Gráfico 5. Distribuição das consultas de animais de companhia por especialidade.

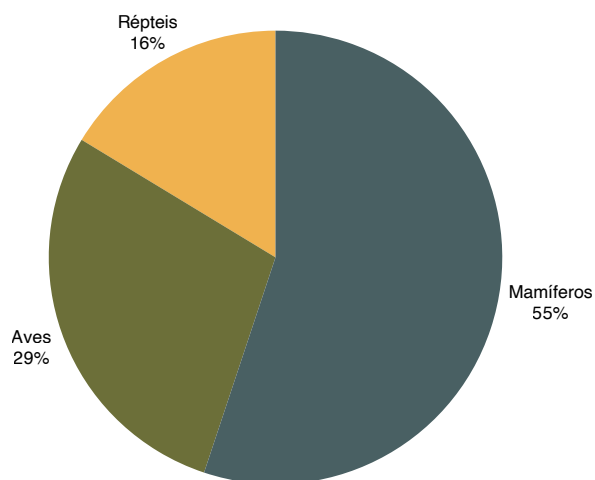


Gráfico 6. Animais exóticos consultados durante o estágio curricular.

No decorrer das consultas e/ou do período de internamento foi necessário realizar inúmeras análises sanguíneas e diversos exames radiográficos e coprológicos. Tive ainda a oportunidade de auxiliar na realização de uma ecocardiografia numa ave, e assistir a necropsias de várias espécies para recolha de material para análise. O seguinte gráfico representa a distribuição relativa de cada exame complementar realizado durante o estágio (n= 49) (Gráfico 7).

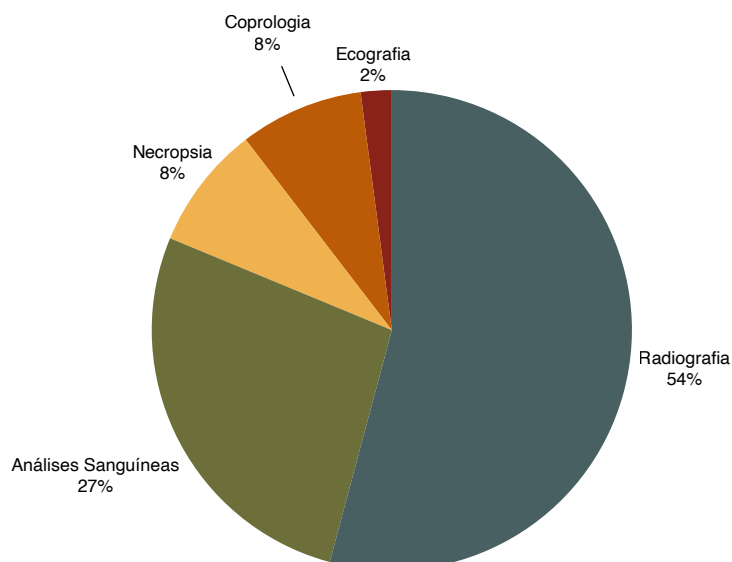


Gráfico 7. Distribuição dos exames complementares de diagnóstico.

Na área de cirurgia acompanhei os casos, quer durante a cirurgia (assistindo e auxiliando sempre que necessário como circulante ou ajudante de cirurgião), quer nos períodos pré e pós-cirúrgicos, tendo tido a oportunidade de participar em 14 cirurgias.

No internamento tive a possibilidade de monitorizar animais em estado crítico, administrar medicações, colocar cateteres, recolher amostras sanguíneas para a realização de exames complementares de diagnóstico e preparar animais para futuros procedimentos.

Para além disto, no âmbito do estágio realizado, tive a oportunidade de aprofundar diversos temas e de elaborar uma comunicação científica sob a forma de um poster, que foi aceite e integrado no 9º Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários (9º EFOMV) com o tema: “Coronavirus Sistémico em Furões - Uma Doença Emergente Que Chega a Portugal”.

Este período de estágio permitiu-me não só consolidar e aprofundar os conhecimentos e as competências adquiridos ao longo do meu percurso académico, mas também ganhar novos conhecimentos e ferramentas importantes para o meu futuro, quer a nível profissional, quer a nível pessoal.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Geco leopardo

A espécie *Eublepharis macularius* foi descrita pela primeira vez em 1854 por Edward Blyth, um herpetologista britânico (Khan, 2009). O género *Eublepharis*, que foi descrito pela primeira vez em 1827 pelo zoologista britânico John Edward Gray, resulta da combinação das palavras “eu”, que significa “bom” ou “verdadeiro”, e “blephar”, que significa “pálpebra”, sendo que a principal característica deste género é o facto de possuírem pálpebras móveis. A palavra “macularius” significa “manchado” (Mirza *et al.*, 2014; de Vosjoli *et al.*, 2017).

Comummente conhecido como Geco leopardo, é uma das espécies de lagartos mais populares como animal de estimação, principalmente devido ao seu temperamento dócil, à facilidade de manutenção e reprodução em cativeiro, à sua elevada longevidade e tamanho reduzido, e devido à sua beleza e diversidade de colorações e padrões (de Vosjoli *et al.*, 2017). Existem vários registos destes animais em cativeiro com mais de 20 anos, sendo que a idade máxima registada nesta espécie é de 28 anos e seis meses, no Zoo de St. Louis (Shifter, 1988; Slavens, 1999).

Do ponto de vista científico é uma espécie com grande interesse e muito estudada devido à sua capacidade de regeneração (McLean *et al.*, 2011; Delorme *et al.*, 2012; Peacock *et al.*, 2015; Nakashima, 2016; McDonald *et al.*, 2018) e à sua determinação e comportamento sexual termo-dependentes (Flores *et al.*, 1993; Viets *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 1995; Rhen *et al.*, 2000; Putz *et al.*, 2005; Pokorná *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014).

1.1.1. Taxonomia

A espécie *Eublepharis macularius*, com base no enquadramento taxonómico atualmente aceite, pertence ao Filo *Chordata*, Sub-filo *Vertebrata*, Classe *Reptilia*, Ordem *Squamata*, Subordem *Sauria*, Família *Gekkonidae*, Subfamília *Eublepharinae*, Género *Eublepharis* e Espécie *Eublepharis macularius* (Khan, 2009).

Nascem com cerca de 8 cm de comprimento e na fase adulta o seu comprimento varia entre 20 e 25 cm e pesam entre 45 e 60 g. Geralmente os machos são maiores, quando comparados com as fêmeas e apresentam 9 a 14 poros pré-cloacais organizados em forma de arco e duas protuberâncias na base da cauda. A coloração selvagem varia de amarelo palha a tons mais rosados com pintas negras (Figura 1). No entanto, devido à sua grande popularidade e às seleções e cruzamentos feitos por criadores, existem mais de 160

mutações e combinações de diversas cores, padrões e tamanhos (Figura 2) (Kratochvíl & Frynta, 2002; Khan, 2009; de Vosjoli *et al.*, 2017).



Figura 1. Geco leopardo com coloração selvagem. Em *Leopard Gecko Care Sheet*. Retirado a 9 de julho de 2020 de <https://www.reptilesmagazine.com/leopard-gecko-care-sheet/pic/75994/>.



Figura 2. Exemplos de colorações em Gecos leopardo. À esquerda um Geco leopardo *super raptor*, À direita um Geco leopardo *tremper albino*. Fotografias gentilmente cedidas por Gonçalo Fernandes.

1.1.2. Habitat

O seu habitat natural distribui-se pelo Paquistão, Irão, Afeganistão, Índia e Nepal (Figura 3) (Khan, 2009; Rawat *et al.*, 2019). Em áreas urbanizadas, colonizam buracos e rachas em estruturas antrópicas como paredes, estradas, pontes e, principalmente, espaços próximos de canalização subterrânea que proporcionam a humidade e abrigo necessários (Khan, 2009). Habitam, também, zonas rurais rochosas com arbustos e abrigam-se em buracos e rachas no solo, rochas e pedras (Figura 4). Evitam desertos e preferem locais húmidos. São animais noturnos e a grande maioria abandona os abrigos ao anoitecer e procuram alimento sozinhos, regressando ao abrigo antes de amanhecer (Khan, 2009).

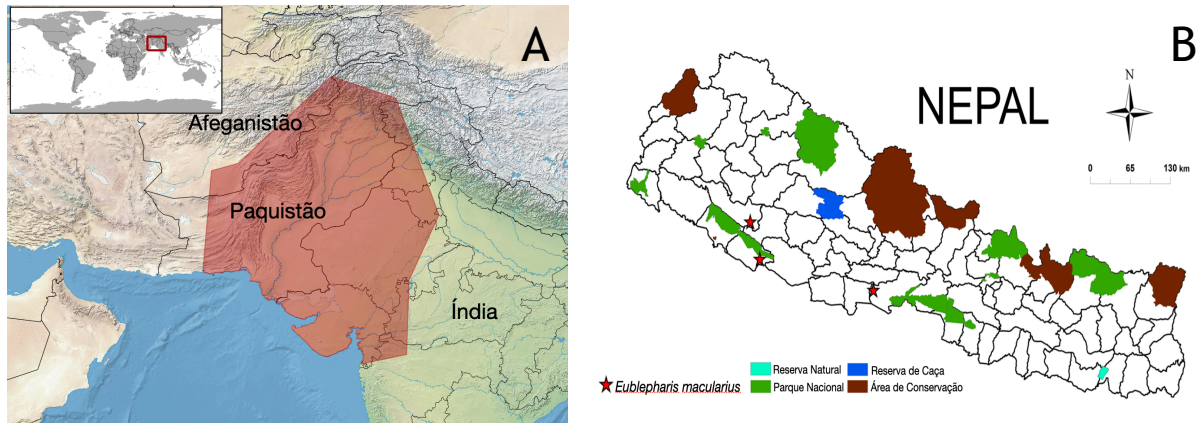


Figura 3. Distribuição natural do Geco leopardo. A) Distribuição natural do habitat do Geco leopardo na Índia, Afeganistão e Paquistão. Em *Common Leopard Gecko*. Retirado a 9 de julho de 2020 de <http://animalia.bio/common-leopard-gecko>. B) Distribuição do Geco leopardo no Nepal. Adaptado de Rawat, 2019.

No seu habitat natural, no Paquistão, as temperaturas variam entre 22-24°C em março e 40-45°C em junho e julho, e a humidade relativa varia entre 30-40%. Durante a época de monções, as temperaturas baixam para os 28-33°C e a humidade sobe para 70-80%. Entre março e junho a humidade nos abrigos mantém-se entre 40 e 56%, sendo o ideal para estes animais (Khan, 2009).

Nas zonas mais frias, os Gecos leopardo hibernam de setembro a março, enquanto que nas zonas mais quentes a hibernação pode ser adiada para novembro ou pode mesmo não acontecer (Khan, 2009).



Figura 4. Habitat natural do Geco leopardo em Kirana Hills, Sargodha, Punjab, Pakistan. Khan, 2009.

1.1.3. Organização social e reprodução

As colónias de Gecos, antes destes atingirem a maturidade sexual (colónia pré-reprodutora), são constituídas por vários machos e fêmeas jovens. No entanto, ao atingirem

a maturidade sexual, tornam-se agressivos e territoriais, levando à dispersão dos machos, ficando apenas o mais dominante com várias fêmeas (colônia reprodutora). A época reprodutiva estende-se desde março a julho e, geralmente, as fêmeas põem dois ovos por ninhada (Khan, 2009). A determinação sexual desta espécie é termo-dependente. Assim, quando a incubação ocorre em temperaturas mais baixas (26 a 30°C) e mais elevadas (34 a 35°C) nascem exclusiva ou majoritariamente fêmeas, e em temperaturas intermédias (31 a 33°C) nascem majoritariamente machos. O período de incubação é inversamente proporcional à temperatura de incubação, entre os 26°C e os 32.5°C, variando entre 36 e 72 dias (Viets *et al.*, 1993).

1.1.4. Alimentação

Os Gecos leopardo são principalmente insetívoros, alimentando-se de escaravelhos e gafanhotos e, também, de aranhas, escorpiões e centopeias. Quando envelhecem tornam-se predadores oportunistas e atacam também Gecos mais pequenos, algumas cobras, ratos recém-nascidos e ninhos de pássaros (Khan, 2009). Está descrito um caso de canibalismo em animais jovens (cerca de 2-3 meses) mantidos em cativeiro (Bonke *et al.*, 2011).

1.1.5. Ameaças na Natureza

No seu habitat natural, o Geco leopardo é predado por diversos animais selvagens, como raposas, chacais, mangustos, corujas, milhafres, varanídeos e outros lagartos, e a maioria das cobras presentes nas mesmas áreas (Khan, 2009). Para além destes predadores, e apesar de ser um dos répteis de estimação mais populares em todo o mundo, nalgumas zonas do seu habitat natural, as populações locais consideram esta espécie um animal venenoso. Estas populações acreditam que está relacionado com as serpentes *Naja naja karachiensis* e que a sua mordedura liquidifica o corpo da vítima, causando morte instantânea. Por esta razão, muitos nativos dessas populações matam os Gecos quando os avistam (Khan, 2009). Atualmente não existe informação disponível acerca do estado de conservação desta espécie no seu habitat natural (IUCN Red List, 2020).

1.1.6. Cativeiro

De acordo com Wright (2011), citado por Boyer (2013), o Geco leopardo é a segunda espécie de répteis mais comum na prática veterinária (13% dos casos de répteis). A maioria dos casos resulta de condições inadequadas em cativeiro. Algumas das patologias mais comuns são patologias nutricionais (hiperparatiroidismo nutricional, hipovitaminose A),

patologias associadas a deficiências na muda da pele (disecdise), patologias do trato gastrointestinal (obstruções gastrointestinais e outras patologias no sistema gastrointestinal, muitas vezes associadas a criptosporidiose), patologias do aparelho reprodutor, traumatismos (incluindo a autotomia da cauda), patologias oculares e abscessos subcutâneos (Boyer, 2013; Miles, 2017).

Quando mantidos em cativeiro, e sendo animais terrestres, o terrário deverá ser horizontal e ter o maior tamanho possível. No entanto, as dimensões mínimas aceitáveis de um terrário para manter um espécime são de cerca de 38 litros, sendo que o comprimento do terrário deve ser de pelo menos o dobro do comprimento do animal e a largura, no mínimo, igual ao comprimento do animal (Bartlett, 1995; Wilkinson, 2015; deVosjoli, 2017).

Como substrato podem utilizar-se diversos materiais artificiais ou naturais. Os substratos artificiais, como papel de cozinha ou folhas de jornal, são vantajosos, devido ao baixo preço e fácil limpeza, não sendo, no entanto, esteticamente tão apelativos como os substratos naturais. Caso se opte por substratos naturais é preciso ter em atenção o risco de impactação intestinal e escolher substratos não particulados ou que sejam facilmente digeríveis (Wilkinson, 2015; de Vosjoli *et al.*, 2017).

Os Gecos leopardo têm uma temperatura corporal ideal média de $28,2 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$, aumentando significativamente ao longo do dia (Angilletta *et al.*, 1999). No terrário deve ser mantido um gradiente térmico, de forma a permitir aos animais uma termorregulação comportamental, otimizando o metabolismo e estimulando o crescimento (Autumn, 2014). Assim, deve-se proporcionar ao animal uma área do terrário com uma temperatura ente 29°C e 33°C e uma zona mais fria a cerca de 24°C . Durante a noite a temperatura pode baixar até aos 18° , desde que se mantenha um ponto quente no terrário. Isto pode ser feito, por exemplo, com a colocação de um tapete de aquecimento debaixo do terrário, que ocupe 25 a 35% da sua área (de Vosjoli *et al.*, 2017).

Também é importante conservar um gradiente de humidade relativa adequado, de forma a facilitar a ecdise ou a ovopostura, e prevenir a desidratação crónica. O método mais frequentemente utilizado consiste em colocar um substrato que tenha a capacidade de manter a humidade (por exemplo um substrato de musgo *Sphagnum*) numa caixa de plástico e fazer uma abertura na tampa da mesma para que os animais possam entrar e sair (Rossi, capítulo 4 de um livro).

A alimentação deve ser à base de insetos ou outros invertebrados vivos, uma vez que proporciona aos animais um importante enriquecimento ambiental e pode prolongar o período de alimentação. No entanto, a maioria dos alimentos disponíveis no mercado são nutricionalmente desequilibrados se não forem suplementados de uma forma apropriada. Por exemplo, insetos em fase larvar apresentam, geralmente, uma quantidade de gordura desproporcionalmente superior às quantidades dos restantes nutrientes, a maioria dos insetos são fontes pobres de cálcio e, os anelídeos, apesar de terem menos gordura e valores de cálcio elevados, têm os conteúdos nutricionais muito variáveis, dependendo da

composição do substrato onde são mantidos. A prática comum de pulverizar ou mergulhar os insetos em suplementos de cálcio pode providenciar níveis de cálcio inconstantes ou insuficientes, pode alterar a palatabilidade dos mesmos e, caso o insecto não seja consumido de imediato, podem perder parte ou a totalidade do suplemento (Bernard *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2009).

Para combater este problema, já existem dietas comerciais ricas em cálcio próprias para grilos e que podem ser utilizadas para alimentar outros insetos. Para além disto, podem-se adicionar suplementos de cálcio como o carbonato de cálcio à alimentação dos insectos, de forma a aumentar o seu teor de cálcio (Zwart *et al.*, 1979; Strzelewicz *et al.*, 1985; Allen *et al.*, 1989; Finke, 2013).

1.2. Radiação ultravioleta

A luz é parte do espectro electromagnético, que também inclui os raios gama, os raios x, a radiação ultravioleta (UV), a radiação infra-vermelha, as microondas e as ondas rádio (Figura 5) (Baines *et al.*, 2016).

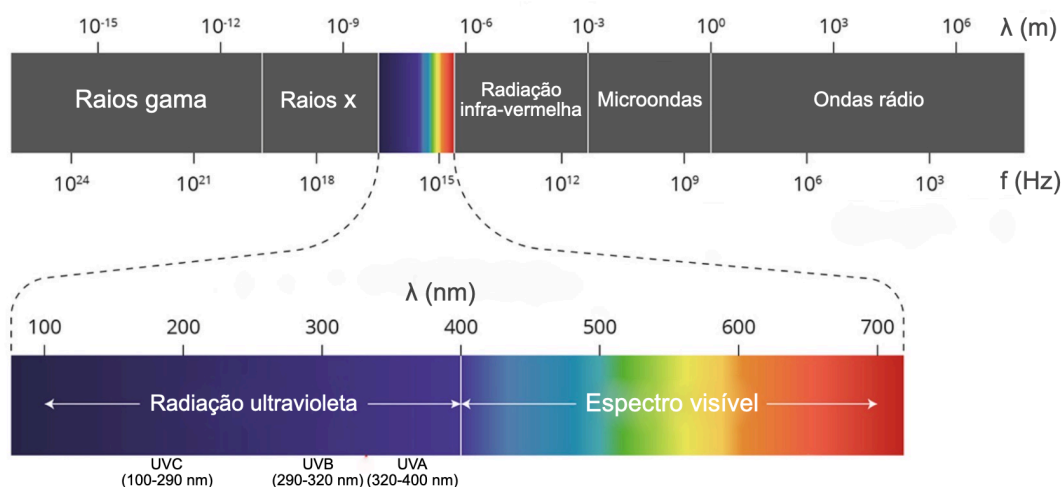


Figura 5. Espectro electromagnético. λ corresponde ao comprimento de onda; f corresponde à frequência. Em *Understanding the Electromagnetic Spectrum*. Retirado a 9 de julho de 2020 de <https://www.clinuvel.com/photomedicine/physics-optics-skin/electromagnetic-spectrum/understanding-the-electromagnetic-spectrum>.

A radiação UV é um componente natural da luz solar que se subdivide em três grupos, consoante o seu comprimento de onda. A porção da radiação UV com menor comprimento de onda (100-290 nm) é a radiação UVC, a porção com um comprimento de onda intermédio (290-320 nm) tem o nome de radiação UVB, e à porção da radiação UV com maior comprimento de onda (320-400 nm) dá-se o nome de radiação UVA (Adkins *et al.*, 2003; Baines *et al.*, 2016).

Parte da radiação UVA pertence ao espectro visível de diversas espécies animais, incluindo aves, roedores, répteis e anfíbios. Estes animais utilizam esta radiação para

reconhecerem outros animais da mesma espécie e distinguirem o seu sexo, e na busca de alimento (Honkavaara *et al.*, 2002). A radiação UVB, permite a conversão do 7-deidrocolesterol presente na pele em pré-vitamina D3 que, por ação térmica, é convertido em colecalciferol (vitamina D3) (Baines *et al.*, 2016). A pré-vitamina D3 produzida em excesso é convertida em fotoprodutos inertes, lumisterol e taquisterol, por ação da radiação UVB e da radiação UVA de baixo comprimento de onda, isto é, pela radiação UV com comprimento de onda entre 290 e 335 nm. Este é um processo autolimitante que previne a produção excessiva de vitamina D3 (MacLaughlin *et al.*, 1982, Webb *et al.*, 1989). A radiação UVC, que é normalmente filtrada na sua totalidade pela atmosfera, causa danos celulares e, por isso, não é necessária nem deve ser adicionada como fonte artificial de radiação (Adkins *et al.*, 2003).

1.2.1 Transmissão da radiação ultravioleta

A pele atua como barreira entre o organismo e o ambiente, protegendo-o da abrasão mecânica, de microorganismos, da perda de água e da radiação UV. A pele dos répteis, tal como a pele de muitos outros vertebrados, apresenta duas camadas principais: a epiderme e a derme (Subramaniam *et al.*, 2018).

A epiderme constitui a camada mais superficial da pele. Esta é uma camada avascular, pelo que a nutrição e oxigenação das suas células é feita pelos vasos sanguíneos localizados junto à superfície da derme. A epiderme é constituída por um epitélio estratificado queratinizado e nos répteis da ordem *Squamata*, na qual se inclui o Geco leopardo, está dividida em várias sub-camadas: camada *Oberhautchen*, camada β -queratina, camada α -queratina, zona intermédia e estrato germinativo (estrato basal). A combinação das camadas *Oberhautchen*, β -queratina e α -queratina constitui o estrato córneo (Figura 6) (Subramaniam *et al.*, 2018).

A camada de *Oberhautchen* é a camada mais superficial e mais dura da epiderme, e é constituída por células mortas, achatadas e anucleadas com o citoplasma rico em queratina. As camadas α e β -queratina são constituídas por células em queratinização, através da produção de dois tipos de queratina: queratina α que é flexível, e queratina β que é forte e dura, e existe unicamente nos répteis. Desta forma, estas camadas transformam-se numa camada dura e protetora. A epiderme encontra-se em constante renovação, com as células do estrato germinativo como células progenitoras. Após a proliferação, os novos queratinócitos migram pela zona intermédia, até atingir o estrato córneo totalmente diferenciados. Com o tempo, estes queratinócitos descamam e serão substituídos pela nova geração de queratinócitos (Maderson *et al.*, 1998; O'Malley, 2005; Subramaniam *et al.*, 2018). A melanina, que é o pigmento responsável pela coloração castanha, é encontrada nas células epidérmicas e absorve eficazmente a radiação UV com comprimento de onda entre 200 e 700 nm, onde está incluída a radiação UVB responsável pela produção cutânea

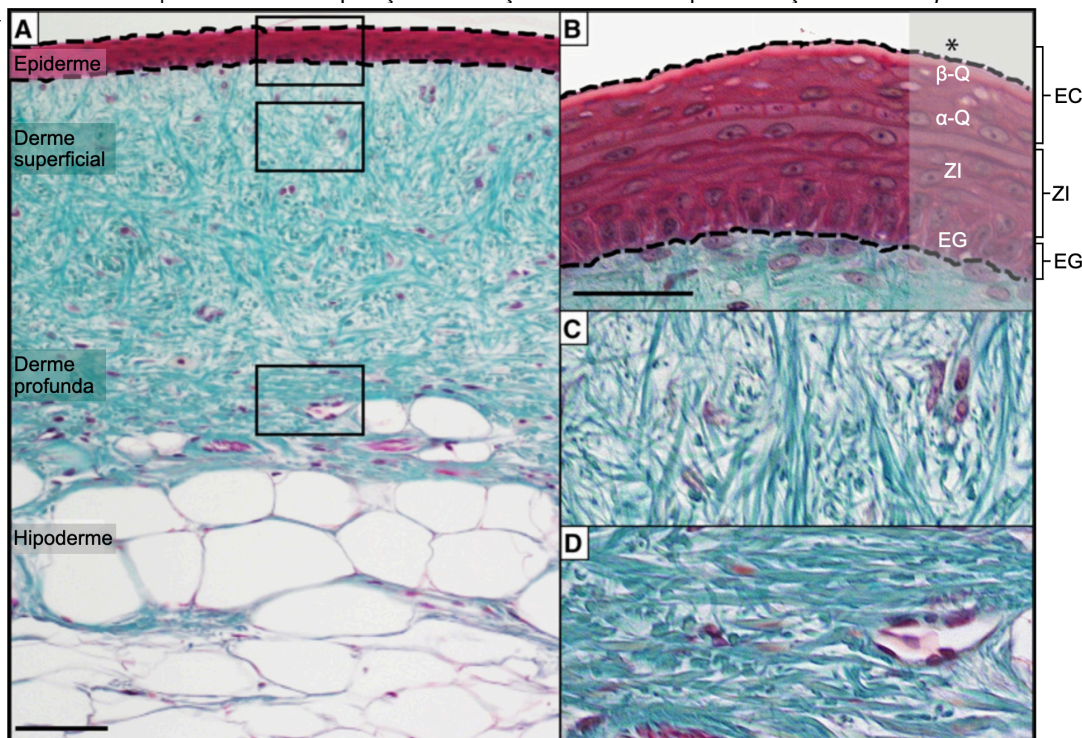


Figura 6. Anatomia da pele do Geco. (A) A pele está organizada em duas camadas principais: a epiderme e a derme. (B) A epiderme consiste num epitélio estratificado queratinizado. As camadas mais superficiais formam o estrato córneo (EC), que inclui a camada *Oberhäutchen* (*), a camada β -queratina (β -Q) e a camada α -queratina (α -Q). A camada *Oberhäutchen* e a camada β -queratina perdem-se, frequentemente, durante a preparação histológica. Profunda ao EC fica a zona intermédia (ZI) e o estrato germinativo (EG). A derme pode ser dividida em (C) derme superficial e (D) derme profunda. Coloração tricrômica de Masson. Barra de escala = 10 μ m. (Adaptado de Subramaniam, 2018).

de vitamina D3 (Jablonski *et al.*, 2000). Assim, a quantidade de melanina presente na epiderme determinará a quantidade de radiação que atinge as camadas mais profundas da pele (O'Malley, 2005; Baines *et al.*, 2006; Rutland *et al.*, 2019). É na membrana das células mais profundas da epiderme que, pela incidência de radiação UV, o 7-deidrocolesterol é convertido em pré-vitamina D3 (Holick, 2004; Junqueira & Carneiro, 2013). A radiação UV antes de chegar a estas células tem de atravessar as camadas mais superficiais da epiderme. Pessoas com um tom de pele mais escuro, derivado da existência de uma maior quantidade de melanina na pele, têm uma capacidade inferior de produzir vitamina D3 e, por isso, possuem um risco superior de insuficiência desta vitamina (Chen *et al.*, 2007).

A epiderme dos répteis varia muito de espécie para espécie quer em espessura, quer em pigmentação. A observação microscópica da pele de uma iguana verde (*Iguana iguana*), por exemplo, mostrou que esta apresenta um nível de queratinização bastante superior, quando comparada com a pele de Gecos leopardo. Para além disto, a primeira espécie apresenta a camada β -queratina mais pronunciada e muito poucos melanócitos. Esta camada maior de queratina impede a transmissão de radiação através da epiderme e, consequentemente, quando comparada a percentagem de radiação UV que atravessa a pele das duas espécies, a pele do Geco leopardo deixa passar cerca de quatro vezes mais radiação do que a pele da iguana verde. A pele de espécies de lagartos que no seu habitat estão expostos a intensidades superiores de radiação mostra uma tendência para bloquear

mais radiação, quando comparada com a pele de espécies noturnas, crepusculares ou de zonas com menor intensidade de radiação (Baines *et al.*, 2006; Rutland *et al.*, 2019).

A derme é a camada mais profunda da pele, constituída por tecido conjuntivo denso, que inclui: adipócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, células inflamatórias e dois tipos de células de pigmentação: xantóforos (pigmento amarelo) e melanóforos (pigmento preto) (O'Malley, 2005; Szydlowski *et al.*, 2015; Rutland *et al.*, 2019).

A estação do ano é um fator importante na transmissão de radiação útil para a produção de vitamina D3. Um estudo realizado em humanos demonstrou que, durante os meses de junho e julho, a eficiência da produção de vitamina D3 atingiu o seu pico, diminuindo gradualmente após agosto, até cessar quase por completo entre novembro e março (Webb *et al.*, 1988). A latitude é outro fator a ter em conta, uma vez que esta influencia o ângulo de *Zenith* e, consequentemente, a intensidade e o período de exposição à radiação solar. Em locais mais próximos dos polos, a produção de vitamina D3 chega a cessar durante seis meses do ano, enquanto que em locais mais próximos do equador a sua síntese ocorre ininterruptamente durante todo o ano (Wacker & Holick, 2013a; Holick, 2018). Nos animais em cativeiro, é importante ter em conta que o vidro, o acrílico ou plástico absorvem toda a radiação UVB e, por isso, a exposição da pele à radiação (natural ou artificial) através de um destes materiais não resulta na síntese de vitamina D3 (Burger *et al.*, 2007; Holick, 2018).

1.2.2. Benefícios da radiação ultravioleta

A exposição à radiação UV aporta diversas vantagens para o organismo (Juzeniene *et al.*, 2012). A exposição a esta radiação resulta na ativação da p53 que, por sua vez, regula a expressão do gene que codifica a pró-opiomelanocortina. Esta é um precursor polipeptídico, cuja clivagem origina diversos produtos bioativos, entre eles, a hormona estimulante dos melanócitos- α (α -MSH) e a β -endorfina (Oren *et al.*, 2007; Juzeniene *et al.*, 2012). A α -MSH é responsável pela ativação da produção de melanina, que absorve eficazmente a radiação UV, protegendo a pele de futuras exposições a esta radiação (Catania *et al.*, 2010). A β -endorfina, que é o neurotransmissor endógeno mais abundante no sangue, tem efeitos analgésicos e produz uma sensação de bem-estar (Bernard *et al.*, 1991; Juzeniene *et al.*, 2012; Fell *et al.*, 2014; Veleva *et al.*, 2018). Para além disto, a radiação UV também promove a hiperqueratose, conferindo, assim, uma maior proteção (Bulat *et al.*, 2011).

A radiação UV pode, também, ser utilizada no tratamento e alívio de sintomas de algumas doenças. A helioterapia (tratamento com a utilização da luz solar) já era usada nos tempos da antiga Grécia, Egito e Roma no tratamento de diversas patologias cutâneas (Roelandts *et al.*, 2002). Existem evidências que sugerem que a exposição à radiação UV pode diminuir a dor, a curto prazo, em pacientes com fibromialgia (Taylor *et al.*, 2009).

Atualmente, a radiação UV pode ser utilizada no tratamento de sinais clínicos de diversas patologias auto-imunes com manifestações cutâneas, como psoríase (Zhang *et al.*, 2017), dermatite atópica (Ortiz-Salvador *et al.*, 2017), alopecia (Darwin *et al.*, 2017), esclerodermia (Hassani *et al.*, 2016; Narbutt *et al.*, 2017; Furuhashi *et al.*, 2020) e vitiligo (Rashighi *et al.*, 2017; Shah *et al.*, 2020), ou de outras doenças como a micose fungoide (De Luca *et al.*, 2018) ou o acne (Feily *et al.*, 2014). Estes efeitos benéficos podem dever-se ao facto da exposição da pele à radiação provocar efeitos imunossupressores locais e sistémicos, alterações na expressão da citoquina (estimulando a sua produção), a interrupção do ciclo celular (inibindo a proliferação celular), regular e estimular a apoptose celular, e pode reduzir o número de linfócitos T, células de Langerhans e mastocitomas na pele (Bulat *et al.*, 2011).

A radiação UV é um importante regulador comportamental. O acesso a este tipo de radiação é importante para estimular o comportamento natural de muitas espécies em cativeiro (Honkavaara *et al.*, 2002). Diversas espécies regulam o período de exposição à radiação consoante as suas necessidades fisiológicas (Manning *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 2003; Karsten *et al.*, 2009; Oonincx *et al.*, 2010).

Para além dos benefícios enumerados, a produção de vitamina D3 constitui o principal benefício da exposição à radiação UV em muitas espécies. A pele da maioria dos vertebrados contém um precursor da vitamina D3, o 7-deidrocolesterol, que, quando exposto à radiação UVB, é convertido em pré-vitamina D3, que é posteriormente convertido em vitamina D3, através de um processo termo-dependente.

1.2.3. Efeitos adversos da radiação ultravioleta

Quando a exposição à radiação UV é excessiva, podem surgir diversos efeitos adversos, principalmente nos olhos e na pele, tanto em casos de exposição aguda como de exposição a longo prazo (Hathaway *et al.*, 2016).

Nos humanos, as principais consequências da exposição a longo prazo na pele incluem a queratose actínica, o melanoma e outros tipos de cancros da pele. Já nos olhos, os efeitos mais comuns são o desenvolvimento de pterígio, cataratas e degeneração macular (Zhang *et al.*, 2012; Lofgren *et al.*, 2016; Modonese *et al.*, 2018; Saucedo *et al.*, 2020). Nos animais, existem relatos de fotodermatite e queratoconjuntivite em pitões-reais e apenas fotodermatite em lagartos-de-língua-azul, devido à utilização, a longo prazo, de uma lâmpada UV com intensidade excessiva. Outros répteis expostos a radiação com as mesmas características apresentaram patologias idênticas: um geco-de-crista (*Rhacodactylus ciliatus*), uma pitão-birmanesa albina (*Python molurus bivittatus*), uma boa arborícola do género *Candoia*, um dragão barbudo (*Pogona vitticeps*), uma cobra da espécie *Lampropeltis triangulum hondurensis*, e duas boas-da-areia-do-quenia (*Érix colubrinus colubrinus*) (Gardiner *et al.*, 2009). Um estudo realizado em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) relatou diversos efeitos adversos após a exposição a radiação UV

de diferentes intensidades. Nas intensidades mais baixas, foram observados efeitos como a perda de peso, o aumento da concentração de corticosterona no sangue e eritema cutâneo. Nas intensidades de radiação mais elevadas, os animais desenvolveram fotoqueratite da córnea (Lupu *et al.*, 2013).

Tal como nos humanos, as neoplasias cutâneas dos répteis em cativeiro podem estar relacionados com a exposição à radiação UV. É possível que exista uma relação entre a exposição à radiação e a incidência de carcinomas das células escamosas e neoplasias das células-pigmento. Um estudo com 69 répteis sugeriu que as espécies heliofílicas têm uma maior incidência deste tipo de neoplasias, quando comparadas com as espécies noturnas. Os mesmos autores concluíram, noutro estudo, que cerca de 60% dos animais com neoplasias das células-pigmento tinham acesso a radiação UV artificial. No entanto, os resultados não são conclusivos e é necessário realizar mais estudos para compreender esta relação nos répteis (Heckers *et al.*, 2012; Heckers *et al.*, 2014).

1.3. Vitamina D e cálcio

No final do século XIX, após a revolução industrial, ocorreu um surto de uma doença caracterizada por deformações esqueléticas em crianças, conhecida por raquitismo. Sir Edward Mellanby, na tentativa de responder a este novo surto, utilizou, com sucesso, óleo de fígado de bacalhau e as propriedades anti-raquíticas desta substância foram, inicialmente, atribuídas à vitamina A (DeLuca *et al.*, 2018). A vitamina D foi descoberta em 1922 por Elmer McCollum. Após destruir a vitamina A presente no óleo de fígado de bacalhau, McCollum observou que este mantinha a sua capacidade de curar o raquitismo e concluiu que as propriedades terapêuticas do óleo de fígado de bacalhau não se deviam à vitamina A, mas sim a outra substância a que chamou vitamina D (McCollum *et al.*, 1922). Mais tarde, em 1925, Steenbock descobriu que a radiação UV tinha a capacidade de ativar uma substância inativa, dando origem à vitamina D (Steenbock *et al.*, 1925).

1.3.1. Aquisição de vitamina D

A vitamina D pode ser adquirida de duas maneiras: através da alimentação e posterior absorção no trato gastrointestinal ou através da síntese na pele após exposição à radiação UVB (Hosseini-Nezhad & Holick, 2013). Na natureza, a vitamina D está disponível como ergocalciferol (vitamina D₂), cujo precursor é o ergosterol (pró-vitamina D₂), ou como colecalciferol (vitamina D₃), cujo precursor é o 7-deidrocolesterol (7-DHC) (pró-vitamina D₃) (Chen *et al.*, 2010; Polzonetti *et al.*, 2020). A diferença entre os dois precursores deve-se à presença de um grupo metil extra no carbono 24 do ergosterol (Figura 7) (Chen *et al.*, 2010; Engelking, 2015). Apesar da maioria dos autores considerar que o ergocalciferol

(vitamina D2) é encontrado principalmente em plantas e fungos e o colecalciferol (vitamina D3) é encontrado em produtos de origem animal (Chen *et al.*, 2016; Polzonetti *et al.*, 2020), não existe um consenso, sendo que alguns autores consideram que o ergocalciferol é encontrado apenas em fungos, enquanto que o colecalciferol é encontrado tanto em animais como em plantas, ainda que em pequenas quantidades (Wacker & Holick, 2013b; Göring *et al.*, 2018).

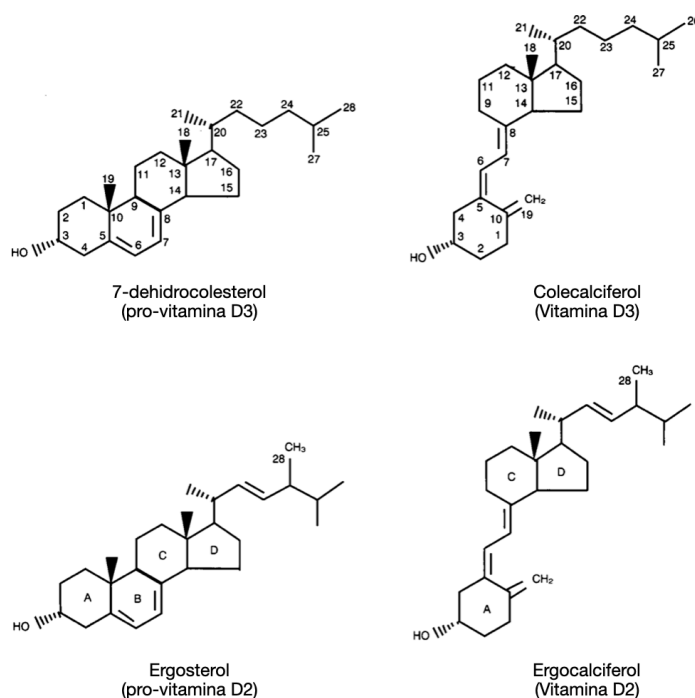


Figura 7. Estrutura química da vitamina D2 e vitamina D3 e dos respectivos precursores, ergosterol e 7-deidrocolesterol (Adaptado de Chen, 2010).

A vitamina D3 pode ser obtida através da ingestão de alimentos que contenham naturalmente esta vitamina (óleo de fígado de bacalhau, peixes gordos, como o salmão e o atum), de cogumelos ou plantas expostos à radiação UV, de alimentos fortificados com vitamina D ou através de suplementos alimentares (Hosseini-Nezhad & Holick, 2013). Alternativamente, a vitamina D3 pode ser sintetizada na pele, através da exposição à radiação UVB. A pele da maioria dos vertebrados contém, nas membranas das células mais profundas da epiderme, o precursor da vitamina D3 - o 7-DHC (Holick *et al.*, 2014). Assim, quando a pele é exposta à radiação com o comprimento de onda entre 290 e 320 nm, ou seja, à radiação UVB, o 7-DHC é convertido em pré-vitamina D3 (Bunker *et al.*, 1940; Chen *et al.*, 2010; Watson, 2014). A energia dos fótons, ao incidir no 7-DHC, causa uma rutura na ligação entre o carbono 9 e o carbono 10 da molécula e uma isomerização do 5,7-dieno, formando a pré-vitamina D3. Esta molécula é instável e sofre, rapidamente, uma rotação sobre a ligação entre o carbono 5 e o carbono 6 e um rearranjo nos seus átomos de hidrogénio, através de um processo termo-dependente, dando origem à vitamina D3 ou

colecalfiferol (Holick *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2010; Holick, 2018). Após ser produzida na pele, a vitamina D3 é transportada para o fígado onde sofre uma hidroxilação no carbono 25, mediada pela enzima 25-hidroxilase. O 25-hidroxicolecalciferol, 25-hidroxivitamina D3 ou calcidiol (25(OH)D3) é o metabolito da vitamina D mais abundante no sangue e não é biologicamente ativo, no entanto, tem um papel muito importante como forma de reserva desta vitamina. Para além da presença no sangue, este é armazenado em diversos locais como o fígado, o tecido adiposo e o tecido muscular esquelético (Dahlback *et al.*, 1988; Cline, 2012; Holick, 2014; Jones *et al.*, 2018). Para que se torne biologicamente ativa, esta forma da vitamina D tem de sofrer uma segunda hidroxilação, desta vez no carbono 1. Esta hidroxilação é mediada pela enzima 1 α -hidroxilase e dá origem ao 1,25-dihidroxivitamina D3 (1,25(OH)2D3), 1,25-dihidroxicolecalciferol ou calcitriol, a forma hormonal ativa da vitamina D3 (Zehnder *et al.*, 1999; Cline, 2012; Holick, 2014). Esta reação ocorre principalmente nos rins (Figura 8) (Zehnder *et al.*, 2001; Zehnder *et al.*, 2002; Lerner *et al.*, 2018).

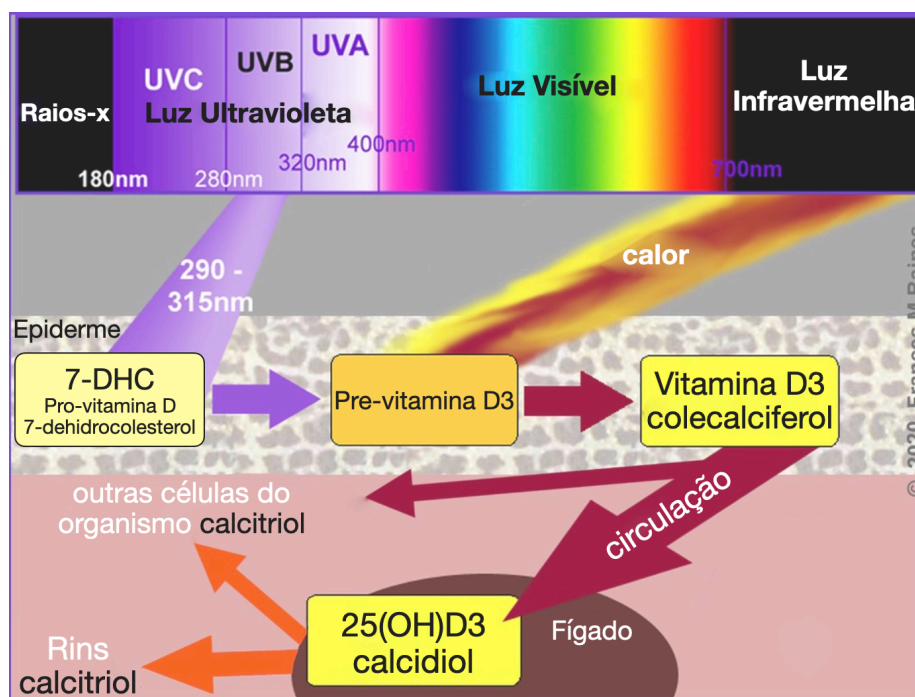


Figura 8. Síntese e ativação da vitamina D nos animais. © 2020 Frances M. Baines - Usado com permissão.

A vitamina D2 ou ergocalciferol apenas pode ser obtido através da alimentação. À semelhança da vitamina D3, esta sofre duas hidroxilações: a primeira no fígado e a segunda em diversos locais do organismo, dando origem ao 25-hidroxi-ergocalciferol ou ercalcidiol e ao 1,25-dihidroxi-ergocalciferol ou ercalcitriol, respetivamente (Holick, 2014; Dereje *et al.*, 2017).

1.3.2. Transporte da vitamina D

As moléculas esteroides lipofílicas, como é o caso da vitamina D, ligam-se a proteínas plasmáticas no seu transporte sanguíneo. A principal proteína de transporte da vitamina D e dos seus metabolitos é a proteína de ligação da vitamina D. Esta proteína é responsável por cerca de 80% do transporte, enquanto que proteínas como a albumina e lipoproteínas, que são mais abundantes no sangue, têm um papel menos importante neste transporte (Bouillon & Pauwels, 2018). A proteína de ligação da vitamina D, apesar de transportar todos os metabolitos da vitamina D, tem uma maior afinidade para o transporte de calcidiol e uma menor afinidade para o transporte do calcitriol ou da vitamina D propriamente dita. Na maioria das espécies, esta proteína tem uma maior afinidade para os metabolitos da vitamina D3 do que para os metabolitos da vitamina D2. Nas aves, a afinidade da proteína de ligação da vitamina D para transportar os metabolitos da vitamina D3 é três a dez superior à afinidade para transportar os metabolitos da vitamina D2 (Haddad *et al.*, 1976; Bouillon *et al.*, 1980; Marx *et al.*, 1989; Bouillon & Pauwels, 2018).

1.3.3. Funções da vitamina D

A vitamina D tem como principal função manter os níveis de cálcio e fósforo sanguíneos dentro dos valores considerados fisiológicos e necessários para o sucesso de diversas funções metabólicas, da regulação da expressão génica e para o sucesso do metabolismo ósseo (Fleet, 2018). Estima-se que a vitamina D influencie entre 200 e 2000 genes, direta ou indiretamente, o que sugere que o aumento dos valores da vitamina pode regular a expressão de genes relacionadas com patologias oncológicas, patologias auto-imunes e doenças cardiovasculares que, por sua vez, estão associadas a uma deficiência desta vitamina (Nagpal *et al.*, 2005; Hossein-Nezhad & Holick, 2013).

A vitamina D desempenha, em conjunto com a paratormona (PTH), um papel importante na remodelação óssea, afetando o metabolismo do cálcio e do fósforo (Carmeliet, 2018). Quando o balanço do cálcio é normal ou positivo, a vitamina D e a PTH são responsáveis por manter os níveis de cálcio nos seus valores normais. No entanto, quando o balanço de cálcio é negativo, a paratiroide é estimulada, aumentando a secreção de PTH. Por sua vez, a PTH estimula a produção da forma activa da vitamina D, a 1,25(OH)2D3, através do aumento da expressão renal de 1 α -hidroxilase. Estas duas hormonas promovem a remodelação óssea, uma vez que estimulam os osteoblastos a produzir citocinas que aceleram a maturação dos osteoclastos e, conseqüentemente, a libertação de cálcio e fósforo na circulação (Suda *et al.*, 2015; Carmeliet, 2018; Nakamichi *et al.*, 2018; Charoenngam *et al.*, 2019). A 1,25(OH)2D3 estimula a secreção do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF23) nos osteócitos. Esta hormona, ao contrário da PTH,

suprime a atividade da 1α -hidroxilase nos rins, reduzindo a sua produção. A atividade da enzima também é suprimida pela própria forma ativa da vitamina D, que suprime ainda a secreção de PTH na paratiroide através da sua interação com os recetores de vitamina D nas glândulas (Suda *et al.*, 2015; Carmeliet, 2018; Nakamichi *et al.*, 2018; Charoenngam *et al.*, 2019). O aumento da concentração de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promove, ainda, a expressão da 24-hidroxilase que é uma enzima responsável pela inativação da vitamina D através da hidroxilação do carbono 24, culminando na formação de ácido calcitroico. A expressão desta enzima é suprimida pela PTH (Tanaka & DeLuca, 1980; Holick, 2014). Tanto a PTH, como a vitamina D, estimulam a reabsorção renal de cálcio. Por outro lado, o aumento das concentrações sanguíneas de fósforo estimulam a secreção da PTH e do FGF23 que, consequentemente, aumentam a sua excreção renal. Para além disto, a vitamina D ainda tem um papel muito importante na absorção de cálcio a nível intestinal, através de dois mecanismos distintos: através de um transporte transcelular, ativo e saturável, que ocorre principalmente no intestino delgado proximal (duodeno e jejuno), ou através de um transporte paracelular, passivo e não saturável, que ocorre com a mesma intensidade ao longo de todo o intestino (Pansu, 1981). A vitamina D parece ter um papel ativo nestes dois mecanismos. Sem esta, o organismo apenas é capaz de absorver 10 a 15% do cálcio ingerido. No entanto, a interação da forma activa da vitamina D com os recetores de vitamina D presentes no intestino consegue aumentar a eficiência da absorção para valores bastante superiores, 30% a 40% (Holick, 2007). Nos animais com deficiência desta vitamina, a eficiência de absorção pode diminuir mais de 75% (Pansu *et al.*, 1983). Nos humanos com uma alimentação com níveis de cálcio normais (400 mg por refeição), cerca de 60% do cálcio é absorvido através do processo saturável, no entanto, se os valores de cálcio da alimentação aumentarem, o contributo do transporte ativo na absorção total de cálcio é reduzido (Fleet, 2018). A interacção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ com os respetivos recetores no intestino estimula a produção de transportadores de cálcio nas células intestinais, aumentando a capacidade máxima do sistema saturável de transporte de cálcio (Giuliano & Wood, 1991; Fleet, 2018). A vitamina D também tem um papel importante na absorção não saturável do cálcio. Em humanos com doença renal crónica, a absorção não saturável do cálcio a nível intestinal é reduzida, contudo, isto pode ser corrigido administrando a forma ativa da vitamina D, o que sugere que a causa desta redução é a incapacidade de ativação da vitamina causada pela patologia renal (Sheikh *et al.*, 1990; Fleet, 2018). A absorção de fósforo é mais eficaz que a absorção de cálcio (o organismo tem a capacidade de absorver entre 60% e 70% do fósforo ingerido) e pode aumentar até aos 80% com a ação da vitamina D, no entanto esta não parece ser o principal regulador da absorção intestinal de fósforo (Holick, 2007).

1.3.4. Fotoisomerização e fotodegradação da vitamina D

O organismo possui vários mecanismos de regulação da vitamina D que evitam a sua produção excessiva (Chen, 2010). A pré-vitamina D produzida na pele pode ser convertida em vitamina D3 ou noutros fotoprodutos, como o taquisterol e o lumisterol. Por exemplo, durante os primeiros dez minutos de exposição à radiação solar simulada, cerca de 10% a 15% do 7-DHC presente na pele de caucasianos foi convertido em pré-vitamina D3, não sendo detetada a produção de taquisterol ou lumisterol. Após 1 hora de exposição, 5% do 7-DHC original tinha sido convertido em taquisterol e 30% em lumisterol, enquanto que a pré-vitamina D3 se manteve nos 15%. Ao fim de 8 horas, cerca de 60% do 7-DHC original foi convertido em lumisterol. Estas reações são reversíveis, evitando a produção de pré-vitamina D3 em excesso e, consequentemente, vitamina D3 (Holick *et al.*, 1981; MacLaughlin *et al.*, 1982).

Para além disto, a vitamina D3 produzida e acumulada na pele é sensível à radiação e, quando exposta à mesma, é degradada originando vários fotoprodutos. Um estudo demonstrou que a radiação solar no verão, em Boston, tem a capacidade de degradar mais de 50%, 75% e 95% após meia hora, uma hora e três horas de exposição, respetivamente. Os principais fotoprodutos encontrados foram o suprasterol 1, o suprasterol 2 e 5,6-transvitamina D3 (molécula análoga da vitamina D3) (Webb *et al.*, 1989). Desta forma, a exposição prolongada à radiação UV não aumenta continuamente a concentração plasmática de 25(OH)D3 (Watson, 2014).

1.3.5. Intoxicação por vitamina D

A vitamina D em doses elevadas pode ser tóxica (O'Malley, 2008). No entanto, não existem casos descritos de patologias derivadas do excesso de vitamina D causadas por exposição excessiva à radiação. Isto acontece uma vez que tanto a pré-vitamina D3, como a própria vitamina D3 são suscetíveis à radiação, originando vários produtos inertes ou sem atividade na homeostase do cálcio (Baines *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010; Watson, 2014). A intoxicação por vitamina D causada por uma alimentação natural é rara, sendo que a maioria dos casos descritos em répteis são derivados de uma sobredosagem na suplementação ou de uma alimentação inadequada, como é o caso dos répteis alimentados com ração de cão ou de gato, que possuem concentrações elevadas de vitamina D (Wallach, 1996; O'Malley, 2008; Penning, 2012; Boyer & Scott, 2019). Para além disto, a intoxicação pode ser causada, de forma aguda, pela ingestão de rodenticidas à base de colecalciferol ou de fármacos tópicos para a psoríase, embora esta hipótese seja pouco provável em répteis mantidos em cativeiro (Cline, 2012; Dee & Hovda, 2012).

A hipervitaminose D pode ser difícil de diagnosticar, principalmente devido ao aparecimento lento dos sinais clínicos e, por isso, o prognóstico pode ser muito reservado (Cline, 2012). O excesso de vitamina D causa hipercalcemia e, conseqüentemente, mineralização dos tecidos moles do trato gastrointestinal, músculos, rins, pulmões, coração e dos grandes vasos que, geralmente, podem ser observadas nos exames radiográficos ou ecográficos (Figura 9), e a longo prazo pode causar malformações ósseas. Estas mineralizações podem causar dor e disfunção ou falha orgânica (Wallach, 1996; Raiti & Garner, 2006; O'Malley, 2008; Cline, 2012; Penning, 2012; Watson, 2014; Boskey, 2018; Boyer & Scott, 2019). Os sinais clínicos em mamíferos incluem depressão, anorexia e poliúria/polidipsia (Boyer & Scott, 2019). Num caso descrito de uma tartaruga-de-pescoço-de-Geoffroy (*Phrynosops geoffroanus*) com mineralizações nos grandes vasos e na mucosa gástrica, os únicos sinais clínicos observados foram anorexia e prostração (Raiti & Garner, 2006). Em camaleões-pantera, o excesso de vitamina D está associado a gota renal (Ferguson *et al.*, 1996). Atualmente não existem *guidelines* para o tratamento destas patologias em répteis e por isso segue-se o tratamento recomendado para outras, à base de glucocorticoides, calcitonina e, de acordo com estudos mais recentes, pamidronato (O'Malley, 2008; Boyer & Scott, 2019a).

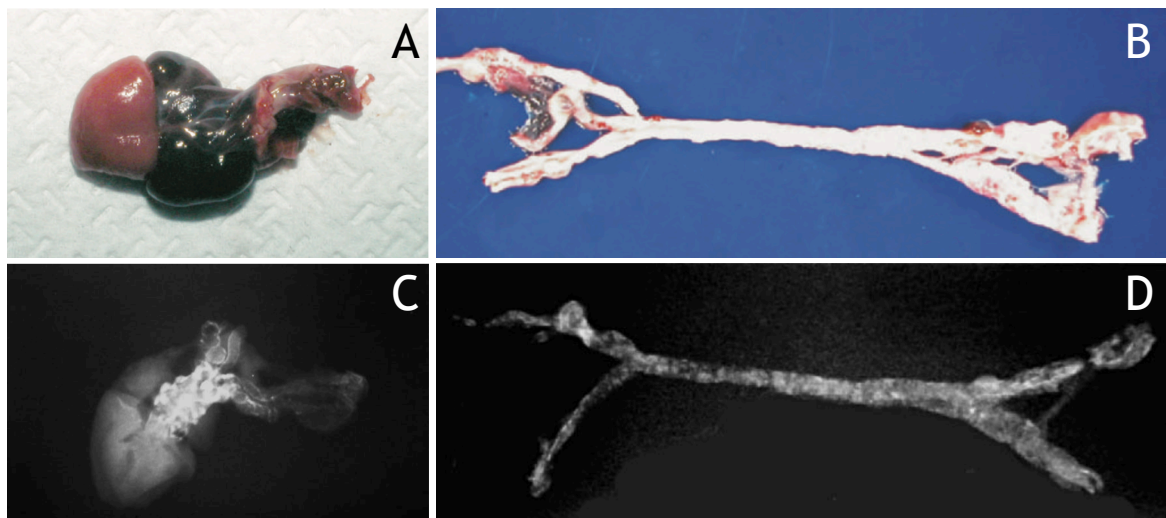


Figura 9. Intoxicação por vitamina D numa iguana verde (*Iguana iguana*). Coração (A), aorta e grandes vasos dissecados (B) e respectivas imagens radiográficas (C e D). É possível observar calcificação severa do tronco arterioso (C) e mineralização das paredes dos vasos (D). Adaptado de Murray, 2009.

1.3.6. Deficiência de vitamina D

Nos mamíferos, a deficiência em vitamina D pode causar problemas de saúde graves como raquitismo em animais jovens e osteoporose e osteomalacia em adultos. Nos répteis a principal consequência da hipovitaminose D é a doença óssea metabólica (MBD)

causada por hiperparatiroidismo secundário nutricional (Watson, 2014). MBD é um termo utilizado para descrever um conjunto de doenças que afetam a integridade e função dos ossos (Carmel & Johnson, 2017). A MBD mais comum em répteis é o hiperparatiroidismo secundário nutricional (NSHP), cujas principais causas são a deficiência prolongada de cálcio ou vitamina D, um desequilíbrio no rácio cálcio-fósforo na dieta, exposição inadequada à radiação UV ou a inexistência de temperaturas adequadas nas instalações (Carmel & Johnson, 2017; Lock, 2017). A doença óssea metabólica é mais comum em tartarugas e lagartos, uma vez que muitos destes animais têm uma alimentação com concentrações mais baixas de vitamina D, enquanto que as cobras têm maior acesso a vitamina D através da alimentação (Carmel & Johnson, 2017). A diminuição da concentração sanguínea de cálcio ou vitamina D e o aumento da concentração sanguínea de fósforo aumentam a secreção de PTH que, por sua vez, estimula a reabsorção óssea. Quando as deficiências são prolongadas, o tecido ósseo destruído durante a reabsorção óssea não é recuperado, causando uma diminuição da densidade óssea (osteopenia) e enfraquecendo os ossos (Lock, 2017).

Os sinais clínicos mais comuns incluem desvios na coluna vertebral e na cauda, tumefação e rigidez dos membros posteriores, fraturas ósseas, ossos longos arqueados e moles, carapaças deformadas em tartarugas, dificuldade em levantar o corpo ou a cauda, mandíbula tumefacta e mole (*rubber jaw*), tremores, paresia ou paralisia dos membros, e letargia (Figuras 10 e 11) (O'Malley, 2008; Penning, 2012; Lock, 2017). O tratamento recomendado inclui suplementação com cálcio e vitamina D, suporte nutricional, melhoria das condições das instalações, analgesia e calcitonina (não é recomendado administrar calcitonina em animais hipocalcémicos ou com sinais clínicos neurológicos) (Lock, 2017; Boyer & Scott, 2019). O prognóstico varia com a severidade dos sinais clínicos mas os lagartos e crocodilos respondem melhor ao tratamento do que os quelónios. O prognóstico é bom nos casos sem diminuição da radiopacidade óssea visível, enquanto que animais com paresia, paralisia ou obstipação têm um pior prognóstico. Uma boa nutrição com suplementação adequada de cálcio e radiação UV é essencial (Boyer & Scott, 2019).



Figura 10. Geco leopardo com sinais clínicos de hiperparatiroidismo secundário nutricional: cifose e ossos longos arqueados (principalmente o rádio e a ulna). Adaptado de Boyer, 2019.

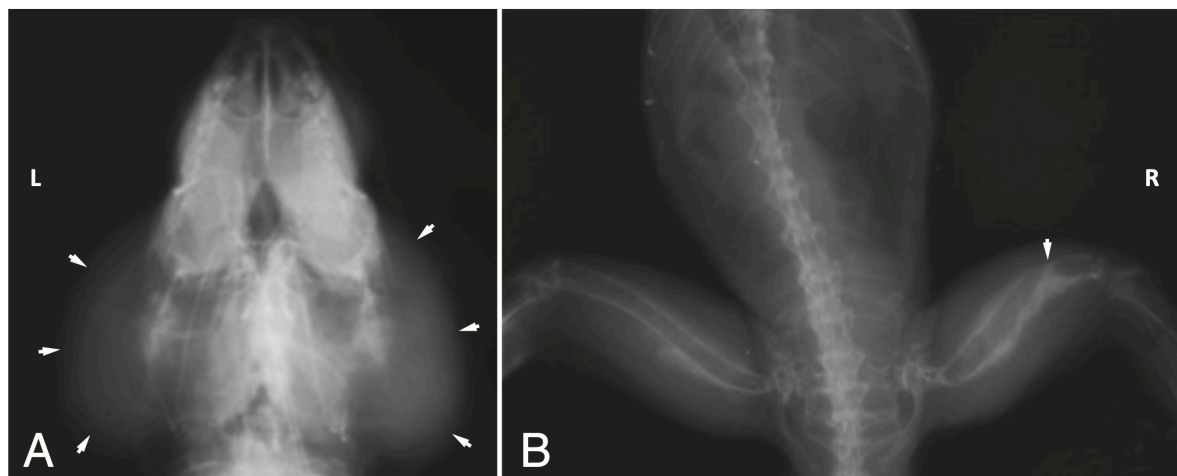


Figura 11. Iguana verde (*Iguana iguana*) com hiperparatireoidismo secundário nutricional. (A) Radiografia dorsoventral do crânio onde se podem observar proliferações fibrosas e do perióstio nas mandíbulas (setas). (B) Radiografia dorsoventral da pélvis e membros posteriores da mesma iguana. Pode-se observar a baixa mineralização óssea, proliferações fibrosas e do perióstio nos fêmures, e uma fratura patológica na porção distal do fêmur direito (seta). L corresponde ao lado esquerdo do animal e R ao lado direito. Adaptado de Holmes & Divers, 2019.

1.4. A radiação ultravioleta e a vitamina D nas diferentes espécies

Devido à grande diversidade de espécies e diversas adaptações ambientais, têm sido realizados estudos para compreender as necessidades individuais de cada espécie (Vergneau-Grosset *et al.*, 2020). Grande parte dos animais vertebrados contém 7-deidrocolesterol na pele em concentrações suficientes para produzir quantidades significativas de vitamina D3 quando expostos à radiação UV (Holick *et al.*, 2014). A maioria dos mamíferos herbívoros parece beneficiar da exposição à radiação UV, compensando, assim, a sua alimentação pobre em vitamina D (Uhl *et al.*, 2018). O coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculi*), o porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) e a chinchila (*Chinchilla laniger*), alguns dos mamíferos exóticos mais comuns em cativeiro, parecem beneficiar significativamente da radiação UV, aumentando a concentração sérica de 25-hidroxivitamina D quando expostos a este tipo de radiação (Emerson *et al.*, 2014; Rivas *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2014). A ovelha (*Ovis aries*), a cabra (*Capra aegagrus hircus*) e a vaca (*Bos taurus*) têm a capacidade de compensar a dieta pobre em vitamina D3, produzindo esta hormona a nível cutâneo quando expostas à radiação UV (Hymøller *et al.*, 2010; Nemeth *et al.*, 2017). O lama (*Lama glama*) e o alpaca (*Vicugna pacos*) estão adaptados à produção de vitamina D3 no seu habitat natural, em lugares de elevada altitude e, portanto, com níveis altos de radiação solar. Por esta razão, quando são mantidos noutras localizações com uma altitude mais reduzida estão particularmente susceptíveis à deficiente produção desta vitamina (Uhl *et al.*, 2018). O cavalo (*Equus ferus caballus*), ao contrário dos restantes herbívoros, não parece obter valores significativos de vitamina D3 quando exposto à radiação UV. As evidências sugerem que depende da sua alimentação para alcançar os valores desejados,

no entanto, esta espécie desenvolveu um mecanismo diferente de homeostase do cálcio. Assim, o cavalo apresenta, quando comparado com a maior parte das espécies, uma capacidade elevada de absorver cálcio a nível intestinal (menor dependência da vitamina D3), concentrações sanguíneas de cálcio elevadas, uma elevada excreção de cálcio a nível renal e uma baixa concentração sanguínea de metabolitos da vitamina D (Breidenbach *et al.*, 1998; Wilkens *et al.*, 2017).

O porco (*Sus scrofa domesticus*), aparentemente, também beneficia da utilização de radiação UV artificial como fonte de vitamina D3 quando mantido em instalações interiores com pouco ou nenhum acesso à luz solar (Jakobsen *et al.*, 2020). No entanto, alguns carnívoros, como o cão (*Canis lupus familiaris*) ou o gato (*Felis catus*), dependem exclusivamente da vitamina D3 absorvida a nível intestinal para manterem os níveis fisiológico necessários desta hormona (How *et al.*, 1994). Estes animais apresentam concentrações muito baixas de 7-dehidrocolesterol na pele e, por isso, perderam a capacidade de sintetizar quantidades significativas de vitamina D3 de forma endógena (How *et al.*, 1994). O gato apresenta um aumento da atividade da 7-dehidrocolesterol- Δ^7 -redutase, enzima responsável pela conversão do 7-dehidrocolesterol em colesterol, o que pode explicar a baixa concentração de 7-dehidrocolesterol na pele dos felinos e, consequentemente, a incapacidade de produzir doses significantes de vitamina D3 na pele (Morris *et al.*, 1999). Estes animais podem ter perdido esta capacidade devido ao facto da sua dieta natural consistir na ingestão de presas inteiras, sendo rica em vitamina D3 (Morris *et al.*, 1999; Uhl *et al.*, 2018). O urso polar (*Ursus maritimus*) também apresenta concentrações cutâneas de 7-dehidrocolesterol extremamente reduzidas, o que sugere, tal como nos carnívoros domesticados, que este depende da vitamina D obtida através da alimentação para atingir os seus níveis fisiológicos necessários (Kenny *et al.*, 1998).

Contudo, vários mamíferos marinhos, apesar de serem carnívoros, apresentam concentrações elevadas de 7-dehidrocolesterol na pele. A foca-comum (*Phoca vitulina*), a foca-anelada (*Pusa hispida*) e o leão-marinho-da-califórnia (*Zalophus californianus*), ao contrário do que seria esperado, apresentam concentrações elevadas de 7-dehidrocolesterol (Corbee *et al.*, 2015). O leão-marinho-da-nova-zelândia (*Phocarctus hookeri*) tem a capacidade de sintetizar valores significativos de vitamina D quando exposto a radiação UV, sugerindo que, à semelhança dos outros mamíferos marinhos estudados, apresenta valores elevados de 7-dehidrocolesterol na pele (Kale *et al.*, 2017).

A pitão-real (*Python regius*), à semelhança de outros animais carnívoros, também parece depender exclusivamente da sua dieta para obter vitamina D, visto que não existe uma relação entre a exposição à radiação UV e as concentrações plasmáticas de 25-hidroxivitamina D3 e de cálcio ionizado (iCa^{++}) nesta espécie (Hedley & Eatwell, 2013). No entanto, a cobra-do-milho (*Elaphe guttata*) e a pitão-birmanesa, ambas com uma dieta semelhante à da pitão-real, aumentam significativamente as concentrações plasmáticas de vitamina D3 quando expostas à radiação UV (Acierno *et al.*, 2008; Bos *et al.*, 2018). Da

mesma forma, o dragão-de-komodo, que também mantém uma alimentação carnívora, produz quantidades significativas de vitamina D3 quando exposto à radiação UV. Estes animais, em estado selvagem, apresentam concentrações sanguíneas de 25-hidroxivitamina D3 muito superiores, quando comparadas com as concentrações apresentadas por animais da mesma espécie que se encontram em cativeiro em instalações interiores e, por isso, sem acesso à radiação UV. No entanto estas baixas concentrações são revertidas quando os animais mantidos no interior são expostos à radiação natural ou artificial, comprovando a importância da radiação UV na produção da vitamina D3 nestes animais (Gillespie *et al.*, 2000). A tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*) também aumenta significativamente as concentrações sanguíneas de 25-hidroxivitamina D3 quando exposta a radiação UV artificial, comparativamente a tartarugas da mesma espécie não expostas à mesma radiação (Acierno *et al.*, 2006).

De um modo geral, os répteis herbívoros e insetívoros necessitam de radiação UV para obterem vitamina D3, visto que a concentração desta vitamina na sua alimentação é reduzida ou nula. Tartarugas-de-hermann (*Testudo hermanni*) expostas a radiação solar apresentam valores sanguíneos de 25-hidroxivitamina D3 significativamente superiores aos de tartarugas da mesma espécie expostas durante o mesmo período de tempo a lâmpadas fluorescentes ou de mercúrio. Isto sugere que a radiação UV natural e artificial têm diferentes propriedades e, por isso, influenciam a produção de vitamina D3 de forma distinta (Selleri *et al.*, 2012). Um estudo realizado em tartarugas de quatro espécies diferentes do género *Testudo* (*Testudo hermanni boettgeri*, *Testudo graeca iberica*, *Testudo marginata*, *Testudo horsfieldi*) mostrou que as concentrações sanguíneas de iCa^{++} variam consoante a época do ano. Todas as espécies estudadas apresentaram a concentração máxima de iCa^{++} em agosto, altura do ano com temperaturas médias elevadas e elevada exposição diária à radiação solar. Este acontecimento deve-se, provavelmente, a uma maior produção de vitamina D3 durante o mês de agosto e, conseqüente aumento do iCa^{++} em circulação (Eatwell *et al.*, 2009). As concentrações sanguíneas quer de vitamina D, quer de iCa^{++} , na tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) são influenciadas tanto pela idade dos animais como pelo período de exposição à radiação UV. Os animais adultos apresentam concentrações superiores aos juvenis, da mesma maneira que os animais expostos a radiação ultravioleta apresentam concentrações superiores de iCa^{++} e de vitamina D. No entanto, à semelhança da tartaruga-de-hermann, esta espécie parece beneficiar mais com a exposição à luz natural (Scott *et al.*, 2019).

O dragão barbudo (*Pogona vitticeps*), quando exposto à radiação UV, aumenta significativamente as concentrações sanguíneas quer da forma de reserva da vitamina D (25-hidroxivitamina D3), quer da forma ativa (1,25(OH)₂D3), quando comparado com animais suplementados de forma oral. A suplementação oral de vitamina D com quantidades quatro vezes superiores à dose máxima recomendada não é suficiente para atingir os valores alcançados com a exposição à radiação UV, e os animais expostos a uma menor

quantidade de radiação tendem a seleccionar alimentos com maiores concentrações de vitamina D3. Isto sugere que esta espécie regula os seus níveis fisiológicos de vitamina D3 principalmente através da sua produção endógena secundária à incidência de radiação UV (Oonincx et al., 2010).

O camaleão-pantera (*Furcifer pardalis*) tem a capacidade de ajustar o período de exposição à radiação em função da quantidade de vitamina D3 obtida na alimentação, de forma a satisfazer as suas necessidades. Quanto menor o teor de de vitamina D3 na dieta, maior o período de exposição à radiação. Do ponto de vista reprodutivo, a radiação UVB mostrou-se essencial nesta espécie. Sem uma intensidade elevada de radiação UV não é possível obter ovos viáveis e, a combinação de doses elevadas de vitamina D3 na dieta e de elevada radiação UVB, proporciona o maior sucesso reprodutivo. Estas evidências revelam a importância da existência de um equilíbrio entre a vitamina D3 endógena e exógena nesta espécie de camaleões (Ferguson et al., 1996; Ferguson et al., 2003). À semelhança do camaleão-pantera, no camaleão-do-iemen (*Chamaeleo calyptrotus*) a conjugação entre os níveis de vitamina D endógena e exógena parece ser essencial (Hoby et al., 2010). A iguana-verde (*Iguana iguana*) aumenta as concentrações séricas de vitamina D quer através de absorção intestinal, quer através da produção endógena. No entanto, a produção endógena de vitamina D3 parece ter um papel essencial na fisiologia destes répteis, alcançando valores muito superiores às concentrações alcançadas com a suplementação oral e sendo, por isso, mais eficiente na prevenção ou tratamento da doença óssea metabólica (Bernard et al., 1991; Allen et al., 1999). A iguana-rinoceronte (*Cyclura cornuta*) apresenta valores sanguíneos de vitamina D3 muito superiores quando mantida em instalações exteriores, o que evidencia uma importante produção endógena de vitamina D3 nesta espécie (Ferguson et al., 2015).

Um estudo realizado em Gecos leopardo (*Eublepharis macularius*) demonstrou que estes animais, quando expostos a curtos períodos de radiação UV (2 h), têm a capacidade de aumentar significativamente a concentração de 25-hidroxivitamina D3. Estes dados demonstram, mais uma vez, que mesmo as espécies noturnas têm a capacidade de produzir vitamina D3 quando expostas à radiação UV, ainda que durante curtos períodos (Gould et al., 2018). De facto, várias espécies com menor oportunidade de exposição à luz solar demonstraram ter desenvolvido um mecanismo de adaptação que lhes permite sintetizar vitamina D3 de uma forma mais eficiente (Carman et al., 2000; Baines et al., 2006; Ferguson et al., 2015; Rutland et al., 2019). Um estudo comparou a capacidade de conversão de 7-dehidrocolesterol do lagarto-espinhoso-do-texas (*Sceloporus olivaceus*) e da osga-turca (*Hemidactylus turcicus*). A primeira espécie é diurna e a segunda espécie tem um estilo de vida crepuscular/noturno, tendo-se verificado que a espécie noturna tem uma maior capacidade de conversão de 7-dehidrocolesterol (Carman et al., 2000). Comparando duas espécies jamaicanas de anolis (*Anolis sagrei* e *Anolis lineotopus merope*), os animais da espécie *Anolis lineotopus merope* têm uma maior taxa de conversão de 7-

dehidrocolesterol. O período de exposição desta espécie à radiação solar é significativamente inferior quando comparado com o período de exposição da espécie *Anolis sagrei*. Para além disso, os conteúdos estomacais das espécies revelaram que a dieta dos *Anolis sagrei* é mais rica em vitamina D, quando comparada com a dieta da outra espécie. A concentração de fotoprodutos de 7-dehidrocolesterol em amostras de pele de ambas as espécies expostas à radiação UV artificial foi medida várias vezes ao longo de um período de tempo, tendo-se verificado que as concentrações aumentaram de forma mais significativa na espécie *Anolis lineatopus merope* (Ferguson *et al.*, 2015).

No entanto, estas adaptações não se verificam apenas em répteis. Foi realizado um estudo em 2013 que comparou a capacidade de produção endógena de vitamina D3 em duas espécies distintas de morcegos. Ambas as espécies são noturnas, no entanto os morcegos da espécie *Rousettus aegyptiacus* abrigam-se em cavernas, túmulos ou edifícios durante o dia, e os morcegos da espécie *Pteropus hypomelanus* abrigam-se em árvores, estando assim mais expostos à luz solar. Ambas as espécies são capazes de produzir vitamina D3, no entanto os morcegos da espécie *Rousettus aegyptiacus* sintetizam quantidades superiores de vitamina D3, quando comparados com os morcegos da espécie *Pteropus hypomelanus*. Isto sugere que os morcegos que se abrigam em locais menos expostos à radiação solar desenvolveram uma maior sensibilidade à radiação UV e, consequentemente, uma maior taxa de conversão de 7-dehidrocolesterol (Southworth *et al.*, 2015).

Geralmente, a informação sobre as necessidades de radiação de cada espécie de aves são extrapoladas das aves de produção. Assim, assume-se que as aves não conseguem utilizar de forma eficiente a vitamina D2, estando dependentes da vitamina D presente em alimentos de origem animal e da vitamina D produzida na pele, ou seja, da vitamina D3 (Hoy *et al.*, 1988; Vergneau-Grosset *et al.*, 2020). A galinha-doméstica (*Gallus gallus domesticus*) não necessita de suplementação alimentar de vitamina D, se receber a quantidade necessária de radiação.

A importância da radiação UV já foi estudada em várias espécies de psitacídeos. Foram estudados papagaios-cinzentos (*Psittacus erithacus*) inicialmente mantidos sem acesso a qualquer tipo de radiação UV que passaram a ter acesso à luz solar. Os valores de iCa^{++} dos animais aumentaram significativamente, independentemente da dieta, enquanto que os valores de vitamina D aumentaram apenas no grupo com alimentação à base de sementes. Contudo, quando o estudo foi repetido com papagaios sul-americanos do género *Pionus* não se observaram alterações significativas em nenhum dos parâmetros (Stanford *et al.*, 2006). O papagaio-de-barriga-vermelha (*Amazona ventralis*), apesar de não mostrar diferenças significativas na concentração de iCa^{++} , apresenta concentrações de vitamina D3 significativamente superiores quando tem acesso à radiação solar (West *et al.*, 2019). O periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*), à semelhança do psitacídeo sul-americano, não parece beneficiar da exposição à radiação. De um modo geral, todas as doses de

radiação UV testadas causaram efeitos adversos ou foram incapazes de aumentar a concentração séria de vitamina D3 (Lupu *et al.*, 2013). O kiwi (*Apteryx mantelli*) não apresenta alterações nas concentrações sanguíneas de vitamina D3 quando exposto à radiação UV. No entanto, os animais mantidos em cativeiro têm concentrações de 25(OH)D superiores às dos animais capturados na natureza. Estas diferenças são, provavelmente, derivadas de diferenças entre a alimentação disponibilizada em cativeiro e a alimentação encontrada na natureza, o que sugere que esta espécie depende exclusivamente da alimentação para obter vitamina D (Kale *et al.*, 2017). O colhereiro-africano (*Platalea alba*), o marabu (*Leptoptilos crumenifer*) e o pinguim-gentoo (*Pygoscelis papua*) são outros exemplos de aves selvagens estudadas que beneficiam da exposição à radiação UV (Schaftenaar *et al.*, 2015; Woodhouse *et al.*, 2016; Tröndle *et al.*, 2018).

Sempre que for possível e comprovadamente útil na produção de vitamina D, a radiação UV deve ser recomendada, nas doses adequadas, pois é mais segura do que a suplementação oral (Vergneau-Grosset *et al.*, 2020).

1.5. Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da exposição à radiação UVB e da suplementação nos níveis plasmáticos de cálcio ionizado em *Eublepharis macularius* (Geco leopardo).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi, previamente, aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

As amostras de sangue foram recolhidas no âmbito de consultas de *check-up*, em 15 Gecos leopardo de diferentes tutores e submetidos a diferentes condições ambientais: animais suplementados (n=5), animais submetidos à radiação UV (n=5) e animais não suplementados nem submetidos a radiação (controlo) (n=5). Os Gecos leopardo estavam alojados individualmente em caixas de plástico, com 56 cm x 39 cm x 28 cm. Cada caixa tinha dois abrigos em lados opostos, um recipiente com água, um recipiente para o alimento e papel de cozinha para facilitar a limpeza (Figura 12). As caixas encontravam-se sobre um tapete de aquecimento elétrico que ocupava um terço da base das mesmas, mantendo a temperatura, na zona quente, a 30°C. Todos os Gecos foram alimentados com tenébrídeos, grilos e/ou baratas, duas a três vezes por semana. A alimentação dos Gecos do grupo que recebia suplementos foi pulverizada com suplemento de cálcio e vitamina D3 em pó (*Exo Terra Calcium + D₃ Powder Supplement*, Exo Terra, Rolf C. Hagen, Inc., Montreal, Canadá). Os Gecos expostos à radiação tinham uma lâmpada compacta fluorescente *Mega Sun UVB 10.0* de 13W da *Reptiles Planet* (Paris, França) sobre a caixa, a cerca de 30 cm da sua base, conectada a um temporizador programado para a ligar entre as 10h00 e as 18h00. Os restantes Gecos não recebiam suplementos nem estavam expostos à radiação, sendo usados como controlo. Na semana que antecedeu o *check-up* inicial, nenhum animal recebeu suplementos ou esteve exposto à radiação UV.

Os animais foram pesados em ambas as consultas de *check-up*. Foram recolhidas amostras de sangue em todos os animais numa consulta de *check-up* inicial, e numa consulta de *check-up* final, realizada cinco semanas após o *check-up* inicial. Todas as amostras foram recolhidas através de venopunção da veia jugular, utilizando seringas de insulina de 0,5 ml BD Micro-Fine™+ 0,33 mm (29G) x 12,7 mm (BD Medical - Diabetes Care Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, França) (Figura 13), para um tubo de heparina, entre as 10h00 e as 12h00, e analisadas até uma hora após a recolha. As amostras foram analisadas com recurso ao analisador portátil de gases sanguíneos, electrólitos, química e de hematologia VetScan® i-STAT®1 (Abaxis, Inc., Union City, California, Estados Unidos da América), utilizando os Cartuchos VetScan® i-STAT®1 CG8+ que analisa os seguintes parâmetros: pH, pressão parcial de dióxido de carbono (PCO₂), pressão parcial de oxigénio (PO₂), excesso de base (BE), bicarbonato (HCO₃⁻), dióxido de carbono total (TCO₂), saturação de oxigénio (sO₂), ião sódio (Na⁺), ião potássio (K⁺), cálcio ionizado (iCa⁺⁺), glucose (Glu), hematócrito (Hct) e hemoglobina (Hgb).



Figura 12. Habitação tipo dos Gecos leopardo incluídos no estudo.



Figura 13. Venopunção da veia jugular externa direita para recolha de sangue num Geco leopardo.

Os dados foram estatisticamente analisados com o programa SPSS® versão 26 (IBM, Armonk, Nova York, EUA), utilizando o teste não paramétrico de Wilcoxon. Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (D.P.). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Animais

A Tabela 1 mostra a distribuição de Gecos leopardo machos e fêmeas no início do estudo. Dois Gecos foram excluídos do estudo antes do segundo *check-up*: uma fêmea do grupo de animais expostos à radiação e um macho do grupo controle. Três semanas após o *check-up* inicial, uma fêmea do grupo dos animais expostos à radiação foi excluída do estudo pois apresentava uma diminuição da massa corporal de cerca de 25%, dissecou e a pele em mau estado. Cinco dias antes do *check-up* final, um macho do grupo de controle foi excluído por apresentar sinais clínicos de MBD. Os dados destes animais não foram incluídos do estudo.

Tabela 1. Número de animais em cada grupo e idade (média $\pm$ D.P.) no início do estudo.

Grupo	Suplemento (n=5)	Radiação (n=5)	Controle (n=5)
Machos (n)	3	3	2
Fêmeas (n)	2	2	3
Idade (meses)	38,0 $\pm$ 27,9	28,8 $\pm$ 18,2	27,4 $\pm$ 24,4

A massa corporal média inicial e final de cada grupo pode ser consultada na Tabela 2. Os animais do grupo controle foram os que apresentaram menor massa corporal inicial e final (35,25 $\pm$ 9,06 g e 40,75 $\pm$ 9,29 g). Os tutores dos Gecos expostos à radiação referiram que estes animais apresentaram uma diminuição do apetite desde a primeira semana de exposição. A massa corporal destes animais diminuiu ligeiramente entre as consultas de *check-up* inicial e final (62,75 $\pm$ 9,36 g e 62,00 $\pm$ 16,43 g). No entanto, a massa corporal média não variou significativamente dentro de cada grupo entre o início e o final do estudo (grupo suplementado: $p=0,854$; grupo exposto à radiação: $p=0,854$; grupo controle: $p=0,141$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na massa corporal entre grupos ($p>0,05$).

Tabela 2. Massa corporal (g) no início e no final do estudo (média $\pm$ D.P.).

Grupo	Suplemento (n=5)	Radiação (n=4)	Controle (n=4)
Massa corporal inicial	58,60 $\pm$ 6,10	62,75 $\pm$ 9,36	35,25 $\pm$ 9,06
Massa corporal final	59,00 $\pm$ 6,93	62,00 $\pm$ 16,43	40,75 $\pm$ 9,29

($p>0,05$)

3.2. Cálcio ionizado

A Tabela 3 mostra o valor médio da concentração sanguínea de iCa^{++} de cada grupo no *check-up* inicial e no *check-up* final. Foi observado um aumento da concentração sanguínea de iCa^{++} em todos os grupos entre o *check-up* inicial e o *check-up* final. No entanto, esta variação não foi estatisticamente significativa (grupo suplementado: $p=0,500$; grupo exposto à radiação: $p=0,461$; grupo controlo: $p=0,144$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na concentração sanguínea de iCa entre grupos ($p>0,05$).

Tabela 3. Concentração sanguínea de cálcio ionizado (iCa) (mmol/L) no início e no final do estudo (média $\pm$ D.P.).

Grupo	Suplemento (n=5)	Radiação (n=4)	Controlo (n=4)
iCa^{++} inicial	1,41 $\pm$ 0,14	1,31 $\pm$ 0,07	1,27 $\pm$ 0,08
iCa^{++} final	1,46 $\pm$ 0,12	1,40 $\pm$ 0,11	1,42 $\pm$ 0,17

($p>0,05$)

A Tabela 4 apresenta os valores médios dos restantes parâmetros analisados: concentração de sódio (Na^+), concentração de potássio (K^+), concentração de glucose (Glu), hematócrito (Hct), concentração de hemoglobina (Hgb), pH, pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2), pressão parcial de oxigénio (PO_2), excesso de base (BE), bicarbonato (HCO_3^-), dióxido de carbono total (TCO_2) e saturação de oxigénio (sO_2).

A concentração sanguínea de Na^+ aumentou em todos os grupos entre o início e o final do estudo, contudo as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). Inversamente, a concentração sanguínea de K^+ diminuiu entre o início e o final do estudo, no entanto as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). A concentração sanguínea de glucose não variou de maneira significativa entre o início e o final do estudo ($p>0,05$). Os valores do Hct aumentaram nos três grupos entre o início e o final do estudo, no entanto as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p>0,05$). A concentração sanguínea de Hgb aumentou em todos os grupos entre o início e o final do estudo, mas não de forma significativa ($p>0,05$). Nos restantes parâmetros (pH, PCO_2 , PO_2 , BE, HCO_3^- , TCO_2 e sO_2) não se verificaram variações significativas entre os valores iniciais e os valores finais dentro de cada grupo ($p>0,05$). Nenhum dos parâmetros avaliados apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 4. Valores iniciais e finais de Na⁺ (mmol/L), K⁺ (mmol/L), glucose (mg/dL), hematócrito (%PVC), hemoglobina (g/dl), pH (a 37°C), pCO₂ (mmHg), pO₂ (mmHg), BE (mmol/L), HCO₃ (mmol/L), TCO₂ (mmol/L) e sO₂ (%) (média ± D.P.).

Grupo	Suplemento (n=5)	Radiação (n=4)	Controlo (n=4)
Na ⁺ inicial (mmol/L)	126,80 ± 5,40	126,00 ± 2,94	120,00 ± 6,16
Na ⁺ final (mmol/L)	135,00 ± 10,05	132,75 ± 14,45	127,00 ± 12,93
K ⁺ inicial (mmol/L)	4,26 ± 1,16	3,60 ± 0,50	5,32 ± 1,02
K ⁺ final (mmol/L)	4,20 ± 0,51	3,48 ± 0,31	3,78 ± 0,22
Glucose inicial (mg/dl)	130,20 ± 42,80	103,50 ± 19,47	114,50 ± 19,12
Glucose final (mg/dl)	128,40 ± 20,76	117,25 ± 12,26	114,50 ± 13,80
Hematócrito inicial (%PVC)	26,20 ± 2,95	24,75 ± 2,22	22,25 ± 4,50
Hematócrito final (%PVC)	35,00 ± 10,22	25,25 ± 11,30	24,50 ± 10,22
Hemoglobina inicial (g/dl)	8,90 ± 1,02	8,50 ± 0,89	7,55 ± 1,54
Hemoglobina final (g/dl)	11,92 ± 3,49	9,73 ± 3,76	8,35 ± 3,49
pH inicial (37°C)	7,40 ± 0,19	7,51 ± 0,10	7,46 ± 0,15
pH final (37°C)	7,40 ± 0,20	7,58 ± 0,17	7,31 ± 0,17
pCO ₂ inicial (mmHg)	20,62 ± 3,27	20,50 ± 2,07	19,93 ± 4,09
pCO ₂ final (mmHg)	21,26 ± 4,12	20,13 ± 4,72	17,13 ± 6,12
pO ₂ inicial (mmHg)	109,60 ± 62,52	120,75 ± 48,31	145,25 ± 67,49
pO ₂ final (mmHg)	93,20 ± 28,08	116,50 ± 44,47	115,00 ± 47,07
BE inicial (mmol/L)	-11,20 ± 8,64	-6,25 ± 5,06	-9,50 ± 5,07
BE final (mmol/L)	-11,40 ± 7,09	-3,50 ± 5,80	-16,75 ± 7,04
HCO ₃ inicial (mmol/L)	13,66 ± 5,57	16,60 ± 3,51	14,25 ± 2,52
HCO ₃ final (mmol/L)	13,46 ± 3,89	18,65 ± 2,90	9,25 ± 4,59
TCO ₂ inicial (mmol/L)	14,40 ± 5,46	17,25 ± 3,30	14,75 ± 2,63
TCO ₂ final (mmol/L)	14,20 ± 3,70	19,25 ± 2,87	10,00 ± 4,16
sO ₂ inicial (%)	97,20 ± 1,79	98,50 ± 1,73	99,25 ± 0,96
sO ₂ final (%)	96,80 ± 1,30	98,75 ± 1,26	97,00 ± 2,58

(p>0,05)

4. DISCUSSÃO

A vitamina D é responsável pela regulação da concentração sanguínea de cálcio e fósforo (Fleet, 2018). Grande parte dos vertebrados produz vitamina D3 na pele através da sua exposição à radiação UV (Holick *et al.*, 2014). A importância da radiação UV na produção de vitamina D3 em espécies noturnas ou crepusculares continua a ser questionada. Vários estudos mostram que algumas destas espécies têm a capacidade de produzir vitamina D3 na pele e que as espécies diurnas com menor oportunidade de exposição à luz solar desenvolveram um mecanismo de adaptação que lhes permite sintetizar vitamina D3 de uma forma mais eficiente (Carman *et al.*, 2000; Baines *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2015; Bos, *et al.*, 2018; Gould *et al.*, 2018; Rutland *et al.*, 2019). Estudos realizados em Gecos leopardo concluíram que os animais desta espécie têm a capacidade de sintetizar vitamina D3 endogenamente. Os Gecos expostos a curtos períodos de radiação UV aumentaram significativamente a concentração sanguínea de calcidiol, quando comparados com Gecos sem exposição ou suplementos (Gould *et al.*, 2018). Outro estudo concluiu que Gecos leopardo expostos à radiação UV aumentaram a concentração de calcidiol para valores 3,2 vezes superiores aos animais que recebiam suplementos (Wangen *et al.*, 2013). No entanto, a importância fisiológica de valores mais elevados de calcidiol nesta espécie mantém-se desconhecida e, por isso, os resultados deste estudo podem ser pertinentes para compreender a importância de níveis mais elevados de vitamina D em Gecos leopardo.

As principais veias utilizadas para recolher amostras sanguíneas em lagartos são a veia coccígea central ou lateral, a veia abdominal ventral e a veia jugular externa (Divers, 2019). Um dos métodos mais utilizados é a colheita de sangue através da veia coccígea central ou lateral, no entanto esta técnica deve ser evitada em espécies com risco de autotomia da cauda (Di Giuseppe *et al.*, 2017; Knotkova *et al.*, 2019). Os Gecos leopardo pertencem a este grupo de espécies (Delorme *et al.*, 2012) e, por isso, esta técnica não foi utilizada. Outra técnica muito comum é a recolha de sangue através da veia abdominal ventral. Os lagartos possuem uma veia abdominal de grande calibre a nível da linha branca, no entanto este método de recolha apresenta possíveis complicações, tais como a perfuração do trato gastrointestinal ou da bexiga e hemorragias, devido à dificuldade de pressionar a veia para uma correta hemostase após a recolha (Divers, 2019). A venopunção cardíaca, apesar de ser uma técnica comumente utilizada em serpentes, não é segura em lagartos devido à dificuldade de estabilizar o coração e, por essa razão, não deve ser utilizada (Di Giuseppe *et al.*, 2017; Divers, 2019; Knotkova *et al.*, 2019). Em 2017, Di Giuseppe *et al.* descreveram uma técnica para a recolha de sangue na veia jugular externa de lagartos de pequenas dimensões. Nesta técnica, o animal deve ser contido manualmente com o pescoço e a cabeça estendidos e com uma ligeira rotação para o lado contralateral à veia jugular externa onde se vai recolher a amostra, e o membro anterior ipsilateral à veia

jugular deve ser tracionado caudalmente (Di Giuseppe *et al.*, 2017). Deste modo, o método escolhido foi a recolha através da veia jugular externa, uma vez que esta técnica é segura e rápida, e a contenção é facilmente realizada. O volume sanguíneo dos répteis varia entre 5 e 8% da massa corporal do animal. Assim sendo, em répteis saudáveis, a amostra recolhida não deve exceder os 0,4 a 0,8 mL por cada 100 g de massa corporal, ou seja, no máximo pode ser recolhido sangue equivalente a cerca de 1% da massa corporal do animal (Divers, 2019).

Um Geco leopardo fêmea do grupo dos animais expostos à radiação UV foi excluído do estudo ao fim de três semanas por apresentar uma diminuição acentuada (cerca de 25%) da massa corporal, disecdisse e a pele em mau estado. Para além destas alterações, os tutores notaram uma diminuição do apetite dos animais deste grupo e, apesar da diminuição não ter sido estatisticamente significativa, a massa corporal média do grupo de animais expostos à radiação UV diminuiu no decorrer das cinco semanas. Este efeito não se verificou em nenhum dos animais do grupo suplementado ou do grupo controlo, sugerindo que a diminuição do apetite poderá estar relacionada com a exposição à radiação UV. Apesar de serem raros, há vários casos descritos de intoxicação por vitamina D em répteis. Os sinais clínicos são pouco específicos e incluem depressão, anorexia e poliúria/polidipsia (Raiti & Garner, 2006; Boyer & Scott, 2019). Contudo, não há casos descritos de intoxicação por vitamina D em animais expostos à radiação UV devido aos mecanismos de defesa desenvolvidos pelo organismo para evitar o excesso de produção cutânea de colecalciferol (Holick *et al.*, 1981; MacLaughlin *et al.*, 1982; Webb *et al.*, 1989). Além da diminuição do apetite, os Gecos expostos à radiação não apresentaram outros sinais associados à intoxicação por vitamina D. Um estudo realizado em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) relatou que a exposição destes animais à radiação UV está na origem de vários efeitos adversos, sendo que um dos efeitos associados à exposição a radiação UV de baixa intensidade foi a diminuição da massa corporal dos animais (Lupu *et al.*, 2013). A exposição da pele à radiação UV estimula a produção da hormona estimulante dos melanócitos- α (α -MSH) que, além de ser responsável pela ativação da produção de melanina, é também responsável por suprimir o apetite (Rodrigues *et al.*, 2018; Baldini & Phelan, 2019). Com a exposição à radiação UV é expectável o aumento dos níveis de α -MSH, com possível diminuição do apetite e consequente diminuição da massa corporal. A radiação UV tem outros possíveis efeitos adversos. A exposição excessiva à radiação UV pode provocar queimaduras cutâneas que causam desconforto e dor (Lopes & McMahon, 2015). Num estudo não publicado sobre a influência da radiação UV em Gecos leopardo, Mitchell observou que animais expostos à radiação aumentaram a frequência da muda de pele e desenvolveram lesões cutâneas consistentes com queimaduras solares ligeiras (Watson, 2014). É possível que o mau estado geral observado na pele do Geco leopardo fêmea excluído do estudo fosse derivado de uma queimadura cutânea causada pela radiação. Isto pode ter acontecido quer por exposição excessiva, quer pela exposição a

radiação com uma intensidade elevada. No entanto, este animal, ao contrário dos Gecos do estudo realizado por Mitchell, não aumentou a frequência da muda da pele e, inclusive, não a estava a realizar corretamente. Com exceção deste animal, nenhum dos outros animais expostos à radiação UV manifestou sinais clínicos cutâneos.

O outro Geco excluído deste estudo foi um macho do grupo de controlo com cerca de cinco meses de idade que, ao fim de 30 dias, começou a apresentar sinais clínicos de MBD. MBD é um termo utilizado para descrever um conjunto de doenças que afetam a integridade e função dos ossos. A MBD mais comum em répteis é o NSHP que pode ter várias causas, sendo que uma causa comum é a deficiência em vitamina D ou cálcio (Carmel & Johnson, 2017; Lock, 2017). O Geco excluído do estudo não tinha acesso a radiação UV nem recebia suplementos, o que poderia resultar numa deficiência de vitamina D e, consequentemente, de cálcio. Contudo, geralmente, o aparecimento de sinais clínicos depende de uma deficiência prolongada (Boyer & Scott, 2019) e os restantes animais privados de radiação UV ou suplementos não desenvolveram sintomatologia. O aparecimento de sinais clínicos de MBD no Geco pode estar relacionado com a sua idade, uma vez que animais jovens e em crescimento ativo têm uma maior necessidade de cálcio e, por esse motivo, estão mais predispostos a desenvolver MBD (Carmel & Johnson, 2017; Boyer & Scott, 2019). Os restantes animais do grupo controlo tinham mais de um ano de idade tendo, possivelmente, uma menor necessidade de cálcio.

Um estudo realizado por Wangen *et al.* com o fim de aferir a influência da radiação UV na concentração sanguínea de calcidiol em Gecos leopardo mostrou que estes animais quando expostos a 12 horas de radiação UV diárias aumentam a concentração de calcidiol para valores significativamente superiores aos valores de animais que recebiam apenas suplementação alimentar (Gould *et al.*, 2018; Boyer & Scott, 2019). Gould *et al.* (2018) também realizou um estudo para avaliar a influência da radiação UV na concentração sanguínea de calcidiol em Gecos leopardo e concluiu que esta espécie tem a capacidade de sintetizar endogenamente vitamina D3 quando os animais são expostos a períodos de curta duração de radiação UV (2 horas), e aumentar os seus valores significativamente quando comparados com os valores de animais não expostos à radiação nem suplementados oralmente com vitamina D ou cálcio. O estudo teve a duração de trinta dias e nenhum animal apresentou efeitos adversos (Gould *et al.*, 2018). No presente estudo, a exposição à radiação UV ou a suplementação oral com vitamina D e cálcio não aumentaram de forma significativa a concentração de iCa^{++} , quando comparada com os valores de animais sem qualquer tipo de suplementação ou acesso à radiação UV.

A principal função da vitamina D é regular os níveis de cálcio sanguíneos. Deste modo, perante um balanço de cálcio negativo, ou seja, caso o cálcio obtido na alimentação não seja suficiente para compensar o cálcio perdido, a vitamina D atua em conjunto com a PTH para estimular a absorção intestinal de cálcio, aumentar a reabsorção renal de cálcio e estimular a reabsorção óssea, de forma a restaurar os valores normais de iCa^{++} sanguíneos.

A absorção intestinal é a principal fonte de cálcio do organismo e, por isso, essencial na sua homeostase. Para absorver quantidades suficientes de cálcio a nível intestinal é necessária uma dieta rica em cálcio ou uma dieta com valores mais baixos deste mineral acompanhada por concentrações suficientes de calcitriol que estimulam a sua absorção. O Geco leopardo é capaz de produzir vitamina D quando exposto à radiação UV, por isso, seria expectável um aumento significativo da concentração sanguínea de iCa^{++} após uma exposição diária de oito horas, secundário ao aumento de vitamina D3 produzida na pele.

No entanto, não há um consenso acerca da influência do calcidiol na absorção intestinal de cálcio. Alguns estudos concluíram que o aumento da concentração sanguínea de 25(OH)D resulta num aumento da absorção intestinal de cálcio (Heaney *et al.*, 1997; Heaney *et al.*, 2003; Aloia *et al.*, 2013), enquanto que outros autores não encontraram qualquer relação entre os dois fatores (Lewis *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2015). Need *et al.*, (2008) mostraram que a absorção intestinal de cálcio apenas acompanha o aumento da concentração de calcidiol enquanto esta concentração é insuficiente para manter a produção de calcitriol a nível renal, sugerindo que o aumento da concentração de calcidiol para valores superiores aos necessários para a produção adequada de calcitriol poderá não influenciar a absorção intestinal de cálcio. Assim, assumindo que os animais expostos à radiação aumentaram significativamente a concentração sanguínea de calcidiol quando comparados com os grupos sem radiação, como sugerem os estudos conduzidos por Wangen *et al.* (2013) e Gould *et al.* (2018), é possível que não se tenha verificado uma diferença significativa na concentração sanguínea de iCa^{++} entre os grupos pois as reservas de calcidiol dos Gecos não expostos à radiação foram suficientes para manter a produção adequada de calcitriol, assegurando uma absorção suficiente de cálcio. No estudo realizado por Gould *et al.* (2018), os Gecos estiveram expostos a duas horas de radiação diárias que resultaram num aumento significativo da concentração sanguínea de calcidiol. No presente estudo a exposição foi de oito horas diárias, o que pode ter conduzido à fotodegradação da vitamina D produzida. A radiação UV pode degradar até 95% da vitamina D produzida num período de três horas (Webb *et al.*, 1989). No entanto, Wangen *et al.* (2013), expuseram Gecos leopardo a 12 horas de radiação diárias e também observaram um aumento significativo da concentração de calcidiol sugerindo que, mesmo existindo fotodegradação, a produção cutânea seria suficiente para alterar os valores.

Os animais suplementados através da alimentação também não aumentaram significativamente a concentração de iCa^{++} . Isto pode ter acontecido porque a suplementação oral não foi adequada, ou, mais uma vez, porque as reservas de calcidiol já eram suficientes para manter a produção necessária de calcitriol. Quando o alimento vivo é pulverizado com o suplemento em pó (método utilizado no estudo e recomendado pela própria marca), caso não seja ingerido de imediato, este pode perder parte ou a totalidade do suplemento (Li *et al.*, 2009). Isto poderia resultar numa suplementação deficiente e, consequentemente, não eficaz. Para além disto, a administração de suplementação oral de

vitamina D em humanos é verdadeiramente eficaz apenas quando administrada diariamente (Hollis & Wagner, 2013). Caso a concentração de calcidiol fosse suficiente para assegurar a produção de calcitriol, um aumento do mesmo provavelmente não resultaria num aumento da concentração sanguínea de iCa^{++} .

Os animais do grupo controlo não receberam suplementação de vitamina D e cálcio, nem estiveram expostos à radiação UV. Desta forma, não tiveram acesso a fontes de vitamina D, nem a oportunidade de a produzir. Contudo não apresentaram variação nos valores de iCa^{++} durante o período de estudo, ou seja, foram capazes de manter estes valores apesar de não terem forma de obter vitamina D. Mais uma vez é possível que as reservas de vitamina D destes animais fossem suficientes para manter uma produção adequada de calcitriol e, consequentemente, manter os níveis de iCa^{++} necessários para as funções fisiológicas dos Gecos. Os Dragões barbudos conseguem manter a concentração sanguínea tanto de calcidiol, como de calcitriol, durante um período de até 83 dias após o fim da exposição à radiação UV (Oonincx *et al.*, 2013). Este estudo teve a duração de 35 dias e na semana que antecedeu o primeiro *check-up* nenhum animal recebeu suplementos ou esteve exposto à radiação UV, sugerindo que o Geco leopardo consegue assegurar a concentração sanguínea de iCa^{++} e, possivelmente a concentração dos metabolitos da vitamina D, durante pelo menos 42 dias. No entanto, a quantidade de cálcio presente na alimentação do grupo controlo dificilmente seria suficiente para manter os níveis de cálcio adequados (Bernard *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2009) sem recorrer à reabsorção óssea e causar uma possível MBD. A curta duração do estudo pode ter condicionado o aparecimento de sinais clínicos de MBD neste grupo.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os Gecos leopardo têm a capacidade de manter os níveis de iCa^{++} , sem qualquer tipo de suplementação, durante pelo menos 42 dias sem desenvolverem sinais de MBD, exceto em situações que requeiram uma maior quantidade deste mineral, como é o caso em animais em crescimento. Os Gecos expostos à radiação UV ou com suplementação oral de vitamina D e cálcio, apesar de um provável aumento da concentração sanguínea de calcidiol, não aumentaram a concentração sanguínea de iCa^{++} . Assim, apesar dos Gecos suplementados não terem beneficiado com a suplementação oral ou com a exposição à radiação UV, provavelmente é importante que, a longo prazo, tenham acesso a uma fonte de vitamina D e a uma alimentação com valores de cálcio adequados, de forma a evitar o desenvolvimento de MBD. Novos estudos devem ser realizados para avaliar a importância e influência da radiação UV e da suplementação oral na manutenção da concentração de iCa^{++} a longo prazo, para que seja possível melhorar continuamente as condições ambientais destes animais cada vez mais comuns em cativeiro.

6. BIBLIOGRAFIA

- Acierno, M. J., Mitchell, M. A., Roundtree, M. K., & Zachariah, T. T. (2006). Effects of ultraviolet radiation on 25-hydroxyvitamin D3 synthesis in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *American Journal of Veterinary Research*, 67(12), 2046–2049. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.12.2046>.
- Acierno, M. J., Mitchell, M. A., Zachariah, T. T., Roundtree, M. K., Kirchgessner, M. S., & Guzman, D. S. M. (2008). Effects of ultraviolet radiation on plasma 25-hydroxyvitamin D3 concentrations in corn snakes (*Elaphe guttata*). *American Journal of Veterinary Research*, 69(2), 294–297. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.2.294>.
- Adkins, E., Driggers, T., Ferguson, G., Gehrmann, W., Gyimesi, Z., May, E., Ogle, M., Owens, T., & Klaphake, E. (2003). Ultraviolet Light and Reptiles, Amphibians. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 13(4), 27–37. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.13.4.27>.
- Allen, M. E., Chen, T. C., Holick, M. F., & Merkel, E. (1999). Evaluation of Vitamin D Status in the Green Iguana (*Iguana iguana*): Oral Administration vs UVB Exposure. *Biologic Effects of Light 1998*, 99–101. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5051-8_17.
- Allen, M., & Oftedal, O. (1989). Dietary Manipulation of the Calcium Content of Feed Crickets. Allen, Mary E. and Oftedal, Olav T., 20(1), 26.
- Aloia, J. F., Dhaliwal, R., Shieh, A., Mikhail, M., Fazzari, M., Ragolia, L., & Abrams, S. A. (2014). Vitamin D supplementation increases calcium absorption without a threshold effect. *American Journal of Clinical Nutrition*, 99(3), 624–631. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.067199>.
- Angilletta, M. J., Montgomery, L. G., & Werner, Y. L. (1999). Temperature preference in geckos: Diel variation in juveniles and adults. *Herpetologica*, 55(2), 212–222.
- Autumn, K., & Nardo, D. F. De. (1995). Behavioral Thermoregulation Increases Growth Rate in a Nocturnal Lizard. *Journal of Herpetology*, 29(2), 157–162.
- Baines, F., Beveridge, A., Hitch, R., & Lane, R. (2006). The Transmission of Ultraviolet Light through Reptile Skin Shed. <http://uvvguide.co.uk/skintests.htm>.

Baines, F., Chattell, J., Dale, J., Garrick, D., Gill, I., Goetz, M., Skelton, T., & Swatman, M. (2016). How much UV-B does my reptile need? The UV-Tool , a guide to the selection of UV lighting for reptiles and amphibians in captivity. *Journal of Zoo and Aquarium Research*, 4(1), 42–63.

Baldini, G., & Phelan, K. D. (2019). The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. *Journal of Endocrinology*, 241(1), 1–33. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0596>.

Bartlett, R. D., & Bartlett, P. P. (1995). *Geckos: A Complete Pet Owner's Manual*. In *Geckos: A Complete Pet Owner's Manual* (1st ed.). Barron's Educational Series, Inc.

Bernard, J., Oftedal, O. T., Barboza, P. S., Mathias, C. E., Allen, M. E., Citino, S. B., Ullrey, D. E., & Montali, R. J. (2002). Response Of Vitamin D-Deficient Green Iguanas (*Iguana Iguana*) To Artificial Ultraviolet Light, The. January, 1–4.

Bernard, J. B., & Allen, M. E. (1997). Feeding captive insectivorous animals: nutritional aspects of insects as food. *Animal Science*, 25(August), 1–7.

Bonke, R., Böhme, W., Opiela, K., & Rödder, D. (2011). A remarkable case of cannibalism in juvenile leopard geckos, *Eublepharis macularius* (Blyth, 1854) (Squamata: Eublepharidae). *Herpetology Notes*, 4(1), 211–212.

Bos, J. H., Klip, F. C., & Oonincx, D. G. A. B. (2018). Artificial Ultraviolet B Radiation Raises Plasma 25-Hydroxyvitamin D 3 Concentrations in Burmese Pythons (*Python Bivittatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49(3), 810–812. <https://doi.org/10.1638/2017-0243.1>.

Boskey, A. L. (2018). Mineralization in Mammals. In D. Feldman, J. W. Pike, R. Bouillon, E. Giovannucci, D. Goltzman, & M. Hewison (Eds.), *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 383–403). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00023-9>.

Bouillon, R., Van Baelen, H., Keng Tan, B., & De Moor, P. (1980). The isolation and characterization of the 25-hydroxyvitamin D-binding protein from chick serum. *Journal of Biological Chemistry*, 255(22), 10925–10930.

Bouillon, R., & Pauwels, S. (2017). The Vitamin D-Binding Protein. In D. Feldman, J. W. Pike, R. Bouillon, E. Giovannucci, D. Goltzman, & M. Hewison (Eds.), *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 97–155). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00007-0>.

Boyer, T., Garner, M., Reavill, D., & Steffes, Z. (2013). Common problems of leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 117–125.

Boyer, T. H., & Scott, P. W. (2019). Nutritional Diseases. In S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd ed., pp. 932–950). Elsevier Inc.

Breidenbach, A., Schlumbohm, C., & Harmeyer, J. (1998). Peculiarities of vitamin D and of the calcium and phosphate homeostatic system in horses. *Veterinary Research*, 29(2), 173–186. [https://doi.org/10.1016/S0928-4249\(98\)80084-9](https://doi.org/10.1016/S0928-4249(98)80084-9).

Bulat, V., Situm, M., Dediol, I., Ljubicić, I., & Bradić, L. (2011). The mechanisms of action of phototherapy in the treatment of the most common dermatoses. *Collegium Antropologicum*, 35 Suppl 2, 147–151. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22220423>.

Bunker, J. W. M., Harris, R. S., & Mosher, L. M. (1940). Relative Efficiency of Active Wave Lengths of Ultraviolet in Activation of 7-Dehydrocholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, 62(3), 508–511. <https://doi.org/10.1021/ja01860a013>.

Burger, M. R., Gehrmann, W. H., & Ferguson, G. W. (2007). Evaluation of UVB Reduction by Materials Commonly Used in Reptile Husbandry. *Zoo Biology*, 26(2), 417–423. <https://doi.org/10.1002/zoo.20148>.

Carman, E. N., Ferguson, G. W., Gehrmann, W. H., Chen, T. C., & Holick, M. F. (2000). Photobiosynthetic Opportunity and Ability for UV-B Generated Vitamin D Synthesis in Free-Living House Geckos (*Hemidactylus turcicus*) and Texas Spiny Lizards (*Sceloporus olivaceus*). *Copeia*, 2000(1), 245–250. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)2000\[0245:POAAFU\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)2000[0245:POAAFU]2.0.CO;2).

Carmel, B., & Johnson, R. (2017). Nutritional and metabolic diseases. *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice*, 3, 185–195. <https://doi.org/10.1002/9781118977705.ch15>.

Carmeliet, G. (2018). Vitamin D and Bone: An Integrated Approach. In D. Feldman, J. W. Pike, R. Bouillon, E. Giovannucci, D. Goltzman, & M. Hewison (Eds.), *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 419–433). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00025-2>.

Catania, A., Lonati, C., Sordi, A., Carlin, A., Leonardi, P., & Gatti, S. (2010). The melanocortin system in control of inflammation. *TheScientificWorldJournal*, 10, 1840–1853. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.173>.

Charoenngam, N., Shirvani, A., & Holick, M. F. (2019). Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 10(6), 1082–1093. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.07.004>.

Chen, T. C., Chimeh, F., Lu, Z., Mathieu, J., Person, K. S., Zhang, A., Kohn, N., Martinello, S., Berkowitz, R., & Holick, M. F. (2007). Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460(2), 213–217. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.12.017>.

Chen, T., Lu, Z., & Holick, M. F. (2010). Photobiology of Vitamin D, in: M.F. Holick (Ed.), *Vitamin D. Molecular Biology and Clinical Application*, 25(1), 175–187. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-303-9>.

Cline, J. (2012). Calcium and Vitamin D Metabolism, Deficiency, and Excess. *Topics in Companion Animal Medicine*, 27(4), 159–164. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2012.09.004>.

Corbee, R. J., Vaandrager, A. B., Kik, M. J., Molenaar, M. R., & Hazewinkel, H. A. W. (2008). Cutaneous vitamin D synthesis in carnivorous species. *European Society of Veterinary and Comparative Nutrition*, 96(1), 1.

Dahlback, H., & Wikvall, K. (1988). 25-Hydroxylation of vitamin D₃ by a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria. *Biochemical Journal*, 252(1), 207–213. <https://doi.org/10.1042/bj2520207>.

Darwin, E., Arora, H., Hirt, P. A., Wikramanayake, T. C., & Jimenez, J. J. (2018). A review of monochromatic light devices for the treatment of alopecia areata. *Lasers in Medical Science*, 33(2), 435–444. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2412-6>.

De Luca, H. F. (2018). Historical Overview of Vitamin D. In D. Feldman, J. W. Pike, R. Bouillon, E. Giovannucci, D. Goltzman, & M. Hewison (Eds.), *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 3–12). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00001-X>.

De Luca, D. A., Zambrano, E. A., Galimberti, R. L., & Enz, P. A. (2018). The Effectiveness of a Twice-weekly Narrowband Ultraviolet B Phototherapy Schedule in Early-stage Mycosis

Fungoides in a Cohort of 18 Argentinian Patients. *Actas Dermo-Sifiliográficas* (English Edition), 109(10), 922–924. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2018.07.015>.

de Vosjoli, P., Mazorlig, T., Klingenberg, R., Tremper, R., & Viets, B. E. (2017). *The Leopard Gecko Manual: Expert Advice for Keeping and Caring for a Healthy Leopard Gecko* (2nd ed.). Fox Chapel Publishers International Ltd.

Dee, T., & Hovda, L. R. (2012). Cholecalciferol rodenticide toxicosis. *Veterinary Technician*, 33(1), 3–6.

Delorme, S. L., Lungu, I. M., & Vickaryous, M. K. (2012). Scar-Free Wound Healing and Regeneration Following Tail Loss in the Leopard Gecko, *Eublepharis macularius*. *Anatomical Record*, 295(10), 1575–1595. <https://doi.org/10.1002/ar.22490>.

Dereje, S., Muradov, I., Nazzal, S., & Nguyen, T. (2017). Cholecalciferol (D3) Versus Ergocalciferol (D2) in Older Adults. *The Consultant Pharmacist*, 32(6), 337–339.

Di Giuseppe, M., Martínez-Silvestre, A., Luparello, M., & Faraci, L. (2017). Post-ovulatory dystocia in two small lizards: Leopard gecko (*eublepharis macularius*) and crested gecko (*correlophus ciliatus*). *Russian Journal of Herpetology*, 24(2), 128–132. <https://doi.org/10.30906/1026-2296-2019-24-2-128-132>.

Divers, S. J. (2019). Diagnostic Techniques and Sample Collection. In S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd ed., pp. 405–421). Elsevier.

Eatwell, K. (2008). Plasma concentrations of 25-hydroxycholecalciferol in 22 captive tortoises (*Testudo* species). *Veterinary Record*, 162(11), 342–345. <https://doi.org/10.1136/vr.162.11.342>.

Emerson, J. A., Whittington, J. K., Allender, M. C., & Mitchell, M. A. (2014). Effects of ultraviolet radiation produced from artificial lights on serum 25-hydroxyvitamin d concentration in captive domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculi*). *American Journal of Veterinary Research*, 75(4), 380–384. <https://doi.org/10.2460/ajvr.75.4.380>.

Engelking, L. R. (2015). Vitamin D. In *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry* (3rd ed., pp. 288–293). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50045-1>.

Feily, A., Rafeie, E., Rassai, S., & Ramirez-Fort, M. (2014). Adjuvant narrow band UVB improves the efficacy of oral azithromycin for the treatment of moderate to severe inflammatory facial acne vulgaris. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 7(3), 151. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.146664>.

Fell, G. L., Robinson, K. C., Mao, J., Woolf, C. J., & Fisher, D. E. (2014). Skin β -endorphin mediates addiction to UV light. *Cell*, 157(7), 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.032>.

Ferguson, G. W., Jones, J. R., Gehrmann, W. H., & Hammack, S. H. (1996). Indoor husbandry of the panther chameleon *Chamaeleo (furcifer) pardalis*. Effects of dietary vitamins A and D and UVR on pathology and life-history traits.pdf. 299, 279–299.

Ferguson, G. W., Gehrmann, W. H., Bradley, K. A., Lawrence, B., Hartdegen, R., Storms, T., Chen, T., & Holick, M. F. (2015). Summer and Winter Seasonal Changes in Vitamin D Status of Captive Rhinoceros Iguanas (*Cyclura cornuta*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 25, 128–136.

Ferguson, G. W., Gehrmann, W. H., Karsten, K. B., Hammack, S. H., McRae, M., Chen, T. C., Lung, N. P., & Holick, M. F. (2003). Do panther chameleons bask to regulate endogenous vitamin D₃ production? *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(1), 52–59. <https://doi.org/10.1086/374276>.

Ferguson, G. W., Gehrmann, W. H., Karsten, K. B., Landwer, A. J., Carman, E. N., Chen, T. C., & Holick, M. F. (2005). Ultraviolet exposure and vitamin D synthesis in a sun-dwelling and a shade-dwelling species of *Anolis*: Are there adaptations for lower ultraviolet B and dietary vitamin D₃ availability in the shade? *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(2), 193–200. <https://doi.org/10.1086/427055>.

Finke, M. D., & Oonincx, D. (2013). Insects as Food for Insectivores. In *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00017-0>.

Fleet, J. C. (2018). Regulation of Intestinal Calcium and Phosphate Absorption. In D. Feldman, J. W. Pike, R. Bouillon, E. Giovannucci, D. Goltzman, & M. Hewison (Eds.), *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 329–342). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00020-3>.

- Flores, D. L., & Crews, D. (1995). Effect of Hormonal Manipulation on Sociosexual Behavior in Adult Female Leopard Geckos (*Eublepharis macularius*), a Species with Temperature-Dependent Sex Determination. *Hormones and Behavior*, 29(4), 458–473. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1995.1277>.
- Flores, D., Tousignant, A., & Crews, D. (1994). Incubation temperature affects the behavior of adult leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Physiology and Behavior*, 55(6), 1067–1072. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90389-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90389-1).
- Furuhashi, T., Torii, K., Ikumi, K., Kato, H., Nishida, E., & Morita, A. (2020). Ultraviolet A1 phototherapy for the treatment of localized scleroderma. *Journal of Dermatology*, March, 1–4. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15368>.
- Gardiner, D. W., Baines, F. M., & Pandher, K. (2009). Photodermatitis and Photokeratoconjunctivitis in a Ball Python (*Python regius*) and a Blue-Tongue Skink (*Tiliqua* spp.). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(4), 757–766. <https://doi.org/10.1638/2009-0007.1>.
- Gillespie, D., Frye, F. L., Stockham, S. L., & Fredeking, T. (2000). Blood values in wild and captive Komodo dragons (*Varanus komodoensis*). *Zoo Biology*, 19(6), 495–509. [https://doi.org/10.1002/1098-2361\(2000\)19:6<495::AID-ZOO2>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1098-2361(2000)19:6<495::AID-ZOO2>3.0.CO;2-1).
- Giuliano, A. R., & Wood, R. J. (1991). Vitamin D-regulated calcium transport in Caco-2 cells: Unique in vitro model. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 260(2 23-2). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1991.260.2.G207>.
- Göring, H. (2018). Vitamin D in Nature: A Product of Synthesis and/or Degradation of Cell Membrane Components. *Biochemistry (Moscow)*, 83(11), 1350–1357. <https://doi.org/10.1134/S0006297918110056>.
- Gould, A., Molitor, L., Rockwell, K., Watson, M., & Mitchell, M. A. (2018). Evaluating the Physiologic Effects of Short Duration Ultraviolet B Radiation Exposure in Leopard Geckos (*Eublepharis macularius*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 28(1), 34. <https://doi.org/10.5818/17-11-136.1>.
- Haddad, J. G., Hillman, L., & Rojanasathit, S. (1976). Human serum binding capacity and affinity for 25-hydroxyergocalciferol and 25-hydroxycholecalciferol. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 43(1), 86–91. <https://doi.org/10.1210/jcem-43-1-86>.

- Hansen, K. E., Johnson, R. E., Chambers, K. R., Johnson, M. G., Lemon, C. C., Vo, T. N. T., & Marvdashti, S. (2015). Treatment of Vitamin D insufficiency in postmenopausal women: A randomized clinical trial. *JAMA Internal Medicine*, 175(10), 1612–1621. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.3874>.
- Hassani, J., & Feldman, S. R. (2016). Phototherapy in Scleroderma. In *Dermatology and Therapy* (Vol. 6, Issue 4). Springer Healthcare. <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0136-3>.
- Hathaway, J. A., & Sliney, D. H. (2016). Visible Light and Infrared Radiation. *Physical and Biological Hazards of the Workplace*, 203–208. <https://doi.org/10.1002/9781119276531.ch13>.
- Heaney, R. P., Barger-Lux, M. J., Dowell, M. S., Chen, T. C., & Holick, M. F. (1997). Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12), 4111–4116. <https://doi.org/10.1210/jc.82.12.4111>.
- Heaney, R. P., Dowell, M. S., Hale, C. A., & Bendich, A. (2003). Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin d. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(2), 142–146. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719287>.
- Heckers, K. O., & Aupperle, H. (2014). Pigment-forming tumors in reptiles: light regime and its dark sides. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 31–35.
- Heckers, K. O., Aupperle, H., Schmidt, V., & Pees, M. (2012). Melanophoromas and Iridophoromas in Reptiles. *Journal of Comparative Pathology*, 146(2–3), 258–268. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.07.003>.
- Hedley, J., & Eatwell, K. (2013). The effects of UV light on calcium metabolism in ball pythons (*Python regius*). *Veterinary Record*, 173(14), 345. <https://doi.org/10.1136/vr.101555>.
- Hoby, S., Wenker, C., Robert, N., Jermann, T., Hartnack, S., Segner, H., Aebischer, C.-P., & Liesegang, A. (2010). Nutritional Metabolic Bone Disease in Juvenile Veiled Chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) and Its Prevention. *The Journal of Nutrition*, 140(11), 1923–1931. <https://doi.org/10.3945/jn.110.120998>.
- Holick, M. F., MacLaughlin, J. A., & Doppelt, S. H. (1981). Regulation of Cutaneous Previtamin D3 Photosynthesis in Man: Skin Pigment is not an Essential Regulator. *American Association for the Advancement of Science*, 211(4482), 590–593.

- Holick, M. F., Tian, X. Q., & Allen, M. (1995). Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3124–3126. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3124>.
- Holick, M. . (2004). Vitamin D : importance in the prevention of cancers , type 1 diabetes ,. *The American Journal of Clinical Nutrition*, February, 362–371.
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D Deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 357(3), 266–281. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0987-2.00009-1>.
- Holick, M. F. (2014). How Much Sunlight Do We Need? In J. Reicharth (Ed.), *Sunlight, Ultraviolet Radiation, Vitamin D and Skin Cancer* (2nd ed., pp. 1–16). Landes Bioscience and Springer Science Business Media.
- Holick, M. F. (2018). Photobiology of Vitamin D. In D. Feldman, J. W. Pike, R. Bouillon, E. Giovannucci, D. Goltzman, & M. Hewison (Eds.), *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 45–55). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00004-5>.
- Hollis, B. W., & Wagner, C. L. (2013). The role of the parent compound vitamin d with respect to metabolism and function: Why clinical dose intervals can affect clinical outcomes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(12), 4619–4628. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2653>.
- Holmes, S. P., & Divers, S. J. (2019). Radiography - Lizards. In *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd ed., pp. 491–502). Elsevier Inc..
- Honkavaara, J., Koivula, M., Korpimäki, E., Siitari, H., & Viitala, J. (2002). Ultraviolet vision and foraging in terrestrial vertebrates- Honkavaara et al. 2002.pdf. *Oikos*, 505(February), 505–511.
- Hosseini-Nezhad, A., & Holick, M. F. (2013). Vitamin D for health: A global perspective. *Mayo Clinic Proceedings*, 88(7), 720–755. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.05.011>.
- How, K. L., Hazewinkel, H. A. W., & Mol, J. A. (1994). Dietary Vitamin D Dependence of Cat and Dog Due to Inadequate Cutaneous Synthesis of Vitamin D. *General And Comparative Endocrinology*, 96, 12–18.

- Hoy, D. A., Ramberg, C. F., & Horst, R. L. (1988). Evidence that discrimination against ergocalciferol by the chick is the result of enhanced metabolic clearance rates for its mono- and dihydroxylated metabolites. *Journal of Nutrition*, 118(5), 633–638. <https://doi.org/10.1093/jn/118.5.633>.
- Huang, V., & Crews, D. (2012). Differences induced by incubation temperature, versus androgen manipulation, in male leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Physiology and Behavior*, 107(1), 121–124. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.014>.
- Huang, V., Hemmings, H. C., & Crews, D. (2014). Sociosexual investigation in sexually experienced, hormonally manipulated male leopard geckos: Relation with phosphorylated DARPP-32 in dopaminergic pathways. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 321(10), 595–602. <https://doi.org/10.1002/jez.1891>.
- Hymøller, L., & Jensen, S. K. (2010). Vitamin D3 synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 2025–2029. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2991>.
- IUCN, G. S. P. R. L. U. (n.d.). IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/search?query=leopard%20gecko&searchType=species>.
- Jablonski, N. G., & Chaplin, G. (2000). The evolution of human skin coloration. *Journal of Human Evolution*, 39(1), 57–106. <https://doi.org/10.1006/jhev.2000.0403>.
- Jakobsen, S. S., Nielsen, J. P., & Jakobsen, J. (2020). Effect of UVB light on vitamin D status in piglets and sows. *Journal Of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, February. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105637>.
- Jones, G., Prosser, D. E., & Kaufmann, M. (2018). The Activating Enzymes of Vitamin D Metabolism (25- and 1 α -Hydroxylases). In *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 57–79). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00005-7>.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2013). *Pele e Anexos*. In *Histologia Básica* (12th ed., pp. 354–365). Guanabara Koogan Ltda.
- Juzeniene, A., & Moan, J. (2012). Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. *Dermato-Endocrinology*, 4(2), 109–117. <https://doi.org/10.4161/derm.20013>.

Kale, M. S., Dittmer, K. E., Roe, W. D., & Gartrell, B. D. (2018). Interspecies differences in plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D3 and dermal Vitamin D synthesis of kiwi (*Apteryx mantelli*), tuatara (*Sphenodon punctatus*), and New Zealand sea lions (*Phocarctos hookeri*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 188(2), 325–331. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1117-2>.

Karsten, K. B., Ferguson, G. W., Chen, T., & Holick, M. F. (2009). Panther chameleons, *furcifer pardalis*, behaviorally regulate optimal exposure to UV depending on dietary vitamin D status. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(3), 218–225. <https://doi.org/10.1086/597525>.

Kenny, D. E., Irlbeck, N. A., Chen, T. C., Lu, Z., & Holick, M. F. (1998). Determination of vitamins D, A, and E in Sera and vitamin D in milk from captive and free-ranging polar bears (*Ursus maritimus*), and 7-dehydrocholesterol levels in skin from captive polar bears. *Zoo Biology*, 17(4), 285–293. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2361\(1998\)17:4<285::AID-ZOO3>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2361(1998)17:4<285::AID-ZOO3>3.0.CO;2-5).

Khan, M. S. (2016). Leopard gecko *Eublepharis macularius* from Pakistan Reptilia Natural history and biology of hobbyist choice leopard gecko *Eublepharis macularius* Muhammad Sharif Khan Herpetological Laboratory , Address for communication : Apt # A17. January 2009.

Knotkova, Z., Morici, M., Oliveri, M., & Knotek, Z. (2019). Blood profile in captive adult male leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Veterinari Medicina*, 64(4), 172–177. <https://doi.org/10.17221/164/2018-VETMED>.

Kratochvíl, L., & Frynta, D. (2002). Body size, male combat and the evolution of sexual dimorphism in eublepharid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 76(2), 303–314. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00064.x>.

Larner, D. P., Adams, J. S., & Hewison, M. (2018). Regulation of Renal and Extrarenal 1 α -Hydroxylase. In *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 117–137). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00008-2>.

Lewis, R. D., Laing, E. M., Hill Gallant, K. M., Hall, D. B., McCabe, G. P., Hausman, D. B., Martin, B. R., Warden, S. J., Peacock, M., & Weaver, C. M. (2013). A randomized trial of vitamin D3 supplementation in children: Dose-Response effects on vitamin D metabolites and calcium absorption. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(12), 4816–4825. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2728>.

Li, H., Vaughan, M. J., & Browne, R. K. (2009). A complex enrichment diet improves growth and health in the endangered Wyoming Toad (*Bufo baxteri*). *Zoo Biology*, 28(3), 197–213. <https://doi.org/10.1002/zoo.20223>.

Lock, B. (2017, May). Nutritional Secondary Hyperparathyroidism in Reptiles. Veterinary Information Network, Inc. <https://veterinarypartner.vin.com/default.aspx?pid=19239&catId=102919&id=8012396>.

Löfgren, S. (2017). Solar ultraviolet radiation cataract. *Experimental Eye Research*, 156, 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.05.026>.

Lopes, D. M., & McMahon, S. B. (2016). Ultraviolet Radiation on the Skin: A Painful Experience? *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 22(2), 118–126. <https://doi.org/10.1111/cns.12444>.

Lupu, C., & Robins, S. (2013). Determination of a Safe and Effective Ultraviolet B Radiant Dose in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): A Pilot Study. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 27(4), 269–279. <https://doi.org/10.1647/2011-0291>.

MacLaughlin, J. . A. ., Anderson, R. R., & Holick, M. . F. . (1982). Spectral Character of Sunlight Modulates Photosynthesis of Previtamin D3 and its Photoisomers in Human Skin. 216(4549), 1001–1003.

Manning, B., & Grigg, G. C. (1997). Basking Is Not of Thermoregulatory Significance in the “Basking” Freshwater Turtle *Emydura signata*. *Copeia*, 1997(3), 579. <https://doi.org/10.2307/1447562>.

Marx, S. J., Jones, G., Weinstein, R. S., Chrousos, G. P., & Renquist, D. M. (1989). Differences in mineral metabolism among nonhuman primates receiving diets with only vitamin D3 or only vitamin D2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 69(6), 1282–1290. <https://doi.org/10.1210/jcem-69-6-1282>.

McCollum, E. V, Simmonds, N., & Ernestine, J. (1922). An Experimental Demonstration of the Existence of a Vitamin Which Promotes Calcium Deposition. *The Journal of Biological Chemistry*, 53, 293–312.

- McDonald, R. P., & Vickaryous, M. K. (2018). Evidence for neurogenesis in the medial cortex of the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27880-6>.
- McLean, K. E., & Vickaryous, M. K. (2011). A novel amniote model of epimorphic regeneration: The leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *BMC Developmental Biology*, 11(August). <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-50>.
- Miles, S. (2017). Common conditions in leopard geckos (*Eublepharis macularius*). *Companion Animal*, 22(9), 546–551. <https://doi.org/10.12968/coan.2017.22.9.546>.
- Mirza, Z. A., Sanap, R. V., Raju, D., Gawai, A., & Ghadekar, P. (2014). A new species of lizard of the genus *Eublepharis* (Squamata: Eublepharidae) from India. *Phyllomedusa*, 13(2), 75–90. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v13i2p75-90>.
- Modenese, A., Korpinen, L., & Gobba, F. (2018). Solar radiation exposure and outdoor work: An underestimated occupational risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102063>.
- Morris, J. G. (1999). Ineffective Vitamin D Synthesis in Cats Is Reversed by an Inhibitor of 7-Dehydrocholesterol- Δ^7 -Reductase. *The Journal of Nutrition*, 129(4), 903–908. <https://doi.org/10.1093/jn/129.4.903>.
- Murray, M. J. (2006). Cardiology. In *Reptile Medicine and Surgery* (2nd ed., pp. 181–195). Elsevier Inc..
- Nagpal, S., Na, S., & Rathnachalam, R. (2005). Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine Reviews*, 26(5), 662–687. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0002>.
- Nakamichi, Y., Takahashi, N., Udagawa, N., & Suda, T. (2018). Osteoclastogenesis and Vitamin D. In D. Feldman, J. W. Pike, R. Bouillon, E. Giovannucci, D. Goltzman, & M. Hewison (Eds.), *Vitamin D: Fourth Edition: Vol. 1: Biochem* (4th ed., pp. 309–317). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809965-0.00018-5>
- Nakashima, N. (2016). Regeneration of dermal patterns from the remaining pigments after surgery in *Eublepharis macularius* (a case report). *BMC Veterinary Research*, 12(1), 10–13. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0765-x>.

- Narbutt, J., Holdrowicz, A., & Lesiak, A. (2017). Morphea - Selected Local treatment methods and their effectiveness. *Reumatologia*, 55(6), 305–313. <https://doi.org/10.5114/reum.2017.72628>.
- Need, A. G., O'Loughlin, P. D., Morris, H. A., Coates, P. S., Horowitz, M., & Nordin, B. E. C. (2008). Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(11), 1859–1863. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080607>.
- Nemeth, M. V., Wilkens, M. R., & Liesegang, A. (2017). Vitamin D status in growing dairy goats and sheep: Influence of ultraviolet B radiation on bone metabolism and calcium homeostasis. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 8072–8086. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13061>.
- O'Malley, B. (2005). General anatomy and physiology of reptiles. In B. O'Malley (Ed.), *Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species* (1st ed., pp. 17–39). Elsevier Ltd..
- O'Malley, B. (2008). Nutritional Problems in Reptiles. *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*.
- Oonincx, D. G. A. B., Stevens, Y., van den Borne, J. J. G. C., van Leeuwen, J. P. T. M., & Hendriks, W. H. (2010). Effects of vitamin D3 supplementation and UVb exposure on the growth and plasma concentration of vitamin D3 metabolites in juvenile bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 156(2), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.02.008>.
- Oonincx, D. G. A. B., Van De Wal, M. D., Bosch, G., Stumpel, J. B. G., Heijboer, A. C., van Leeuwen, J. P. T. M., Hendriks, W. H., & Kik, M. (2013). Blood vitamin D 3 metabolite concentrations of adult female bearded dragons (*Pogona vitticeps*) remain stable after ceasing UVb exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 165(3), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.04.006>.
- Oren, M., & Bartek, J. (2007). The Sunny Side of p53. *Cell*, 128(5), 826–828. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.027>.
- Ortiz-Salvador, J. M., & Pérez-Ferriols, A. (2017). Phototherapy in atopic dermatitis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 996, 279–286. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_23.

- Pansu, D., Bellaton, C., & Bronner, F. (1981). Effect of Ca intake on saturable and nonsaturable components of duodenal Ca transport. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 3(1), 32–37. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1981.240.1.g32>.
- Pansu, D., Bellaton, C., Roche, C., & Bronner, F. (1983). Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects of vitamin D. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 7(6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1983.244.6.g695>.
- Peacock, H. M., Gilbert, E. A. B., & Vickaryous, M. K. (2015). Scar-free cutaneous wound healing in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Anatomy*, 227(5), 596–610. <https://doi.org/10.1111/joa.12368>.
- Penning, M. R. (2012). Diet Supplementation in Reptiles: Prevention and Treatment of Common Disorders. NAVC Conference 2012 Small Animal.
- Pokorná, M., Rábová, M., Ráb, P., Ferguson-Smith, M. A., Rens, W., & Kratochvíl, L. (2010). Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosome Research*, 18(7), 809–820. <https://doi.org/10.1007/s10577-010-9154-7>.
- Polzonetti, V., Pucciarelli, S., Vincenzetti, S., & Polidori, P. (2020). Dietary Intake of Vitamin D from Dairy Products Reduces the Risk of Osteoporosis. *Nutrients*, 12(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu12061743>.
- Putz, O., & Crews, D. (2006). Embryonic origin of mate choice in a lizard with temperature-dependent sex determination. *Developmental Psychobiology*, 48(1), 29–38. <https://doi.org/10.1002/dev.20109>.
- Raiti, P., & Garner, M. M. (2006). Metastatic Mineralization in a Geoffrey's Side-Necked Turtle, *Phrynops geoffroanus*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 16(4), 135–139. <https://doi.org/10.5818/1529-9651.16.4.135>.
- Rashighi, M., & Harris, J. E. (2017). Vitiligo Pathogenesis and Emerging Treatments. *Dermatologic Clinics*, 35(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.11.014>.
- Rawat, Y. B., Bahadur Thapa, K., Bhattarai, S., & Shah, K. B. (2019). First Records of the Common Leopard Gecko, *Eublepharis macularius* (Blyth 1854) (Eublepharidae), in Nepal. In *REPTILES & AMPHIBIANS* • (Vol. 26, Issue 1).

- Rhen, T., & Crews, D. (2000). Organization and activation of sexual and agonistic behavior in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Neuroendocrinology*, 71(4), 252–261. <https://doi.org/10.1159/000054543>.
- Rivas, A. E., Mitchell, M. A., Flower, J., Welle, K. R., & Whittington, J. K. (2014). Effects of ultraviolet radiation on Serum 25-Hydroxyvitamin D concentrations in captive chinchillas (*Chinchilla laniger*). *Journal of Exotic Pet Medicine*, 23(3), 270–276. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.05.012>.
- Rodrigues, A. R., Salazar, M. J., Rocha-Rodrigues, S., Gonçalves, I. O., Cruz, C., Neves, D., Almeida, H., Magalhães, J., & Gouveia, A. M. (2019). Peripherally administered melanocortins induce mice fat browning and prevent obesity. *International Journal of Obesity*, 43(5), 1058–1069. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0155-5>.
- Roelandts, R. (2002). The history of phototherapy: Something new under the sun? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 46(6), 926–930. <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.121354>.
- Rossi, J. V. (2019). General Husbandry and Management. In S. J. Divers & S. J. Stahl (Eds.), *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery* (3rd ed., pp. 109–129).
- Rutland, C. S., Cigler, P., & Kubale, V. (2019). Reptilian Skin and Its Special Histological Structures. In *Veterinary Anatomy and Physiology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84212>.
- Saucedo, G. M. G., Salido Vallejo, R., & Moreno Giménez, J. C. (2020). Effects of solar radiation and an update on photoprotection. *Anales de Pediatría*, xx. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2020.04.014>.
- Schaftenaar, W., & van Leeuwen, J. P. T. M. (2015). the Influence of Ultraviolet-B Radiation on the Growth of Marabou Stork (*Leptoptilos Crumeniferus*) Nestlings in Relation To Plasma Calcium, Phosphorus, and Vitamin D 3 Concentrations . *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(4), 682–690. <https://doi.org/10.1638/2014-0031.1>.
- Schifter, H. (1988). Bemerkenswerte Lebensdauer eines *Eublepharis macularius* (BLYTH, 1854) (Sauria: Gekkonidae) in Gefangenschaft. *Geographical Sciences*, 43(3), 202–203. https://doi.org/10.20630/chirikagaku.43.3_202_5.

Scott, G. N., Nollens, H. H., & Schmitt, T. L. (2019). Evaluation of Plasma 25-Hydroxyvitamin D, Ionized Calcium, and Parathyroid Hormone in Green Sea Turtles (*Chelonia mydas*) Exposed to Different Intensities of Ultraviolet B Radiation. *American Association of Zoo Veterinarians*, 50(2), 421–426.

Selleri, P., & Girolamo, N. Di. (2012). Plasma 25-hydroxyvitamin D3 concentrations in Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*) exposed to natural sunlight and two artificial ultraviolet radiation sources. *American Journal of Veterinary Research*, 73(11), 1781–1786.

Shah, S., Sakhiya, J., Deshpande, P., Sakhiya, D., & Inamadar, A. C. (2020). Safety and Efficacy of the Combination of 308-nm Monochromatic Excimer Light and Topical 0.1% Tacrolimus Ointment in Segmental Vitiligo: An Open-label Study. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 13(2), E69–E75.

Sheick, M. S., Schiller, L. R., & Fordtran, J. S. (1990). In vivo intestinal absorption of calcium in humans. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 16(2), 130–146.

Slavens, F., & Slavens, K. (2001). Reptiles and amphibians in captivity: longevity home page. Southworth, L. O., Holick, M. F., Chen, T. C., & Kunz, T. H. (2013). Effects of sunlight on behavior and 25-hydroxyvitamin D levels in two species of Old World fruit bats. *Dermato-Endocrinology*, 5(1), 192–198. <https://doi.org/10.4161/derm.24020>.

Stanford, M. (2006). Effects of UVB radiation on calcium metabolism in psittacine birds. *Veterinary Record*, 159(8), 236–241. <https://doi.org/10.1136/vr.159.8.236>.

Steenbock, H., Black, A., Nelson, M. T., Hoppert, C. A., & Riising, B. M. (1925). The induction of growth-promoting and calcifying properties in fats and their usaponifiable constituents by exposure to light. *The Journal of Biological Chemistry*, 64, 263–298.

Strzelewicz, M. A., Ullrey, D. E., Schafer, S. F., & Bacon, J. P. (1985). Feeding Insectivores: Increasing the Calcium Content of Wax Moth (*Galleria mellonella*) Larvae. *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 16(1), 25. <https://doi.org/10.2307/20094728>.

Subramaniam, N., Petrik, J. J., & Vickaryous, M. K. (2018). VEGF, FGF-2 and TGF β expression in the normal and regenerating epidermis of geckos: implications for epidermal homeostasis and wound healing in reptiles. *Journal of Anatomy*, 232(5), 768–782. <https://doi.org/10.1111/joa.12784>.

- Suda, T., Masuyama, R., Bouillon, R., & Carmeliet, G. (2015). Physiological functions of vitamin D: what we have learned from global and conditional VDR knockout mouse studies. *Current Opinion in Pharmacology*, 22, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.04.001>.
- Tanaka, Y., & DeLuca, H. F. (1981). Measurement of mammalian 25-hydroxyvitamin D3 24R- and 1 α -hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(1 II), 196–199. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.196>.
- Taylor, S. L., Kaur, M., LoSicco, K., Willard, J., Camacho, F., O'Rourke, K. S., & Feldman, S. R. (2009). Pilot study of the effect of ultraviolet light on pain and mood in fibromyalgia syndrome. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15(1), 15–23. <https://doi.org/10.1089/acm.2008.0167>.
- Szydłowski, P., Madej, J. P., & Mazurkiewicz-Kania, M. (2016). Ultrastructure and distribution of chromatophores in the skin of the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Acta Zoologica*, 97(3), 370–375. <https://doi.org/10.1111/azo.12132>.
- Tröndle, U., Steinmetz, H. W., Rüegg, S. R., Müller, A., & Liesegang, A. (2018). UV-light and dietary vitamin D and their effects on ionized calcium and 25-OH-D plasma concentrations in captive gentoo penguins (*Pygoscelis papua*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(5), 1419–1428. <https://doi.org/10.1111/jpn.12941>.
- Uhl, E. W. (2018). The pathology of vitamin D deficiency in domesticated animals: An evolutionary and comparative overview. *International Journal of Paleopathology*, 23(August 2017), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2018.03.001>.
- Veleva, B. I., van Bezooijen, R. L., Chel, V. G. M., Numans, M. E., & Caljouw, M. A. A. (2018). Effect of ultraviolet light on mood, depressive disorders and well-being. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, 34(5), 288–297. <https://doi.org/10.1111/phpp.12396>.
- Vergneau-Grosset, C., & Péron, F. (2020). Effect of ultraviolet radiation on vertebrate animals: update from ethological and medical perspectives. *Photochemical & Photobiological Sciences*. <https://doi.org/10.1039/c9pp00488b>.
- Viets, B. E., Tousignant, A., Ewert, M. A., Nelson, C. E., & Crews, D. (1993). Temperature-dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology*, 265(6), 679–683. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650610>.

- Wacker, M., & Holick, M. F. (2013a). Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermato-Endocrinology*, 5(1), 51–108. <https://doi.org/10.4161/derm.24494>.
- Wacker, M., & Holick, M. F. (2013b). Vitamin D-effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients*, 5(1), 111–148. <https://doi.org/10.3390/nu5010111>.
- Wallach, J. D. (1966). Hypervitaminosis D in green iguanas. In *Journal of the American Veterinary Medical Association* (Vol. 149, Issue 7, pp. 912–914).
- Wangen, K., Kirshenbaum, J., & Mitchell, M. A. (2013). Measuring 25-Hydroxy Vitamin D Levels in Leopard Geckos exposed to Commercial Ultraviolet B Lights. *Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 42.
- Watson, M. K., Stern, A. W., Labelle, A. L., Joslyn, S., Fan, T. M., Leister, K., Kohles, M., Marshall, K., & Mitchell, M. A. (2014). Evaluating the clinical and physiological effects of long term ultraviolet B radiation on guinea pigs (*Cavia porcellus*). *PLoS ONE*, 9(12), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114413>.
- Watson, M. K., & Mitchell, M. A. (2014). Vitamin D and Ultraviolet B Radiation Considerations for Exotic Pets. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 23(4), 369–379. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.08.002>
- Webb, A. R., Decosta, B. R., & Holick, M. F. (1989). Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D₃ by causing its photodegradation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68(5), 882–887. <https://doi.org/10.1210/jcem-68-5-882>.
- Webb, A. R.; Holick, M. F. (1988). The Role Of Sunlight In The Cutaneous Production Of Vitamin D₃. *Annual Review of Nutrition*, 8(1), 375–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.8.1.375>.
- West, J. A., Tully, T. N., Nevarez, J. G., & Stout, R. W. (2019). Effects of Fluorescent Lighting Versus Sunlight Exposure on Calcium, Magnesium, Vitamin D, and Feather Destructive Behavior in Hispaniolan Amazon Parrots (*Amazona ventralis*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 33(3), 235–244.
- Wilkens, M. R., Marholt, L., Eigendorf, N., Muscher-Banse, A. S., Feige, K., Schröder, B., Breves, G., & Cehak, A. (2017). Trans- and paracellular calcium transport along the small

and large intestine in horses. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 204, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.020>.

Wilkinson, S. L. (2015). Reptile wellness management. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 18(2), 281–304. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2015.01.001>.

Woodhouse, S. J., & Rick, M. (2016). the Effect of Uvb Radiation on Serum Vitamin D and Ionized Calcium in the African Spoonbill (*Platalea Alba*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(2), 447–456. <https://doi.org/10.1638/2014-0239.1>.

Zhang, M., Qureshi, A. A., Geller, A. C., Frazier, L., Hunter, D. J., & Han, J. (2012). Use of tanning beds and incidence of skin cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30(14), 1588–1593. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.3652>.

Zhang, P., & Wu, M. X. (2018). A clinical review of phototherapy for psoriasis. *Lasers in Medical Science*, 33(1), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2360-1>.

Zehnder, D., Bland, R., Williams, M. C., McNinch, R. W., Howie, A. J., Stewart, P. M., & Hewison, M. (2001). Extrarenal Expression of 25-Hydroxyvitamin D 3 -1 α -Hydroxylase 1 . *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(2), 888–894. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7220>.

Zehnder, D., Bland, R., Chana, R. S., Wheeler, D. C., Howie, A. J., Williams, M. C., Stewart, P. M., & Hewison, M. (2002). Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: A novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(3), 621–629.

Zwart, P., & Rulkens, R. J. (1979). Improving the calcium content of mealworms. *International Zoo Yearbook*, 19(1), 254–255. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1979.tb00574.x>.