



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITARIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Quantificação não invasiva da hormona de stress cortisol
em duas alcateias do núcleo populacional Peneda/Gerês
de lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*)

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professora Doutora Michelle Serafim

Joana de Oliveira Ferreira, nº a21501210

2025

www.ulusofona.pt

CENTRO UNIVERSITARIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Quantificação não invasiva da hormona de stress
cortisol em duas alcateias do núcleo populacional
Peneda/Gerês de lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*)**

Joana de Oliveira Ferreira

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida por Joana de Oliveira Ferreira em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 03/10 de 2025, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 462/2025, de 24 de setembro, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Mariana Batista (FMV-ULHT)

Vogal: Professora Doutora Raquel Matos (FMV-ULHT) - arguente

Orientador: Professora Doutora Michelle Serafim

Este trabalho também foi orientado por Professor Doutor Francisco Petrucci-Fonseca (orientador externo)

Joana de Oliveira Ferreira, nº a21501210

2025

We need another and a wiser and perhaps a more mystical concept of animals. Remote from universal nature and living by complicated artifice, man in civilization surveys the creature through the glass of his knowledge and sees thereby a feather magnified and the whole image in distortion. We patronize them for their incompleteness, for their tragic fate for having taken form so far below ourselves. And therein do we err. For the animal shall not be measured by man. In a world older and more complete than ours, they move finished and complete, gifted with the extension of the senses we have lost or never attained, living by voices we shall never hear.

Henry Beston, *The Outermost House*, 1928

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, à Professora doutora Laurentina Pedroso e a todos os docentes que fizeram parte do meu percurso académico e me possibilitaram todo o conhecimento que levo comigo. Obrigada ainda à Faculdade de Medicina Veterinária pela atribuição da bolsa de investigação do MIMV, sem a qual não teria sido possível iniciar este projeto.

À minha orientadora, Professora Doutora Michelle Serafim, por toda a ajuda e orientação neste trabalho e por ter incentivado a apresentação do póster em congresso.

Ao meu orientador externo, Professor Doutor Francisco Petrucci-Fonseca por me ter permitido fazer este trabalho de investigação com a espécie magnífica que é o lobo-ibérico, por todo o conhecimento e vivências que partilhou comigo, foi uma honra estar integrada neste projeto.

Agradeço também ao Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE) e ao Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais (cE3c), localizados na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) pela disponibilização dos espaços, material e equipamentos utilizados no decorrer do meu trabalho.

À Professora Doutora Margarida Alves pela disponibilidade e ajuda a definir o que poderia ser este projeto. À Doutora Rita Monarca por me ter ensinado e acompanhado na parte laboratorial e por ter levado o póster ao congresso internacional. À Andreia Tracana por me ter auxiliado na delineação do protocolo laboratorial e toda a direção laboratorial inicial.

À Letícia Duarte pelo acompanhamento no estágio e dissertação, por cada ensinamento, toda a força e amizade ao longo deste projeto. Ao Pedro Oliveira e ao Luís Campos por toda a ajuda na análise de dados.

E o meu maior agradecimento é aos meus pais, irmão, padrinhos e amigos, em especial à Vitória, que me permitiram iniciar este percurso, que me deram força e motivação quando o cansaço era demasiado, que me apoiaram quando precisei de uma pausa, mas que também me incentivaram a continuar e a nunca desistir de perseguir o meu sonho. A todos os que não deixaram de acreditar em mim, um eterno obrigada.

Resumo

Apesar de ser legalmente protegido em Portugal desde 1988, o lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*) ainda enfrenta obstáculos para a sua conservação, principalmente devido à perseguição por parte do Homem e à fragmentação do seu *habitat*, causada por atividade antropogénica.

Este estudo faz parte de um projeto de monitorização que tem como objetivo o estabelecimento da situação de referência da população lupina, para avaliar o impacto de uma exploração mineira no distrito de Vila Real. Foram quantificados os metabolitos fecais da hormona cortisol em dejetos de lobo como método não invasivo para determinar os níveis de stress, com o auxílio de um *kit* imunoenzimático (ELISA).

Foram recolhidas amostras na área de duas alcateias, Barroso e Leiranco. Métodos moleculares foram usados para identificar a espécie, o sexo, a alcateia e, sempre que possível, indivíduos. Durante dois anos foram identificados 15 indivíduos (11 machos e 4 fêmeas) pertencentes à alcateia do Barroso e 10 indivíduos (7 machos e 3 fêmeas) pertencentes à alcateia do Leiranco, tendo sido analisadas 133 e 60 amostras, respetivamente.

Os resultados mostram que a alcateia do Leiranco, ocupante na área com maior densidade humana, apresenta uma concentração de cortisol superior. Também foi identificada uma relação com a estação do ano, para ambas as alcateias. Níveis superiores foram detetados no outono, que podem estar relacionados a vários fatores, incluindo uma atividade superior na época venatória ocorrente na área.

O presente trabalho é o primeiro desenvolvido em Portugal com o objetivo da caracterização dos níveis de cortisol em lobos *in situ*. Visto que este estudo está incluído num projeto a longo termo, o aumento do número de amostras e a avaliação de outras possíveis variáveis que possam influenciar os níveis de cortisol irão melhorar a nossa compreensão do stress e inerentes consequências nas populações de lobo-ibérico.

Palavras-chave: cortisol, glucocorticoides fecais, stress, lobo-ibérico

Abstract

While legally protected in Portugal since 1988, the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) still faces conservation problems, mainly due to poaching and habitat fragmentation, caused by human activity.

This study is part of a wolf monitoring project that aims to establish the reference situation of the wolf population to assess the impact of a mining exploration in northern Portugal. We measured faecal glucocorticoid metabolite concentrations in wolf scats as a non-invasive method to determine stress levels, using an enzyme immunoassay kit.

Wolf scats were collected in the area of two wolf packs, Barroso and Leiranco. Molecular methods were used to identify the species, sex, wolf pack, and, whenever possible, individuals. For two years, we identified 15 individuals (11 males and 4 females) from Barroso's pack and 10 individuals (7 males and 3 females) from Leiranco's pack, of which we analyzed 133 and 60 samples, respectively.

Results show that the Leiranco pack, inhabiting the area with higher human density, has higher levels of faecal cortisol. We also found a significant seasonal effect for both wolf packs. Higher levels were found during the autumn, which may be related to several factors, including higher activity in the area's hunting season

The present work is the first developed in Portugal aiming to characterize cortisol levels in free-ranging wolves. Since this work is part of a long-term project, increasing the number of collected samples and analyzing other relevant variables influencing cortisol levels will improve our understanding of stress and its consequences for Iberian wolf populations.

Keywords: cortisol, fecal glucocorticoids, stress, Iberian wolf

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ADN - Ácido desoxirribonucleico

PCR – do inglês, Polymerase chain reactions

TBE - Base T (Tris), ácido bórico e EDTA.

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Inc. – Incorporado

NI – Não identificado

MS – Microssatélite

EN – Em perigo

CDV – Vírus da esgana canina

CPV – Parvovírus canino

BEA – Bem-estar animal

SNC – Sistema nervoso central

SNA – Sistema nervoso autônomo

HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal

CRH – Hormona libertadora de corticotrofina

ACTH – Adrenocorticotrofina

MCs – Mineralocorticoides

GCs – Glucocorticoides

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas

FSH – Hormona estimuladora de folículos

LH – Hormona luteinizante

GH – Hormona de crescimento

FCM – do inglês, Faecal cortisol metabolite

Lda. – Limitada

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

UTM – do inglês, Universal transverse mercator

rpm – Rotações por minuto

H_0 – Hipótese nula

H_1 – Hipótese alternativa

ANOVA – Análise de variância

p value – valor de prova

% - Percentagem

®: Marca registada

m – Metro

°C – Graus celsius

km² – Quilómetro quadrado

g – Grama

ml – Mililitro

Log₁₀ – Logaritmo de base 10

ng – Nanograma

µl – Microlitro

pg - Picograma

Índice geral

Índice de Figuras	10
Capítulo I – Casuística do estágio curricular.....	11
1. Enquadramento de estágio	11
2. Genética	12
2.1. Extração de ADN.....	12
2.1.1. Sexagem.....	13
2.1.2. Microsatélites.....	13
3. Cortisol	15
Capítulo II - Revisão Bibliográfica	16
1. A medicina veterinária e a conservação	16
1.1. Conservação de grandes carnívoros – O lobo	17
1.2. O lobo-ibérico em Portugal e o conflito com o Homem	19
1.2.1. As consequências dos cães vadios e doenças infecciosas.....	22
2. O bem-estar animal e o stress.....	24
2.1. A resposta a um fator de stress.....	27
2.2. A resposta neuroendócrina	28
2.2.1. Hipotálamo e hormona libertadora de corticotrofina (CRH).....	29
2.2.2. Hipófise e adrenocorticotrofina (ACTH)	29
2.2.3. Glândulas adrenais e as hormonas esteroides	30
2.2.3.1. O cortisol.....	31
2.3. Consequências biológicas na resposta ao stress.....	32
2.3.1. Obtenção de formas energéticas.....	32
2.3.2. Sistema cardiovascular e digestivo	33
2.3.3. Reprodução.....	33
2.3.4. Risco fetal e neonatal	34
2.3.5. Sistema imunológico.....	34
3. Técnicas não-invasivas para quantificação hormonal e as suas limitações	35
3.1. Tipos de amostras.....	36
3.2. Recolha, armazenamento e preparação de amostras	37
3.3. Extração hormonal e ELISA.....	39
4. Objetivos	40
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	41
1. População e área de estudo	41

1.1.	Área de estudo	41
1.2.	População lupina	43
2.	Amostragem	44
2.1.	Trabalho de campo	44
2.2.	Análise molecular	44
3.	Análise hormonal	45
3.1.	Preparação de amostras	45
3.2.	Protocolo de extração hormonal	45
3.3.	Determinação dos níveis de cortisol	46
4.	Análise Estatística	47
4.1.	Análise exploratória e descrição das variáveis	48
4.1.1.	Ano de recolha	48
4.1.2.	Sexo	48
4.1.3.	Alcateia	48
4.1.4.	Estação do ano	48
4.1.5.	Concentração de cortisol	48
Capítulo IV – Resultados		49
1.	Análise Exploratória dos dados	49
1.1.	Variáveis qualitativas	49
1.2.	Variável quantitativa continua	50
1.3.	Variações na concentração de cortisol com as variáveis qualitativas	50
2.	Inferência estatística	52
Capítulo V – Discussão		53
Capítulo VI - Conclusão		57
Referências Bibliográficas		58
Anexos		75
Anexo I – Póster científico apresentado na conferência internacional SEB.		75
Anexo II – Protocolo do kit comercial (Enzo Life Sciences ADI-900-071)		76

Índice de Figuras

Figura 1 – Gráfico da divisão das horas de estágio curricular, em percentagem (%).....	12
Figura 2 - Representação gráfica da estimativa de horas, em percentagem, nas diversas técnicas realizadas durante o estágio no departamento de genética.....	13
Figura 3 - (A) Exemplo de gel de agarose com resultados de uma análise de sexagem. (B) Representação gráfica da frequência absoluta dos resultados da sexagem molecular.....	14
Figura 4 - Número de técnicas de PCR realizadas para cada microsatélite analisado.....	15
Figura 5 - Percentagem de sucesso, incerteza e insucesso das técnicas de amplificação PCR para cada microsatélite.....	15
Figura 6 - Número de amostras amplificadas com sucesso para o número de microsatélites.....	16
Figura 7 - Percentagem de horas estimadas no segundo período de estágio para cada técnica realizada na preparação de amostras para análise hormonal.....	16
Figura 8 - Distribuição de lobo-ibérico em Portugal desde a década de 30 até 2002.....	21
Figura 9 - Representação da densidade populacional na área de estudo, com pontos de recolha das amostras e respetivas alcateias.....	54
Figura 10 - Representação da densidade de animais domésticos na área de estudo, com pontos de recolha das amostras e respetivas alcateias.....	55
Figura 11 - Mapa da área de estudo, incluindo representação da mina, localização de cada amostra e respetiva alcateia.....	43
Figura 12 - Ilustração do preenchimento de uma placa ELISA.....	47
Figura 13 - Frequências absolutas para as diferentes variáveis.....	49
Figura 14 - Concentração de cortisol Log por cada categoria da variável sexo.....	50
Figura 15 - Concentração de cortisol Log por cada categoria da variável alcateia.....	51
Figura 16 - Representação da concentração de cortisol por quadricula da área de estudo...	51
Figura 17 - Concentração de cortisol Log por cada categoria da variável estação do ano.....	52

Exceto quando expressamente indicado, todas as figuras, gráficos e mapas incluídos nesta dissertação foram elaborados pela autora. As fontes externas estão devidamente referidas nas legendas correspondentes.

Capítulo I – Casuística do estágio curricular

1. Enquadramento de estágio

O estágio curricular é incluído no Mestrado Integrado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT). Teve local nos laboratórios de genética pertencentes ao Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais (cE3c) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), no Campo Grande, Lisboa. Foi supervisionado pelo Professor Doutor Francisco Petrucci-Fonseca e pela investigadora Letícia Duarte, sob a direção do Grupo Lobo.

O estágio consistiu num total de 648 horas, realizadas em 2022, e foi dividido em dois períodos. O primeiro período (287 horas) abrangeu maioritariamente trabalho em ambiente laboratorial no âmbito de genética, complementando este com análise em computador. No segundo período (361 horas) foi feita a preparação das amostras para a quantificação hormonal de cortisol, tema principal deste trabalho (Figura 1).

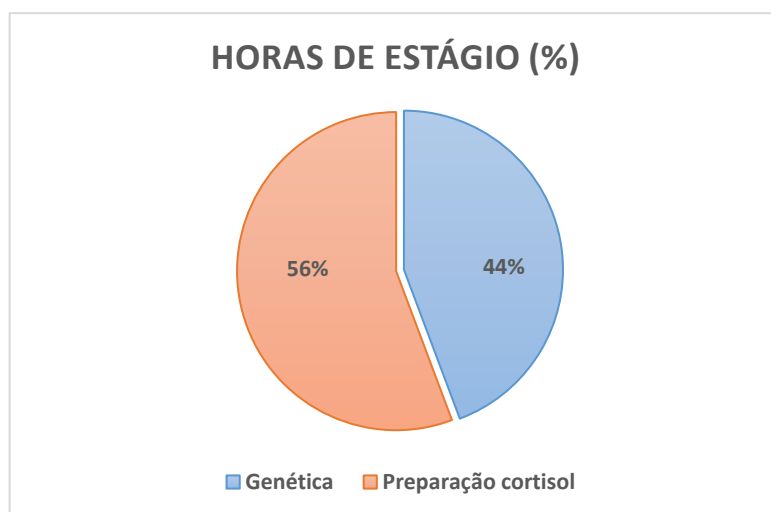


Figura 1 – Gráfico representativo da divisão das horas de estágio curricular, em percentagem (%), entre os dois tipos de trabalhos realizados.

Grande parte das amostras processadas na genética durante o estágio, e posteriormente quantificado o cortisol, fazem parte do projeto “Plano de Monitorização do Lobo-ibérico – Mina do Barroso”, cobrindo amostras dos dois primeiros anos de amostragem do projeto (de outubro de 2020 a setembro de 2022). As amostras recolhidas para este projeto são dejetos encontrados nos vários transectos percorridos na área de estudo para a procura de indícios da presença de lobo.

2. Genética

A parte genética é extremamente importante para este projeto, pois permite-nos confirmar que os dejetos são de lobo, qual o sexo e ainda pode permitir a identificação do indivíduo a que pertence, sendo possível identificar parentescos, populações e as suas respetivas áreas de presença. Assim, no primeiro período de estágio foram realizadas técnicas de extração de ácido desoxirribonucleico (ADN) de dejetos, amplificação de ADN por *polymerase chain reactions* (PCRs), eletroforese em gel de agarose e preparação de placas para enviar para genotipagem de microssatélites (MS) (Figura 2).

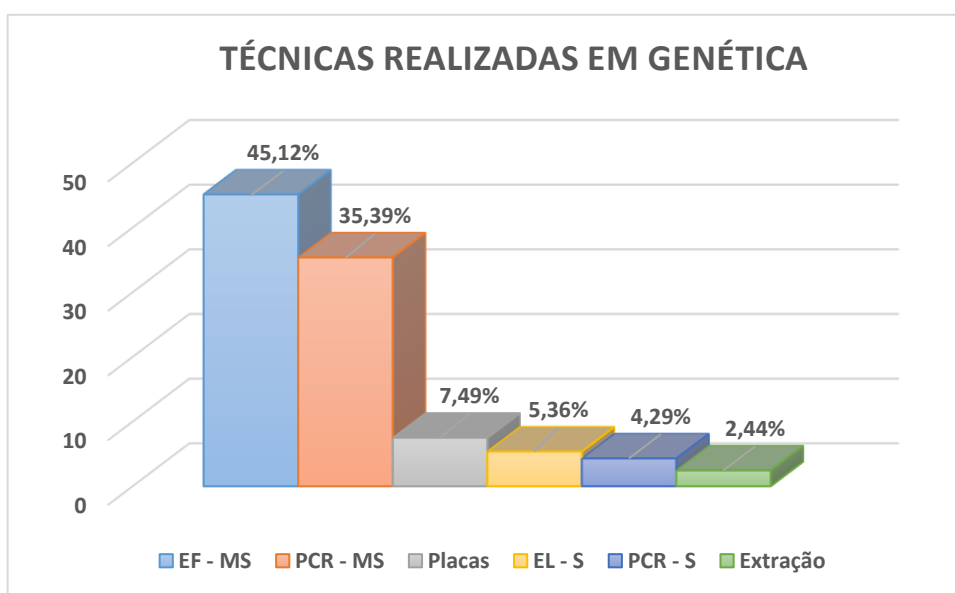


Figura 2 – Representação gráfica da estimativa de horas, em percentagem, nas diversas técnicas realizadas durante o estágio no departamento de genética. EF-MS – Eletroforese para microssatélites; PCR-MS – PCR para microssatélites; EL-S – Eletroforese para sexagem; PCR-S – PCR para sexagem.

2.1. Extração de ADN

Foi realizada a extração de ADN de 13 amostras, utilizando o *kit* E.Z.N.A.® Stool DNA (Omega). Após a extração, foram realizados diferentes protocolos de amplificação de diferentes produtos de ADN, consoante o objetivo da análise, através da técnica de PCR. Estes resultados foram lidos através de eletroforese em gel de 1,5% agarose/TBE. Todas as amostras em que a amplificação de ADN tenha sido bem-sucedida foram enviadas para a Macrogen, Inc. para sequenciação e as sequências foram comparadas com as sequências da base de dados BLAST, sendo possível identificar a espécie a que pertencem.

2.1.1. Sexagem

No estágio, foi possível acompanhar e realizar a sexagem molecular em 27 amostras, tendo sido repetida em 11 destas, devido a resultados inconclusivos. Esta técnica é baseada no protocolo de Seddon (2005), onde são amplificadas duas sequências diferentes, uma presente no cromossoma X e outra no cromossoma Y (Figura 3). Das 27 amostras analisadas, 10 foram consideradas pertencentes a machos, 5 foram consideradas como pertencentes a fêmeas e em 10 não foi possível identificar o sexo.

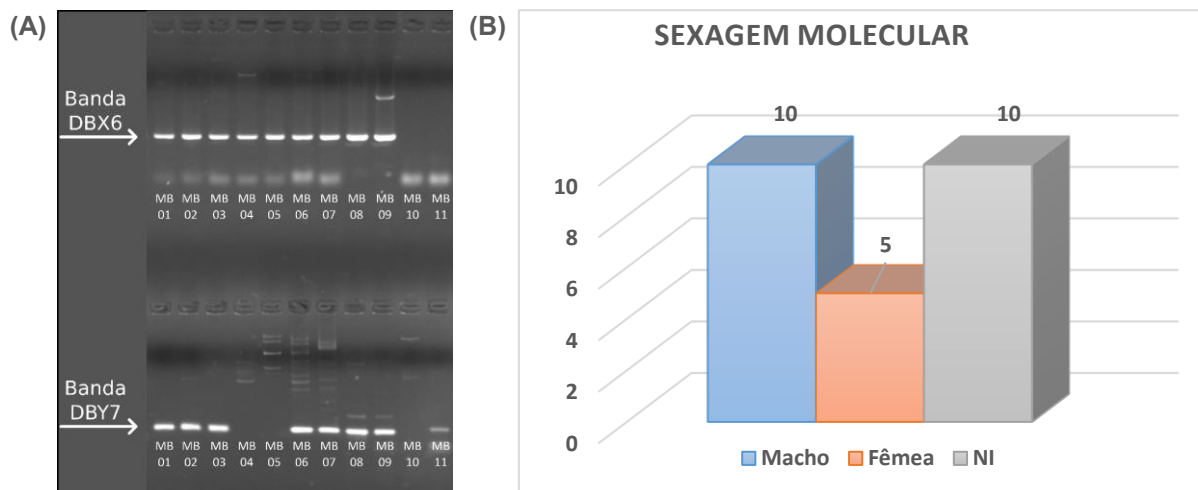


Figura 3 – (A) Exemplo de gel de agarose com resultados de uma análise de sexagem, sendo que a banda DBX6 corresponde ao cromossoma X e o DBY7 ao cromossoma Y. (B) Representação gráfica da frequência absoluta dos resultados da sexagem molecular. NI – Não identificado. **Fonte:** (A) Cedida pela investigadora Letícia Duarte.

2.1.2. Microssatélites

No estágio foi possível realizar a análise de microssatélites, que tem como objetivo relacionar as amostras a indivíduos específicos e, se possível, estabelecer relações de parentesco entre estes. Foram amplificados 11 pares de *primers* de microssatélites marcados, sendo que nem todas as amostras foram testadas para os mesmos microssatélites. As amostras com pelo menos 8 das análises bem-sucedidas, foram preparadas e enviadas para a MacroGen, Inc. para genotipagem. Os resultados foram analisados com o software GeneMapper.

Foram analisadas 195 amostras diferentes para microssatélites, tendo sido realizados 2205 PCRs, 302 dos quais correspondem a repetições de amostras malsucedidas. Todas as contagens apresentadas de seguida (Figura 4, Figura 5 e Figura 6) têm em consideração as repetições e apenas as análises que foram feitas durante o período de estágio.

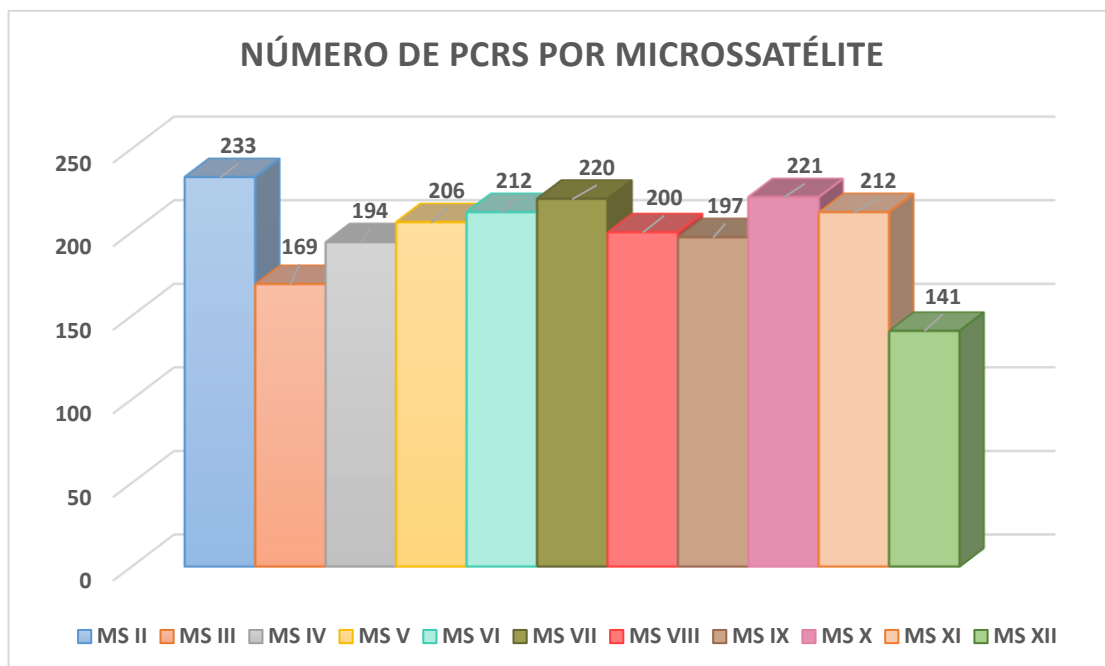


Figura 4 – Número de técnicas de PCR realizadas para cada microsatélite analisado. MS II – 2º microsatélite; MS III – 3º microsatélite; MS IV – 4º microsatélite; MS V – 5º microsatélite; MS VI – 6º microsatélite; MS VII – 7º microsatélite; MS VIII – 8º microsatélite; MS IX – 9º microsatélite; MS X – 10º microsatélite; MS XI – 11º microsatélite; MS XII – 12º microsatélite

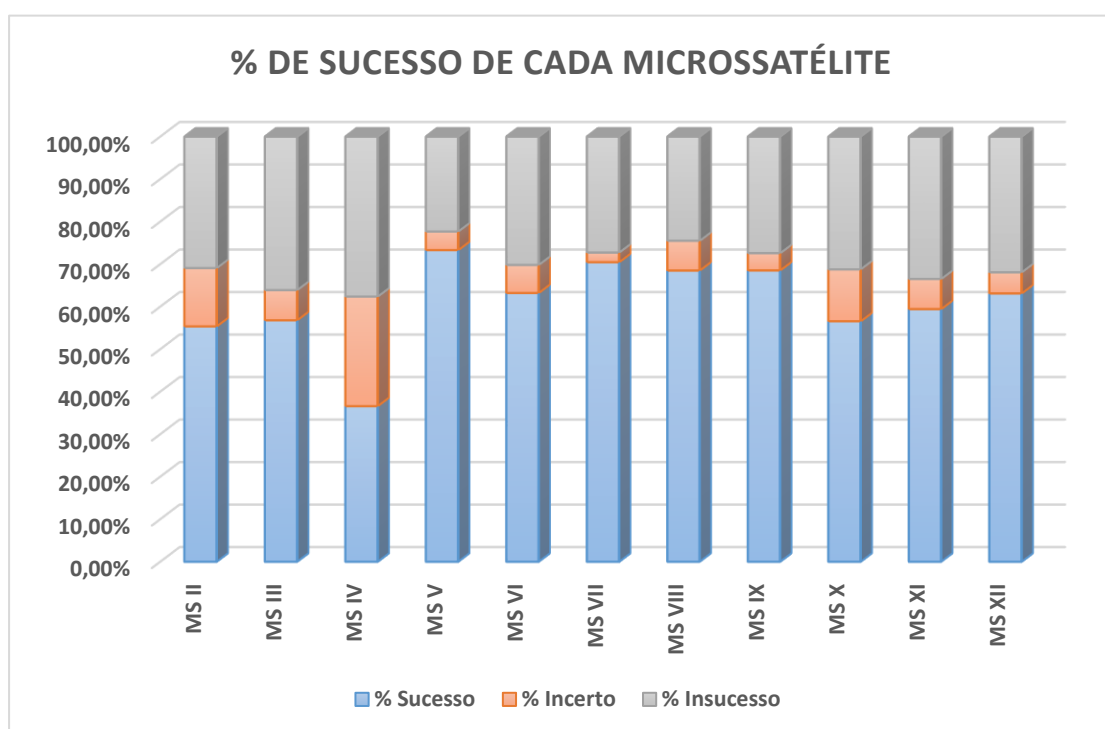


Figura 5 – Percentagem de sucesso, incerteza e insucesso das técnicas de amplificação PCR para cada microsatélite. MS II – 2º microsatélite; MS III – 3º microsatélite; MS IV – 4º microsatélite; MS V – 5º microsatélite; MS VI – 6º microsatélite; MS VII – 7º microsatélite; MS VIII – 8º microsatélite; MS IX – 9º microsatélite; MS X – 10º microsatélite; MS XI – 11º microsatélite; MS XII – 12º microsatélite

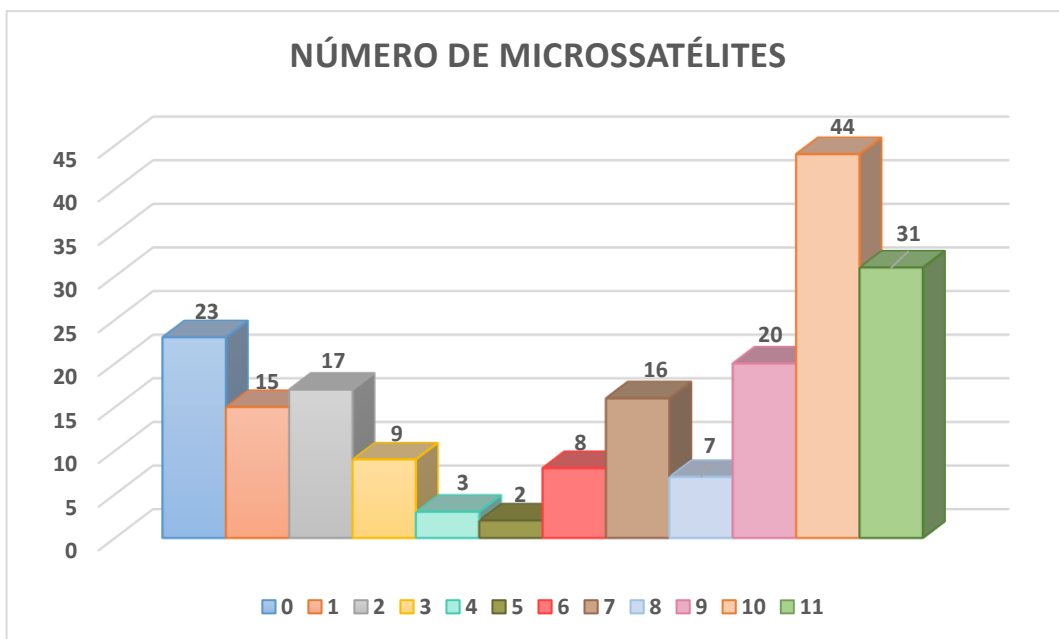


Figura 6 – Número de amostras amplificadas com sucesso para o número de microsatélites. Apenas as amostras com mais de 8 microsatélites bem-sucedidos, são enviadas para genotipagem.

3. Cortisol

No segundo período de estágio foi realizada a preparação das amostras para a quantificação hormonal. Cada amostra foi classificada morfologicamente e selecionada ou não para o estudo hormonal e passou por um processo de preparação, extração e quantificação da hormona cortisol através de um kit comercial ELISA.

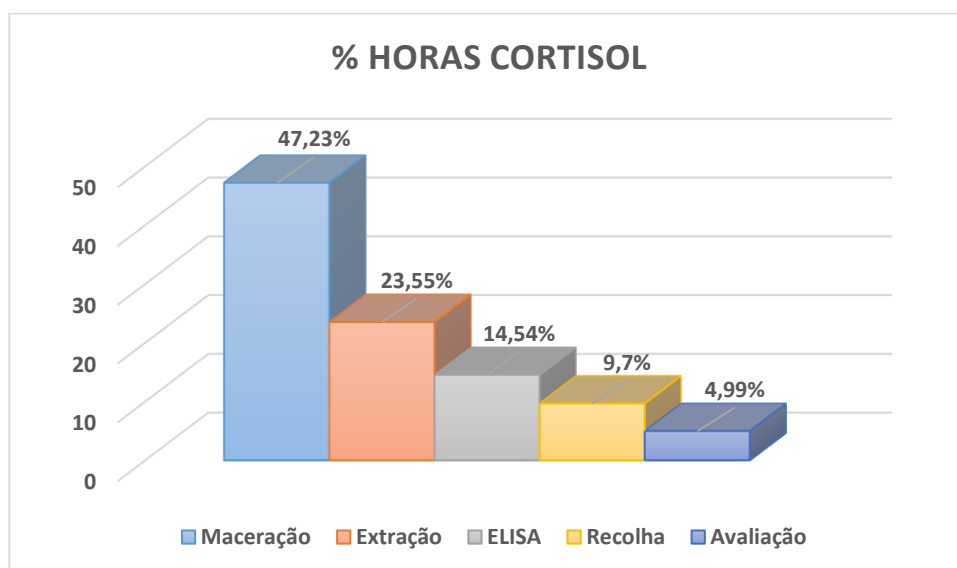


Figura 7 – Percentagem de horas estimadas no segundo período de estágio para cada técnica realizada na preparação de amostras para análise hormonal.

Capítulo II - Revisão Bibliográfica

1. A medicina veterinária e a conservação

Enquanto testemunhamos o crescimento da população humana a um ritmo preocupante, a forma como a natureza reage e lida com a pressão antropogénica é de extrema importância e cada vez conquista mais atenção global. Mesmo as zonas mais remotas do mundo, onde para o Homem seria difícil expandir, como em regiões polares ou de montanhas extremas, também estas sofrem pressão indiretamente. Com todas as mudanças inerentes a esta pressão, direta ou indiretamente, existem grandes perdas de biodiversidade, existindo atualmente cerca de 47 mil espécies em risco de extinção (Ceballos, Ehrlich & Raven, 2020; Mathias *et al.*, 2023; IUCN, 2025)

Entre estas, cerca de 27% das espécies de mamíferos (IUCN, 2025), estando estimado que milhares de espécies e milhões de populações únicas do mundo desaparecerão nas próximas décadas. Isto é sobretudo por consequência da pressão antropogénica, como a exploração de áreas e recursos naturais, degradação e fragmentação de *habitats*, poluição e mudanças climáticas, introdução e disseminação de novos agentes patogénicos e ainda a presença de espécies invasoras (Ripple, *et al.*, 2017; Ceballos, *et al.*, 2020; Mathias *et al.*, 2023).

A biologia da conservação surgiu em 1978 quando se realizou a primeira conferência internacional da biologia da conservação (Soulé, 1985). É uma área multidisciplinar que tem por objetivo contribuir para a conservação das espécies e dos seus ecossistemas. O conceito de medicina da conservação apenas surgiu nos anos 90 (Kock, 1996) e apesar das diversas definições, todas revolvem no idêntico conceito de que a saúde e bem-estar dos animais, ecossistema e do Homem estão univocamente relacionados, sendo uma área multidisciplinar que visa estudar e melhorar a relação entre estas três grandes áreas e, assim, proteger e conservar todo o ecossistema, incluindo a própria saúde humana (Baker, Gobush & Vynne, 2013; Deem, 2015; Sher, 2022).

Desde o século XIX que cientistas se apercebiam da correlação inegável entre a saúde animal e humana, mas apenas dois séculos mais tarde foi criada a iniciativa '*One Health*' (Klauder, 1958), que apesar de ser um pouco mais focada na parte da medicina, a componente ecológica começa a ter um papel cada vez mais importante. Assim, a medicina da conservação é a componente da '*One Health*' relativa aos animais, à sua saúde e bem-estar, abordando não apenas as doenças e possíveis zoonoses, como também no controlo de fatores que influenciam a sustentabilidade das diversas espécies silvestres e da

biodiversidade, como por exemplo, a endocrinologia (Kahn, Monath, Bokma, Gibbs & Aguirre, 2012; Deem, 2015; McCormick & Romero, 2017).

A endocrinologia é uma área relativamente recente dentro da medicina da conservação, mas já com um grande impacto, especialmente nas áreas da reprodução e do stress. Este género de estudos tem como objetivo relacionar a quantificação das diversas hormonas com outros fatores, como o ambiente, o comportamento, a nutrição, a ecologia, etc. (Cockrem, 2005; Kersey & Dehnhard, 2014; McCormick & Romero, 2017).

Apesar de haver inúmeras técnicas úteis nesta área, a medição de hormonas esteroides (inerentes à reprodução e/ou de stress) por métodos não-invasivos, como as fezes, a urina e a saliva, é comumente preferível entre os investigadores (Cockrem & Ishii, 1999; Cockrem, 2005).

A informação gerada por estes estudos é uma mais-valia para a conservação de qualquer espécie animal, pois entender a sua biologia e fisiologia normal, e assim permitir a deteção do que não é normal, contribui para o desenvolvimento e gestão de planos de conservação. Cada vez existem mais exemplos de estudos que contribuem para a identificação de fatores de stress fisiológico, sejam estes ecológicos ou antropogénicos, e que contribuem para a implementação de medidas de prevenção, controlo e resolução desses fatores (Reeder & Kramer, 2005; Baker, *et al.*, 2013; Deem, 2015).

1.1. Conservação de grandes carnívoros – O lobo

A ordem *Carnivora* representa um diverso grupo de mamíferos, que divergem em características morfológicas, fisiológicas, ecológicas e comportamentais, na qual se inclui a família *Canidae*. O lobo, *Canis lupus* (Linnaeus, 1758), é considerado o maior canídeo selvagem do mundo (Mech, 1970) e o carnívoro com a mais ampla distribuição geográfica a nível mundial (Mech & Boitani, 2003).

Os carnívoros carregam o elevado risco de extinção inerente a estes, devido não só às suas características intrínsecas, como densidades populacionais reduzidas e longos períodos gestacionais (Mech & Boitani, 2003; Cardillo *et al.*, 2004), como também a fatores extrínsecos. Estes fatores extrínsecos são maioritariamente relacionados com o Homem, nomeadamente, a degradação e fragmentação dos *habitats*, pouca disponibilidade de presas silvestres e a frequente perseguição direta e caça ilegal (Fritts, Stephenson, Hayes & Boitani, 2003; Álvares, 2011).

Este conflito com o Homem está relacionado principalmente com as perdas económicas causadas pela predação de espécies domésticas por parte deste. As medidas de conservação para grandes carnívoros são das mais desafiantes de entre todas as espécies, pois conflituam diretamente com o Homem e a maioria das possíveis soluções de conservação originam dilemas sociopolíticos (Naughton-Treves, Grossberg & Treves, 2003; Treves & Karanth, 2003; Álvares, Sá, Rodrigues & Casimiro, 2019).

Como predador de topo, o lobo tem um papel importante no equilíbrio dos ecossistemas, controlando populações de herbívoros e outros carnívoros, direta (alimentação) ou indiretamente (competição). Mesmo relativamente a presas domésticas, este carnívoro tem tendência a caçar animais mais fracos, debilitados e doentes, tendo assim um efeito sanitário nestes efetivos (Mech, 1970; Barber-Meye, White & Mech, 2007; Ripple *et al.*, 2014).

Devido à conotação extremamente negativa que o Homem tem direcionada ao lobo, apenas no século XX esta espécie começou a ser estudada, especialmente na Europa e na América do Norte (Mech & Boitani, 2003). Após a sua recuperação demográfica nos últimos 50 anos, o lobo é o segundo grande carnívoro mais abundante na Europa (Chapron *et al.*, 2014). Alguns dos programas de conservação basearam-se na reintrodução de grupos destes animais, como nos Estados Unidos (Ripple & Beschta, 2012), outros por expansão natural, como na Europa, sendo que atualmente países como a Suíça, a França e a Alemanha, onde o lobo estava extinto há mais de meio século, têm pequenas populações de lobo sob proteção (Mech, 1970; Fritts, *et al.*, 2003).

O lobo é um animal resiliente e extremamente adaptável, pelo que, em condições minimamente favoráveis, possui um grande potencial de recuperação populacional (Mech & Boitani, 2003). A sua distribuição abrange desde o deserto até à tundra e, embora estudos mais antigos apontassem a proximidade humana como um fator limitante ao acesso a presas, abrigo e conectividade (Mech, 1970), investigações mais recentes têm evidenciado a notável capacidade do lobo para persistir e adaptar-se mesmo em áreas de elevada presença humana (Fritts *et al.*, 2003; Álvares, 2011).

O lobo vive em grupos hierarquizados denominados alcateias, onde existe um casal reprodutor, e onde geralmente os restantes membros são crias desse ano ou dos anteriores, podendo, no entanto, também estar presentes membros aparentados do casal ou incorporados por adoção, o que é extremamente raro e complexo. As alcateias têm entre 3 e 11 indivíduos e este número depende da disponibilidade de alimento, competição com outros lobos e nível de mortalidade na região, sendo que em Portugal é de 2 a 8 lobos por alcateia (Mech, 1970; Mech & Boitani, 2003; Álvares *et al.*, 2019).

Durante a época reprodutiva, a fêmea reprodutora permanece junto às crias, com o apoio dos restantes membros da alcateia. A caça é realizada de forma cooperativa, sendo que alguns indivíduos permanecem nas imediações da toca enquanto outros se deslocam em busca de alimento. O sucesso de uma alcateia depende de fatores como a disponibilidade de alimento e abrigo na área onde se encontra, sendo que esses fatores podem depender do impacto da atividade humana na região (Mech & Boitani, 2003; Ruprecht, Ausband, Mitchell, Gaston & Zager, 2012; Ausband *et al.*, 2016).

A época de reprodução varia consoante a latitude, sendo que em Portugal é no mês de fevereiro/março e as crias (em média 5) nascem cerca de 2 meses após a concepção. Quando as crias atingem a sua maturidade sexual (com cerca de 2 anos de idade), os lobos tendem a dispersar, mais comumente no outono e na primavera. O sucesso reprodutor da espécie está dependente da idade, fisiologia e experiência do casal reprodutor, sendo este que leva ao sucesso da alcateia (Mech & Boitani, 2003; Álvares, 2011; Ausband *et al.*, 2016).

É também de referir a importância que tem a escolha do local da toca, visto que as crias se mantêm nesse local durante os primeiros meses de vida, sendo preferencialmente uma zona onde a presença humana é menor, com proximidade a linhas de água e com um misto de áreas abertas e áreas florestais e/ou arbustivas (Almeida, 2008; Ausband, Brzeski & Moyer, 2017).

Relativamente à alimentação, o lobo é um carnívoro generalista, que preda principalmente ungulados, sendo que, na ausência de ungulados silvestres, o lobo redireciona para os ungulados domésticos e cavalos, podendo chegar a comer roedores e aproveitar desperdícios humanos (Peterson & Ciucci, 2003; Torres, Silva, Brotas & Fonseca, 2015).

1.2. O lobo-ibérico em Portugal e o conflito com o Homem

Nos últimos 100 milhões de anos, o lobo foi-se adaptando e surgiram classificações consoante zonas geográficas, diferentes habitats e climas (Nowak, 2003). Há registos geológicos da presença da espécie *Canis lupus* em Portugal desde há 355 mil anos, altura em que havia maior competição entre o lobo e outros carnívoros, mas também maior abundância de espécies de presas. Contudo, com as alterações climáticas deste período e o início da presença do Homem moderno nos últimos 20 mil anos, muitas espécies entraram em extinção progressivamente, deixando o lobo como um dos poucos grandes carnívoros ainda presentes atualmente (Antunes, 1993; Cardoso, 1993; Álvares, 2011).

Na Península Ibérica existe uma única subespécie endémica, o lobo-ibérico (*Canis lupus signatus*, Cabrera 1907). Esta subespécie é mais pequena e tem marcas claras no

maxilar superior e marcas negras na cauda e nas patas da frente, o que lhe atribui o nome “*signatus*”, ou ‘marcado’ (Torres & Fonseca, 2016).

O lobo-ibérico tem estatuto de “Em Perigo (EN)” no Livro Vermelho dos Mamíferos de Portugal Continental, publicado em 2023, devido ao facto da população nacional ser menor que 250 indivíduos maduros (Pimenta, Barroso, Álvares & Petrucci-Fonseca, 2023). É protegido por lei desde 1988 pela Lei de Proteção do Lobo Ibérico nº 90/88, de 13 de agosto, e pelo Decreto-lei nº 54/2016, de 25 de agosto. Também é uma espécie protegida na Diretiva Habitats (Apêndices II e IV) e está listada na Convenção de Berne (Apêndice II) e CITES (Apêndice II-C2). É importante ainda referir que é a única espécie animal com legislação própria em Portugal, e que esta inclui a proibição do abate de lobos e a perturbação do seu *habitat*, nomeadamente durante a época de reprodução (Pimenta *et al.*, 2023; ICNF, 2018).

No início do século XX, o lobo-ibérico habitava grande parte da Península Ibérica, mas rapidamente se deu início ao seu extremo declínio populacional e à sua regressão territorial para o noroeste da Península Ibérica (Figura 8) (Petrucci-Fonseca, 1990). Os elevados níveis de mortalidade e progressivo desaparecimento da espécie estão associados sobretudo à presença e perseguição por parte do Homem, em consequência da predação dos animais pelo lobo e dos impactos económicos associados, e devido aos efeitos antropogénicos indiretos, como a destruição e fragmentação do habitat e as alterações climáticas (Álvares *et al.*, 2015; Álvares *et al.*, 2019). Tudo isto se torna ainda mais relevante na subespécie ibérica, visto que a coexistência com o Homem é muito mais próxima comparada com a maioria de outros territórios ocupados por lobos no resto do mundo (Campos, 2018).

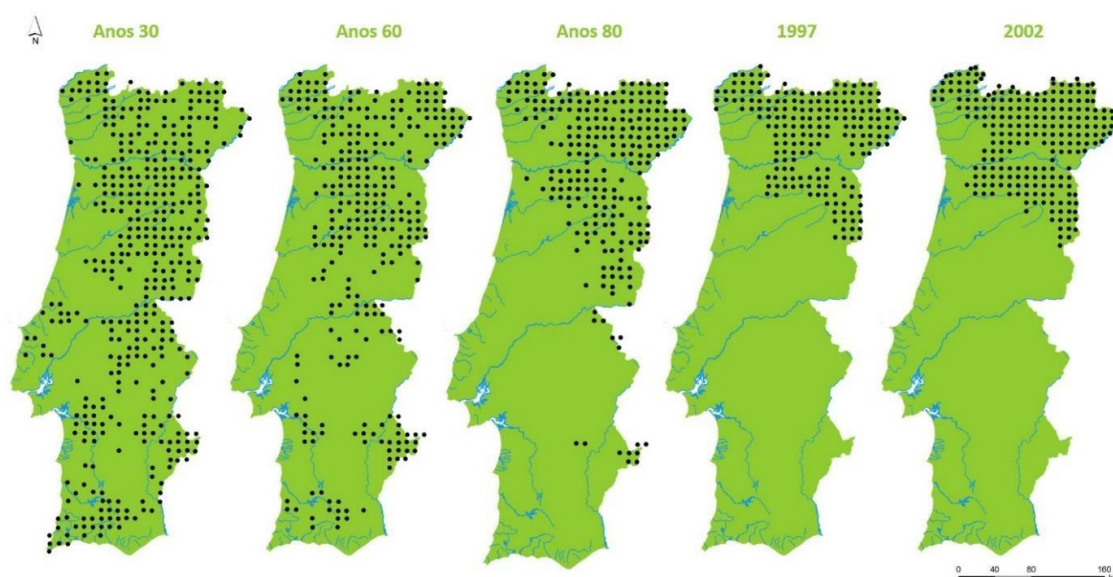


Figura 8 – Distribuição de lobo-ibérico em Portugal desde a década de 30 até 2002. (Retirado a 15 de maio de 2024 de <https://www.grupolobo.pt/lobo-iberico/distribuicao/>).

Atualmente, em Portugal, a população lupina é dividida pelo rio Douro, sendo considerados a norte deste rio três núcleos populacionais, que são estes a Peneda-Gerês, Alvão-Padrela e Bragança. Enquanto que a Sul é apenas identificado um. Baseado no censo de 2019/2021, foi confirmada a existência de 56 alcateias (51 a norte e 5 a sul do rio Douro) e cerca de 190 a 390 indivíduos. No entanto, menos de metade destes correspondem a indivíduos reprodutores que contribuirão realmente para a expansão da espécie (Pimenta *et al.*, 2023).

Em Portugal, o lobo-ibérico ocupa uma área que inclui desde florestas e matos, a pastagens e terrenos agrícolas, tendo como ponto de refúgio áreas montanhosas de grande altitude. Assim, dois fatores mais relevantes para a presença de lobos são a existência de gado (Eggermann, Da Costa, Guerra, Kirchner & Petrucci-Fonseca, 2011) e a altitude (Ferrão da Costa, 2013), que indiretamente se traduz em baixa densidade populacional, menor densidade de estradas e maior presença de presas (Álvares *et al.*, 2015). Ainda, o lobo dá preferência a zonas de baixa ocupação humana em comparação com zonas onde esta é nula. Um estudo realizado em 2011 (Eggermann *et al.*) evidencia isto mesmo, descrevendo um comportamento de evitação a estradas e áreas de maior densidade humana, mas nunca se afastando muito destas, devido à sua dependência de presas domésticas nas regiões lusitanas.

No entanto, a grande expansão de parques eólicos no Norte de Portugal nos últimos 25 anos, (com o objetivo de incrementar a utilização de energias renováveis) tem coincidido com estas zonas preferenciais do lobo. Isto pode ser problemático, não só devido ao espaço e ruído das próprias infraestruturas e possíveis construções acessórias, como também a construção de estradas de acesso, o que permite um maior fluxo de pessoas numa área anteriormente sem acesso (Rio-Maior, Godinho & Álvares, 2011). Em 2002/2003, os aerogeradores instalados nestas zonas montanhosas já ocupavam o território de presença do lobo em 46% das alcateias (Pimenta *et al.*, 2005).

Apesar de se poderem deslocar longas distâncias, são animais territoriais, sendo a área de cada alcateia o espaço onde se refugiam, alimentam e reproduzem. Esta área pode sofrer alterações de dimensão e/ou limites ao longo dos anos, devido à atividade humana, ao comportamento de alcateias vizinhas, alterações ambientais e de dinâmica dentro da própria alcateia e à densidade de presas. Sendo que o lobo, como a maioria dos carnívoros, é um animal noctívago, geralmente são observados dois picos de atividade (primeiro no início da noite e o segundo na madrugada) com um breve repouso entre estes (Eggermann *et al.*, 2011; Álvares *et al.*, 2015; Rio-Maior *et al.*, 2019; Pimenta *et al.*, 2023).

Relativamente aos hábitos alimentares do lobo em Portugal, o que sabemos baseia-se especialmente em análises macroscópicas de restos das presas em dejetos, sendo estes pelos, ossos, entre outros. A alimentação consiste sobretudo em espécies de ungulados domésticos como a cabra, ovelha, vacas e equídeos (Álvares *et al.*, 2015).

Esta predominância em animais domésticos deve-se à escassez de ungulados silvestres, como falado anteriormente neste capítulo. A alimentação varia de região para região e mesmo entre alcateias adjacentes, com grandes diferenças nas percentagens de presas domésticas e silvestres em alcateias tão próximas geograficamente (Pimenta, 1998; Álvares, 2011). No núcleo da Peneda-Gerês, área de foco deste trabalho, os equinos são as presas mais frequentes, seguidos pelos bovinos, por serem criados em regime de pastoreio, e por fim os caprinos e ovinos (Álvares, 2011; Torres *et al.*, 2015).

Desde o início da década de 90, e como uma das medidas para a conservação deste predador, a lei determina o pagamento de indemnizações aos criadores de gado pelos prejuízos atribuídos ao lobo, desde que cumpridos determinados pressupostos, nomeadamente regras de proteção de gado. Outra medida implementada em 2014 com o objetivo de diminuir estes prejuízos, é o apoio financeiro à manutenção de cães guardadores de gado para proteção dos efetivos pecuários (Lei de Proteção do Lobo-Ibérico nº 90/88; Decreto-Lei nº 54/2016; Despacho 9728/2017; Álvares, Sá, Rodrigues & Casimiro, 2019).

Posto isto, entre 1996 e 2013, verificou-se um suave aumento no número de ataques ao gado atribuídos ao lobo nos núcleos populacionais lupinos de Alvão-Padrela e Sul do Douro e um aumento mais acentuado no núcleo da Peneda-Gerês, onde incide o presente trabalho. Já no núcleo de Bragança, é evidente um decréscimo substancial destes casos. Esta diferença deve-se ao facto de, na região de Bragança, os efetivos pecuários serem mais reduzidos, principalmente ovino, e serem na sua maioria protegidos por pastores e cães de gado. Pelo contrário, no núcleo da Peneda-Gerês, o gado é predominantemente bovino e equino e na maioria das vezes em regime extensivo, sem estratégias de proteção de gado (Álvares *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2015).

1.2.1. As consequências dos cães vadios e doenças infecciosas

Outro fator extremamente importante é a presença de cães vadios e assilvestrados na área de distribuição do lobo. Não só representam uma competição na caça e no território, podem ser a origem de possíveis doenças, como contribuem para a perseguição contra o lobo, pois os prejuízos que causam aos produtores de animais domésticos são atribuídos aos lobos. Um exemplo disto são as queixas de ataques a rebanhos na área do Alentejo, onde não há lobos, mas os ataques são na mesma atribuídos a estes (Álvares, 2006).

No final da década de 90, foi realizado um estudo por Ribeiro (1996), através de inquéritos, com o objetivo de entender a distribuição destas matilhas de cães assilvestrados. Neste estudo, estas são caracterizadas, na maioria, pela ausência de raça ou raça de cão de caça, constituídas por cerca de 2 a 3 indivíduos, podendo este número variar de 1 a 30 e tendo como origem o abandono pelos donos, especialmente por caçadores após a época venatória.

Estas matilhas podem gerar diversos problemas, tanto na saúde pública, por serem transmissores e reservatórios de doenças possivelmente zoonóticas, como diretamente às populações, atacando crianças e pessoas mais vulneráveis, comportamentos que não encontramos no lobo. Quando as populações de lobo são estáveis, muitas vezes estes cães acabam por ser alimento e não constituir ameaça. No entanto, em zonas onde a densidade de lobos é baixa, a presença destas matilhas pode resultar na morte de lobos direta, ou indiretamente, e facilitar a ocorrência de híbridos lobo-cão (Ribeiro, 1996; Álvares, 2006; Godinho *et al.*, 2011; Torres, Ferreira, Rocha & Fonseca, 2017).

Independentemente das maiores causas de mortalidade de lobo-ibérico serem o atropelamento, o tiro e o laço (Álvares *et al.*, 2015), as doenças infecciosas e/ou parasitárias têm um carácter extremamente importante não só na mortalidade, mas também na morbilidade e, consequentemente, na sua dinâmica populacional. O lobo-ibérico, especificamente em Portugal, é afetado pelo vírus da esgana canina (CDV), o parvovírus (CPV) e a sarna sarcóptica e a transmissão das três doenças está estritamente relacionada com as referidas matilhas de cães silvestres. Ambos o CDV e o CPV são dos agentes mais influentes em diversas espécies de carnívoros selvagens, e já foram identificados no lobo-ibérico em vários estudos (Santos, Almendra & Tavares, 2009; Müller, Silva, Santos & Thompson, 2011; Santos, Rosa, Müller & Guerra, 2012; Molnar, Duchamp, Möstl, Diehl & Betschart, 2014; Álvares *et al.*, 2015).

Existem mais lobos a serem detetados com CPV do que com CDV, no entanto, na maioria dos animais positivos a CDV, esta é a sua causa de morte mais provável, enquanto que positivos a CPV podem ter uma causa de morte não viral. Claro que, a infeção viral vai diminuir as defesas do animal, afetar o seu bem-estar e homeostase e indiretamente pode causar mortalidade por outra causa (Sobrino, Arnal, Luco & Gortázar, 2008). É importante ainda considerar que os animais testados, com resultados de anticorpos positivos a estes vírus, são sobreviventes à infeção, e, portanto, o vírus com menor mortalidade vai ser mais prevalente nas populações (Santos *et al.*, 2009).

Ainda, populações lupinas com pouca variabilidade genética estão mais suscetíveis a ambos os vírus, sendo este fator muito importante para a subespécie ibérica, especialmente no núcleo a Sul do Douro em Portugal (Hedrick, Lee & Buchanan, 2003).

A sarna sarcóptica é uma doença cutânea, altamente contagiosa e zoonótica. Apesar de nos dias de hoje ser conhecida como uma doença transmitida pelos animais, pensa-se que o hospedeiro primário foi o Homem, passando para os hospedeiros domésticos e por fim para os silvestres, e tendo cada vez menos capacidade de reinfectar o Homem (Fain, 1978). A sarna, à semelhança do parvovírus, raramente é causa de mortalidade. No entanto, causa um enorme desequilíbrio da homeostase, podendo os indivíduos ter dificuldade na própria termorregulação, ter pouca energia para caçar e defender o seu território, dificuldades na reprodução e até mesmo dificuldade em descansar devido ao prurido constante (Rosseau, 2020).

Passando a uma condição crónica, pode ainda causar infeções bacterianas secundárias, e até mesmo causar afeções graves nos vários órgãos, podendo então, nessas situações, ser fatal (Arlan, Bruner, Stuhlman, Ahmed & Vyszewski-Moher, 1990). Em Portugal, a sarna é enzoótica em canídeos selvagens e domésticos, havendo registos de epizootia em lobos em 2007 e 2008 (Santos *et al.*, 2012).

2. O bem-estar animal e o stress

O bem-estar animal (BEA) é um tópico extremamente relevante na conservação da vida selvagem, considerando que um animal com um nível de bem-estar aceitável deve apresentar alguns requisitos, como por exemplo, ser capaz de manter comportamentos adequados à sua espécie, estar de boa saúde e condição física, e, consequentemente, sendo estes os indivíduos mais propensos a reproduzirem-se, assegurando assim a continuação e autossustentabilidade das suas espécies (Moberg, 2000; Broom, 2001; Edwards, Edes, & Brown, 2019).

O BEA não é um conceito linear e não é facilmente medido devido à sua complexidade, o que implica também que não é visto da mesma perspetiva por todos. Mellor e Beausoleil (2015) desenvolveram um modelo de BEA que, para além dos fatores negativos, incorpora fatores positivos nos diferentes domínios físicos/funcionais, tomando também em consideração o estado mental dos animais. Assim, os autores quiseram reforçar como o estado mental de um indivíduo também vai influenciar o impacto desses fatores positivos e/ou negativos no seu bem-estar. O principal foco é que na avaliação do bem-estar não se deve só considerar a ausência do negativo, mas também a presença do positivo.

Por esta razão, idealmente, o BEA deveria ser um conceito avaliado de forma individual e não populacional (Edwards *et al.*, 2019). Esta avaliação inclui a função biológica dos sujeitos, as emoções subjetivas, consoante o ambiente a que são sujeitos, sendo que dizer que um indivíduo está saudável já não se limita a querer só dizer que não está fisicamente doente, visto que a adaptação do indivíduo pode implicar mudanças na atividade cerebral, sistema endócrino, imunológico, *etc.*, e em termos comportamentais, envolvendo muito mais que a parte física (Broom, 2001; Sapolsky, 2004; Mellor, Hunt & Gusset, 2015).

Dessa forma, o BEA tem diferentes diretrizes que permitem a sua caracterização para um indivíduo e/ou população de animais, e, mesmo que as suas características não sejam totalmente bem definidas, nem os métodos para as avaliar, não há discordância de que a ausência de sinais de stress prolongado é um indicador de bem-estar muito importante (Moberg, 2000; Sapolsky, 2004).

Os possíveis efeitos e a própria existência do stress são conhecidos desde o tempo de Aristóteles e Hipócrates (século V A.C.), no entanto, não foi um assunto com avanços científicos durante muito tempo (Jackson, 2001). Em 1932, Walter Cannon definiu a palavra 'homeostase' como os processos fisiológicos coordenados que mantêm o equilíbrio de um organismo. Descreveu ainda o estado de 'fight or flight' (luta ou fuga), ainda usado atualmente por vários autores, como o mecanismo de resposta de um indivíduo a um fator de ameaça, com uma descarga do sistema nervoso simpático, levando o animal a uma resposta de luta ou de fuga (Cannon, 1929, 1932).

Também na década de 1930, Hans Selye dedicou os seus estudos a esta área, sendo considerado o 'pai do stress'. As hipóteses de Selye foram bastante discutidas, sendo algumas demonstradas corretas, outras incorretas, e outras ainda não esclarecidas até aos dias de hoje. Selye desenvolveu o conceito da "síndrome de adaptação geral" (Selye, 1936), que, apesar de ter sido considerada incorreta, potencializou o avanço acelerado na área do stress durante as décadas seguintes (McEwen, 2000; Sapolsky, 2004).

Apesar de ser um termo central em muitas discussões no mundo científico, para todos os animais, incluindo o Homem, e já tendo sido demonstradas diversas consequências, causas e mecanismos, o termo continua a ser ambíguo e sem parâmetros concretos (Moberg, 2000; Koolhaas *et al.*, 2011). Em 2005, Reeder e Kramer dizem que, para além de mal definido, o termo stress é empregado de forma excessiva e ainda considerado um termo negativo pela maioria, sendo visto como algo exclusivamente mau. Realizado em 2009, outro estudo foca-se na inconsistência da utilização do termo e nos resultados mal interpretados em trabalhos de avaliação de stress (Koolhaas *et al.*, 2011).

O conceito considerado mais correto atualmente foi definido por Gary Moberg (2000), que define stress como “*a resposta biológica desencadeada quando um indivíduo se depara com uma ameaça à sua homeostase*”, no qual a ameaça é o ‘fator de stress’ e a correspondente resposta do indivíduo é a ‘resposta ao stress’. Moberg ainda defende que vários fatores, variáveis entre indivíduos, vão influenciar como um indivíduo avalia um estímulo, se o vê ou não como uma ameaça e qual a combinação de respostas que vai usar no seu combate. O autor refere também que o que realmente afeta o bem-estar não é a resposta que este adota, mas sim a alteração biológica que essa resposta vai provocar, não sendo relevante se essas mudanças ajudam ou não no combate ao fator de stress, pois de qualquer forma existe uma deslocação de recursos biológicos imediatos.

Qualquer vertebrado sofre adaptações de acordo com diversos fatores com que se depara durante a sua vida, sendo que as alterações geradas no organismo a longo ou curto prazo dependem do tipo de situação. Se estamos perante uma situação previsível e recorrente (como a disponibilidade de alimento), onde ocorrem mudanças fisiológicas, ou uma situação imprevisível (como a pressão antropogénica), onde ocorrem mudanças metabólicas e/ou endócrinas (Wingfield & Ramenofsky, 1999; Landys, Ramenofsky & Wingfield, 2006).

Na verdade, o stress como mecanismo biológico não é necessariamente mau, sendo essencial a todas as formas de vida e podendo mesmo ter efeitos estimulantes e prazerosos. Existe uma grande diferença entre o stress agudo e o stress crónico. O stress agudo ocorre por um curto período e, durante esse tempo, os mecanismos de controlo do organismo funcionam eficazmente para restaurar rapidamente a homeostase. Já o stress prolongado, ou crónico, acontece quando esses mecanismos de feedback enfraquecem, resultando na perda do controlo sobre as hormonas que provocam alterações fisiológicas, as quais podem muitas vezes ser irreversíveis (Sapolsky, 1983; Broom, 2001; Sapolsky, 2004; Lu, Wei & Li, 2021).

A falha nos estudos relacionados com avaliação e/ou caracterização do stress (ou de BEA) está, frequentemente, relacionada com a falta de compreensão do termo em si, que leva a que este seja aplicado de forma inadequada a diversas situações. Assim, muitos estudos não fazem a correta distinção entre a avaliação de stress benéfico e stress prejudicial, retirando conclusões que podem estar erradas (Moberg, 2000; Koolhaas *et al.*, 2011). Além disso, os estímulos que podem desencadear estas respostas de stress podem nem ser externos, como por exemplo a hipoglicémia, que é um fator de stress interno, e que autores podem assumir como um fator ambiental, tirando conclusões erradas (Selye, 1973; Reeder & Kramer, 2005)

2.1. A resposta a um fator de stress

O stress, sendo um termo tão discutido, igualmente é a resposta dos indivíduos a este. A resposta ao stress é geralmente considerada o conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais, ou resposta em cascata, que neutralizam os efeitos iniciais dessa reação, e reestabelecem a homeostase do indivíduo (McEwen & Wingfield, 2003; Reeder & Kramer, 2005).

A ativação do sistema de stress ocorre quando o indivíduo reconhece um estímulo como uma potencial ameaça à sua homeostase (Selye, 1973; Moberg, 2000). No caso de avaliar que o fator não é uma ameaça, a resposta fisiológica é mínima ou inexistente. Caso seja uma ameaça média e de curta duração (stress agudo), a resposta produz efeitos benéficos para o indivíduo, com custo biológico reduzido. No entanto, caso seja uma ameaça considerada grave e que gere uma resposta prolongada, esta vai produzir efeitos potencialmente prejudiciais ao indivíduo a médio-longo prazo (stress crónico), e o custo biológico vai ser considerável (Selye, 1974; Sapolsky, 2004; Lu *et al.*, 2021).

Após a perceção do estímulo como potencial ameaça à homeostase pelo sistema nervoso central (SNC), este desenvolve uma resposta biológica que consiste em uma combinação de quatro respostas possíveis: a resposta comportamental, a resposta do sistema nervoso autónomo (SNA), a resposta imunitária e a resposta neuroendócrina (Moberg, 2000; McEwen & Wingfield, 2003; Karaer, Čebulj-Kadunc & Snoj, 2023).

Na resposta comportamental, o indivíduo pode simplesmente afastar-se da ameaça, evitando assim o fator de stress e as possíveis consequências (Wingfield, *et al.*, 1998). Em seguida, a próxima linha de defesa é o SNA, a base da resposta 'fight or flight' de Cannon (1929). O SNA vai afetar vários sistemas durante a resposta ao fator de stress e pode gerar efeitos como alterações no ritmo cardíaco e o aumento da pressão sanguínea, sendo estes efeitos curtos e sem grande impacto. Durante esta fase, a procura constante de energia é satisfeita pelo aumento do desempenho metabólico (Hemsworth, & Barnett, 2000; Moberg, 2000; Reeder & Kramer, 2005; Koolhaas *et al.*, 2011).

O terceiro tipo de resposta, a resposta imunitária, é complexa e ainda não é totalmente esclarecida devido à alta variabilidade individual. Na resposta neuroendócrina, as consequências para o organismo vão depender da duração da resposta biológica, podendo ser uma resposta com benefícios ou neutra, se de curta duração, ou potencialmente prejudicial se a sua duração for mais longa (Selye, 1974; Wingfield *et al.*, 1998; Moberg, 2000). Os efeitos nesta fase são mais duradouros e podem afetar todo o organismo, visto que esta resposta depende da libertação de hormonas com consequências na competência imunitária, na reprodução, no metabolismo e no comportamento (Hemsworth, & Barnett, 2000; Sapolsky, Romero & Munck, 2000; Sapolsky, 2004).

Quando um indivíduo é exposto a um ou mais fatores de stress durante um extenso período, ou se adapta a ele, ou não sobrevive (Selye, 1973; Moberg, 2000). Quando é esse o caso, o animal entra primeiro na fase pré-patológica, em que a resposta ao fator de stress altera a função biológica o suficiente para o animal ficar em risco de desenvolver patologias, e eventualmente na fase patológica, em que o animal pode sofrer de patologias de stress, como comportamentos estereotipados, supressão da reprodução, falta de aptidão física, crescimento anormal, entre outras. (Spencer & McEwen, 1997; Hemsworth & Barnett, 2000; Wingfield, *et al.*, 1998; Sheriff, *et al.*, 2011).

2.2. A resposta neuroendócrina

A hipótese de que o sistema endócrino teria um papel importante na resposta ao stress teve início em 1939 (Selye, 1939), sendo que a descoberta da relação entre o stress e a ativação adrenocortical foi uma das associações primordiais no estudo endocrinológico do stress. O sistema de controlo e de maior relevância na resposta neuroendócrina é o sistema de 'feedback' associado ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), do qual advêm as hormonas esteroides que vão despoletar os diversos fenómenos que fazem parte da resposta ao fator de stress (Buckingham, Smith & Loxley, 1992; Materri *et al.*, 2000; Karaer *et al.*, 2023).

A partir deste ponto, o foco do presente trabalho será nos tecidos relacionados com o eixo HPA, no entanto, apesar deste ter outras funções importantes em diversos sistemas, apenas serão referidas as hormonas relevantes para o estudo apresentado.

Com o objetivo de responder a estímulos externos, as células desenvolveram mecanismos complexos para conseguirem comunicar entre si, enviando e recebendo sinais químicos constantes e regulando e alterando assim as funções de outras células, tecidos e órgãos (Greco & Stabenfeldt, 2012). A sinalização extracelular pode ser de vários tipos, sendo que a mais importante de referir neste trabalho é a sinalização endócrina, uma sinalização caracterizada por ser a longa distância, com origem em células endócrinas, que através da corrente sanguínea vão atuar em células-alvo (Stewart, 2003; Wingfield, *et al.*, 1998).

O sistema endócrino está envolvido no controlo de várias funções biológicas essenciais e é definido como um conjunto de glândulas dispersas pelo organismo, podendo ser um conjunto de células dentro de um determinado órgão (como por exemplo as ilhotas pancreáticas), ou ser um órgão individual, como a hipófise (Stewart, 2003). Então, podemos definir a neuroendocrinologia como o estudo da comunicação entre o SNC e as várias glândulas endócrinas (Materri *et al.*, 2000; Heidemann, 2012).

O sistema neuroendócrino é responsável pela regulação de processos fisiológicos através de mensageiros químicos que estabelecem a conexão entre o hipotálamo, a hipófise e a glândula endócrina em questão, denominados de hormonas (Wingfield, *et al.*, 1998; Sapolsky, 2002; Stewart, 2003). Outra característica importante é a sua capacidade de amplificação de sinal. Este efeito de amplificação é o que permite que pequenas quantidades hormonais tenham efeitos biológicos significativos, característica específica do sistema endócrino (Samuelson, 2007; Greco & Stabenfeldt, 2012; Heidemann, 2012).

Mesmo essa sendo uma característica muito importante, o principal e mais relevante mecanismo de controlo hormonal no sistema endócrino e no eixo HPA, é o mecanismo de 'feedback', que, em função da concentração de determinada hormona na circulação sanguínea, é capaz de inibir ou estimular a sua secreção na respetiva glândula endócrina (Buckingham *et al.*, 1992; Greco & Stabenfeldt, 2012).

2.2.1. Hipotálamo e hormona libertadora de corticotrofina (CRH)

O hipotálamo localiza-se no diencéfalo e é onde a comunicação entre o SNC e o sistema endócrino, na sua maioria, acontece. Para além de controlar grande parte das vias de controlo do SNA, foi demonstrado na década de 1970 que o hipotálamo controla a atividade da hipófise de forma hormonal, e não neural, sintetizando péptidos e aminas que vão influenciar esta a produzir hormonas tróficas (com ação sobre outras glândulas endócrinas), que vão por sua vez influenciar a síntese de hormonas nos tecidos endócrinos (Stewart, 2003; Greco & Stabenfeldt, 2012; Angelousi, Margioris, & Tsatsanis, 2020).

A CRH é uma hormona polipeptídica, produzida no núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN) e é a principal reguladora da libertação da hormona adrenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise anterior, sendo ainda regulada por 'feedback' negativo pelos glicocorticoides (GCs) (Karaer *et al.*, 2023).

2.2.2. Hipófise e adrenocorticotrofina (ACTH)

A hipófise é um órgão conhecido pelo menos há 2200 anos (Miller, 2018) e pode ser considerada a glândula, individualmente, mais importante do sistema endócrino. Esta glândula está dividida em adeno-hipófise (lobo anterior) e neuro-hipófise (lobo posterior), estruturas morfológica e funcionalmente diferentes (Greco & Stabenfeldt, 2012; Heidemann, 2012). Contrariamente às hormonas da adeno-hipófise, as hormonas libertadas pela neuro-hipófise conseguem uma resposta tecidual direta. A adeno-hipófise sintetiza hormonas que vão influenciar outras glândulas a produzir outras hormonas, sendo um importante ponto de controlo hormonal, afetando, entre outros, os órgãos reprodutores, a tiroide, a glândula adrenal e o crescimento (Greco & Stabenfeldt, 2012; Karaer *et al.*, 2023).

A ACTH foi isolada em 1942 (Li, Simpson & Evans) e é uma hormona essencial na manutenção da homeostase e na resposta ao stress, sendo uma das principais hormonas do eixo HPA. Esta hormona é sintetizada na hipófise anterior e tem como principal função estimular a produção de corticoides nas glândulas adrenais (Angelousi *et al.*, 2020).

2.2.3. Glândulas adrenais e as hormonas esteroides

As hormonas podem ser proteínas, péptidos, aminas ou esteroides. As hormonas esteroides podem ser adrenocorticoides, incluindo os mineralocorticoides (MCs) e os glucocorticoides (GCs), ou hormonas sexuais (progesterona, andrógenos, estrogénios). Enquanto as hormonas proteicas podem ser armazenadas na glândula proveniente enquanto não são necessárias, as hormonas esteroides são libertadas assim que são sintetizadas, sendo a taxa de libertação controlada pela taxa de síntese, permitindo assim que a quantificação da concentração de esteroides na corrente sanguínea seja uma boa indicação da sua taxa de libertação (Samuelson, 2007; Greco & Stabenfeldt, 2012; Miller, 2018).

Estas hormonas são produzidas por um par de glândulas endócrinas presentes na cavidade abdominal, anteriormente a cada um dos rins, denominadas glândulas adrenais (Samuelson, 2007; Greco & Stabenfeldt, 2012). As glândulas adrenais foram identificadas como um órgão individual em 1563, mas permaneceram sem grande importância até ao século XX (Miller, 2018). Cada glândula é dividida em córtex e medula adrenal, zonas em que a produção hormonal difere. A medula adrenal secreta principalmente catecolaminas como a epinefrina (adrenalina), noradrenalina e dopamina, importantes na resposta do SNA ao fator de stress. Já o córtex adrenal é composto por três camadas (glomerular, reticular e fascicular) e produz as três classes distintas de hormonas esteroides (MCs, GCs e andrógenos). Apesar da zona reticular também sintetizar GCs, é na zona fascicular que estes são maioritariamente sintetizados (Samuelson, 2007; Greco & Stabenfeldt, 2012; Karaer *et al.*, 2023).

Resumindo a cadeia de 'feedback': os GCs são libertados pelo córtex da glândula adrenal por estimulação da ACTH, sendo esta libertada na hipófise anterior por estimulação da CRH, libertada pelo hipotálamo, que é por sua vez controlada pela quantidade de GCs em circulação (Matteri, Carroll & Dyer, 2000; Greco & Stabenfeldt, 2012; Karaer *et al.*, 2023).

Existem três principais fatores envolvidos no controlo deste sistema (eixo HPA): o ritmo circadiano, o sistema de 'feedback' e o stress, sendo que o stress se sobrepõe aos dois primeiros, caso seja crítico ou prolongado (Przekop *et al.*, 1985; Backus & Wild, 2013). Também é de referir que, após o primeiro sinal de um possível fator de stress, os GCs demoram cerca de 3-5 minutos a serem libertados, 15-30 minutos para atingir o seu pico na circulação e, em caso de fatores de stress curtos, 60-90 minutos a retomar ao nível base (De Kloet, Sibug, Helmerhorst & Schmidt, 2005).

A estrutura final da hormona esteroide vai depender das enzimas específicas dentro de cada célula. No caso da glândula adrenal, as células do córtex possuem as enzimas necessárias para a formação de ambas categorias de hormonas adrenocorticais (MCs e GCs) e para a formação de hormonas sexuais, existindo uma prioridade, em caso de necessidade de ambas, na síntese das primeiras (Miller & Auchus, 2011; Greco & Stabenfeldt, 2012).

O metabolismo das hormonas esteroides ocorre principalmente no fígado e geralmente envolve redução da molécula e conjugação com sulfatos e glicuronídeos, tornando os esteroides hidrossolúveis, permitindo que os metabolitos sejam excretados pelas fezes através da bília ou pela urina através dos rins (Samuelson, 2007; Greco & Stabenfeldt, 2012).

2.2.3.1. O cortisol

Na década de 1930, foram isolados seis componentes libertados pela glândula adrenal, sendo o componente F o que chamamos hoje de cortisol (Mason, Hoehn & Kendall, 1938). No caso dos répteis, anfíbios, aves, e algumas espécies de mamíferos (especialmente roedores), a corticosterona é o GC predominante, mas na maioria dos mamíferos e marsupiais, o principal GC sintetizado é o cortisol. Assim, no planeamento de estudos em que o tema são os GCs, deve-se sempre recorrer à literatura da espécie em que o estudo incide (Vinson *et al.*, 2007; Sheriff, Dantzer, Delehanty, Palme & Boonstra, 2011).

Sendo uma hormona lipofílica, o cortisol é transportado maioritariamente por uma globulina com alta afinidade denominada transcortina, sendo que 75% do cortisol em circulação se encontra ligado a esta, 15% ligado à proteína albumina e 10% no seu estado livre. Comparativamente a outras hormonas, esta percentagem de hormona em estado livre, é grande. É também importante referir que alterações fisiológicas ou fisiopatológicas podem alterar a quantidade de proteínas disponíveis para esta ligação, devendo ser sempre considerada esta influência (Samuelson, 2007; Greco & Stabenfeldt, 2012; Backus & Wild, 2013).

Relativamente à excreção, em 1972, Lindner injetou cortisol marcado em ovelhas para avaliar o mecanismo de excreção e constatou que 2/3 dos metabolitos marcados estavam presentes na bília, concluindo que os metabolitos formados no fígado entravam na circulação enterohepática e eram excretados pelas fezes. Vários estudos foram realizados em diferentes espécies (Palme, Fischer, Schildorfer & Ismail, 1996; Palme & Möstl, 1997; Möstl, Messmann, Bagu, Robia & Palme, 1999; Palme, Schatz & Palme, 2001; Palme & Möstl, 2002; Karaer *et al.*, 2023), que concluíram que as diferenças entre espécies no processo de excreção dos metabolitos de cortisol são grandes, não só no tipo e quantidade de metabolitos diferentes, como no tempo decorrido entre administração e excreção e ainda na percentagem que era excretada (Millsaugh & Washburn, 2004).

2.3. Consequências biológicas na resposta ao stress

Como já referido, o stress é uma parte essencial à vida de qualquer organismo, havendo situações de stress em que a libertação de GCs é benéfica, como na caça, corrida durante os jogos, no cortejo e nas cópulas (Broom & Johnson, 1993; Sapolsky *et al.*, 2000). No entanto, a elevação de GCs crónica resulta em catabolismo proteico, hiperglicemia, supressão imunitária, suscetibilidade a infeções, problemas cardiovasculares, supressão reprodutiva, entre outras (Elsasser, Klasing, Filipov & Thompson, 2000; Sapolsky, 2002; Jewgenow *et al.*, 2020).

Durante a resposta ao stress a necessidade básica é a energia imediata, sendo que o organismo mobiliza essa energia para os sistemas considerados prioritários, inibindo processos fisiológicos não prioritários, como, por exemplo, inibindo o sistema parassimpático e diminuindo a dor (efeito analgésico) e a inflamação (Hammond, 1944; Sapolsky, 2002; Elsasser *et al.*, 2000).

Após um estímulo de stress, o sistema nervoso simpático é acionado primeiro e estimula a libertação de catecolaminas (como a epinefrina) pela medula da glândula adrenal (Samuelson, 2007; Greco & Stabenfeldt, 2012). No caso da potencial ameaça se manter, o hipotálamo ativa o eixo HPA e o sistema neuroendócrino entra em ação, estimulando a libertação de GCs, como o cortisol, que vão ter efeitos em diversos tecidos e órgãos, como o fígado, músculos, tecido adiposo e pâncreas (Matteri *et al.*, 2000; Lee, Kim & Choi, 2015).

2.3.1. Obtenção de formas energéticas

Após esta sinalização, o armazenamento de formas de energia é inibido e as que já se encontram armazenadas são convertidas e libertadas (Goodman, 1980). Durante a resposta ao stress, o organismo tenta ter o máximo de formas energéticas disponíveis no sangue, sendo que os GCs, não só suspendem o armazenamento de glicose, inibindo a insulina no pâncreas, mas também promovem a libertação das formas energéticas já armazenadas (Elsasser *et al.*, 2000; Sapolsky, 2002).

Assim, no tecido adiposo, estimulam a lipólise (divisão dos triglicéridos) e nos músculos não estritamente necessários para a resposta ao estímulo recebido, inibem o transporte de glicose e aminoácidos e a síntese de proteínas e glicogénio e ainda promovem a degradação das proteínas e glicogénio já existente nesses músculos (glicogenólise e proteólise) (Elsasser *et al.*, 2000; Sapolsky, *et al.*, 2000). Após o aumento de glicose, aminoácidos e ácidos gordos em circulação, os GCs, as catecolaminas libertadas na resposta simpática e o glucagon, estimulam a conversão desses ácidos-gordos e aminoácidos em glicose, no fígado (gliconeogénese), que vai ser depois libertada em circulação (Munk, Guyre & Holbrook, 1984; Sapolsky, 2002).

Assim, numa situação aguda, este processo não causa grandes consequências e até melhora a condição física do animal (Reynaert, Marcus, Paepe & Peeters, 1976). No entanto, em situações prolongadas, a mobilização energética constante vai levar a miopatias, fraqueza, fadiga e até pode causar diabetes esteroide. Para além disto, quando o organismo está constantemente a mobilizar energia, esta é perdida em cerca de 30% da potencial energia útil (Elsasser *et al.*, 2000; Sapolsky, 2002).

2.3.2. Sistema cardiovascular e digestivo

Para que a energia e o oxigénio cheguem aos tecidos-alvo eficazmente, o sistema cardiovascular também sofre alterações. São aumentadas a frequência cardíaca, a pressão arterial, por vasoconstrição, aumentando também a força contrátil cardíaca. O fluxo sanguíneo é praticamente interrompido nas partes do corpo que não são prioritárias, como no sistema digestivo (Sapolsky, 2002; Edwards, 2021). Por último, o volume sanguíneo está diminuído, pela libertação de vasopressina, que aumenta a reabsorção pelos rins (Matteri *et al.*, 2000). Quando o stress é crónico, o resultado de todos estes efeitos é o deterioramento do músculo cardíaco, o enfraquecimento das paredes dos vasos sanguíneos e a deposição de colesterol e formação de placas ateroscleróticas (Sapolsky, 2002; Sapolsky, 2004; Edwards, 2021).

No sistema gastrointestinal, para além do menor fluxo sanguíneo, é interrompida a formação de enzimas digestivas e saliva, sendo que a constante exposição pode causar úlceras gástricas (Moberg, 2000; Sapolsky, 2002; Sapolsky, 2004).

2.3.3. Reprodução

No princípio deste capítulo, é referido que um animal, para ser considerado em BEA ótimo, tem de ser capaz de se reproduzir (Moberg, 2000). A resposta ao stress leva a vários comprometimentos no sistema reprodutor, incluindo não só fisiologicamente, mas também a possível inibição por stress social da subordinação, como é o caso do lobo ibérico (Rivier, 1995; Sapolsky, 2002; Barja, Silván, & Illera, 2008).

Nas fêmeas, a secreção da CRH inibe a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), indiretamente inibindo a hormona estimuladora de folículos (FSH) e hormona luteinizante (LH) (Rivier, 1995; Moberg, 2000). Os GCs também inibem a sensibilidade dos ovários à LH e a diminuição de progesterona e o aumento da prolactina não permite a maturação uterina normal, mecanismo que impede que, mesmo ocorrendo ovulação, a fixação na parede uterina é improvável. Nos machos, a CRH diminui também a GnRH e os GCs inibem a sensibilidade testicular à LH (Moberg, 1985; Rivier, 1995). O resultado é a diminuição da testosterona libertada, por vezes diminuição na produção de espermatozoides e a impotência, visto que a ereção inicial depende do sistema parassimpático, inibido durante a resposta neuroendócrina (Moberg, 1985; Rivier, 1995; Sapolsky, 2002).

2.3.4. Risco fetal e neonatal

Sendo que o stress disturba a homeostase e muitos sistemas neuroendócrinos, a exposição a fatores de stress durante a vida fetal e neonatal pode também ter consequências significativas na fisiologia e anatomia de um organismo ainda em desenvolvimento (Liu, Caldji, Sharma, Plotsky & Meaney, 2000), sendo estudado e demonstrado que os GCs são transferidos, na maioria das espécies mamíferas, da mãe para a cria, através do leite (Zarrow, Philpott & Denenberg, 1970; Catalani *et al.*, 2000), e que, essa transferência trazia consequências para os novos indivíduos, como o aumento de recetores do hipocampo para GCs, uma diferença na atividade do eixo HPA e até nas suas reações comportamentais a fatores potencialmente stressantes (Casolini *et al.*, 1997; Catalani *et al.*, 2000).

Apesar de vários estudos mostrarem que a exposição a fatores de stress no desenvolvimento fetal e neonatal pode tornar o novo indivíduo mais resistente a situações de stress futuras, é questionado o seu bem-estar durante o amadurecimento. Por exemplo, em ratos, a circulação da hormona de crescimento (GH) é inibida durante a resposta a stress, sendo que se esta inibição for prolongada, o crescimento do indivíduo fica seriamente em risco (Lay, 2000; Liu, *et al.*, 2000; Champagne & Meaney, 2001). Mesmo nos adultos, a inibição da GH tem consequências a nível de reparação de tecidos, por exemplo, na substituição do cálcio ósseo, podendo causar descalcificação e suscetibilidade a fraturas (Lay, 2000; Sapolsky, 2002).

Apesar deste assunto ainda não ser muito estudado, não deixa de levantar a questão de que a exposição a demasiados fatores de stress durante a gestação possivelmente afeta os novos indivíduos de forma severa, o que vai dificultar o seu crescimento como indivíduo saudável, e consequentemente, a continuação próspera da sua espécie (Liu, *et al.*, 2000; Champagne & Meaney, 2001; Walker, Boersma & Wingfield, 2005).

2.3.5. Sistema imunológico

Uma das consequências mais graves que o stress crónico pode causar é a imunossupressão, deixando o indivíduo mais suscetível a infeções e patologias (Sapolsky, 2002), desde as mais comuns, como os parasitas intestinais (Custer & Pence, 1981), como as mais graves que podem levar à sua morte, como por exemplo, no caso dos canídeos, infeções por dois grandes vírus, o coronavírus e o parvovírus tipo 2 (Kreeger, 2003; Stewart, 2003; Pratelli, 2008; Molnar *et al.*, 2014; Molnar *et al.*, 2015).

Quando um patógeno está presente, existe um sistema em cadeia de alerta, marcação e destruição do mesmo. Durante a resposta ao stress, os GCs inibem a libertação das citocinas, responsáveis pelo sinal inicial, o que desregula este sistema de sinalização.

Os GCs podem ainda bloquear a maturação dos linfócitos, retirá-los da corrente sanguínea e mesmo destruí-los por apoptose (Besedovsky & Del Rey, 1996; Sapolsky, 2002).

A teoria mais aceite no momento de escrita deste trabalho como explicação da imunossupressão durante a resposta de stress diz que há uma atividade imunológica aumentada, provocada pelo sistema nervoso simpático, e se este aumento for constante, pode levar a uma hiperativação não controlada, podendo ainda, em um cenário mais grave, causar uma doença autoimune. Os GCs, que são libertados posteriormente, devolvem o sistema imune à linha base, para diminuir este risco de hiperativação (Munck, Guyre & Holbrook 1984; Sapolsky, 2002).

Os GCs começam por inibir as células imunes mais antigas, para que células com maior potencial de ajuda possam surgir (Besedovsky & Del Rey, 1996), no entanto, no caso do stress crónico, a ação dos GCs tende a inibir o sistema imune abaixo da linha base, causando assim a temida imunossupressão (Sapolsky, 2002). Claro que, se o animal contrair uma patologia ou doença por outro motivo, a própria infeção é já um fator de grande stress, e vai naturalmente produzir uma maior quantidade de GCs (Sapolsky, 2004).

Com todas estas consequências possivelmente a acontecer, encontrar uma população com indivíduos em stress crónico vai ser altamente improvável, visto que, ou estes se adaptam aos fatores de stress a que estão constantemente sujeitos, ou não sobrevivem muito tempo e essa subpopulação deixa de existir (Romero, 2004; Walker *et al.*, 2005).

3. Técnicas não-invasivas para quantificação hormonal e as suas limitações

Cada vez mais se opta por técnicas minimamente ou não-invasivas para estudos desta natureza, principalmente quando se incide sobre populações *in situ* ou animais particularmente sensíveis e/ou difíceis de lidar, visto que estas evitam o contacto direto e/ou a sedação do animal (Millsaugh & Washburn, 2004; Schwarzenberger, 2007).

São métodos utilizados especialmente para investigação nas áreas de endocrinologia, reprodução, comportamento e BEA (Millsaugh & Washburn, 2004). Embora a medição de GCs não seja equivalente à medição do nível de stress, é sem dúvida um marcador extremamente importante, estando os seus valores interligados com a sobrevivência, reprodução e desempenho dos indivíduos no seu meio natural (Palme, 2005; Palme, 2019). Medições de fatores fisiológicos, neste caso, marcadores de stress, permitem-nos compreender melhor como os animais lidam com mudanças ambientais, sociais, entre outras (Millsaugh & Washburn, 2004; Wikelski & Cooke, 2006).

3.1. Tipos de amostras

Geralmente os GCs são medidos no sangue (plasma ou soro), sendo a técnica mais comum, pois obtemos de imediato uma visão do que está a acontecer naquele indivíduo, naquele momento (Palme, 2005). No entanto, devem ser sempre considerados certos aspetos, como a necessidade de anestésiar o animal, por ser uma técnica invasiva, não só pelo bem-estar do próprio animal, mas também pela segurança da pessoa a realizar a recolha (Millspaugh & Washburn, 2004; Palme, 2019). Ainda, para além de nem sempre existir a possibilidade de sedação, a própria recolha pode causar a perceção de uma potencial ameaça pelo indivíduo e a consequente libertação de GCs como uma resposta de stress aguda (Cook, Mellor, Harris, Ingram & Matthews, 2000; Sheriff *et al.*, 2011).

Mesmo com todas estas limitações mencionadas, a análise de GCs no sangue continua a ter vantagens, como os valores no momento da recolha, que nos permite obter conhecimento da situação do eixo HPA antes da metabolização das hormonas. Os dados recolhidos são mais precisos e o facto de as amostras serem muito estáveis durante anos, ou até décadas, faz toda a diferença, dependendo, claro, do tipo de estudo pretendido (Möstl & Palme, 2002; Sheriff *et al.*, 2011; Palme, 2019).

Assim, cada vez mais investigadores recorrem a métodos minimamente ou não-invasivos, como o pelo, a urina, as fezes ou a saliva (Palme, 2005; Sheriff *et al.*, 2011). Na saliva, conseguimos obter resultados bastante semelhantes aos do plasma, visto que o cortisol é um esteroide lipossolúvel, e passa livremente do sangue para a saliva (Riad-Fahmy *et al.*, 1982; Wood, 2009). Cada espécie tem de ser cuidadosamente analisada, pois a percentagem de passagem pode variar e os valores de cortisol encontrados na saliva podem não ser 100% correlacionados aos que seriam encontrados no sangue (Wood, 2009; Palme, 2019). Ainda, os GCs salivares só aparecem 20-30 minutos após o pico, ao contrário de no sangue, em que a deteção é quase imediata (Kirschbaum & Hellhammer, 1989; Sheriff *et al.*, 2011).

Outra amostra que pode ser recolhida para a análise de GCs de forma não-invasiva, é o pelo ou as penas. Estas amostras trazem um enorme potencial para estudos que pretendem avaliar o stress de forma crónica, pois o pelo tem um crescimento bastante lento, o que permite avaliar momentos passados ou até mesmo a evolução dos valores hormonais ao longo do comprimento do pelo (Sheriff *et al.*, 2011; Jewgenow *et al.*, 2020). É possível a utilização deste tipo de amostras, pois o pelo/penas crescem em contacto com capilares sanguíneos, sendo assim que entra em contacto com o cortisol (Cone, 1996; Jewgenow *et al.*, 2020). É uma quantificação de meses, em comparação com a maioria das amostras que

nos dão informação de horas ou dias, não sendo indicado para estudos de períodos mais curtos (Sheriff *et al.*, 2011; Palme, 2019).

Por último, as fezes e a urina constituem o tipo de amostragem mais frequentemente escolhido para análises não-invasivas de animais em laboratório, de zoo, domésticos e livres no seu *habitat* (Millspaugh & Washburn, 2004; Palme, 2005). Esta técnica tem sido utilizada desde a década de 70 em aves e desde a década de 80 em mamíferos (Palme, 2005).

Um dos fatores mais relevantes na utilização de dejetos é o atraso temporal inerente a estes (Palme *et al.*, 1996; Palme & Möstl, 1997). Os metabolitos que são excretados pelas fezes têm um atraso temporal variável em cada espécie, podendo até variar entre indivíduos da mesma espécie, correspondendo ao tempo de passagem pelo intestino (Möstl *et al.*, 1999; Palme & Möstl, 2001). Esta característica é essencial a ter em consideração na planificação de estudos com análises fecais, como por exemplo, ter uma recolha de amostras bastante mais precisa para a deteção de pequenos picos de libertação (agudo), do que na recolha de amostras para detetar libertações por períodos prolongados (crónico) (Palme & Möstl, 2002).

A dieta e a composição bacteriana do sistema digestivo podem também influenciar os resultados deste tipo de estudos, pois podem alterar o volume fecal, a frequência de defecação (efeito acumulativo) e, mais importante, podem alterar o metabolismo dos GCs (Dantzer, McAdam, Palme, Boutin & Boonstra, 2011). No caso de animais selvagens, a disponibilidade e valor nutritivo do alimento, especialmente a fibra, pode variar em cada estação do ano, o que altera os níveis de GCs tanto diretamente, como indiretamente, pela alteração da flora microbiana intestinal (Wasser *et al.*, 1993), e, especificamente em carnívoros, há ainda a possibilidade de os níveis de FCMs variarem também pelo consumo direto das hormonas presentes nas presas (von der Ohe & Servheen, 2002; McDonald, Roth & Anderson, 2018).

3.2. Recolha, armazenamento e preparação de amostras

A recolha das amostras fecais necessita de planeamento conforme o objetivo do estudo, sendo este passo facilitado em animais em cativeiro e mais desafiador na avaliação de animais no seu *habitat* (Millspaugh & Washburn, 2004; Palme, 2019). Assim, para a avaliação de fatores de stress, e com a improbabilidade de ter amostras com o ideal pico de excreção de cortisol, as amostras recolhidas em séries frequentes podem ser consideradas, sendo importante considerar que a amostra recolhida em campo pode não ser da espécie, sexo e/ou idade pretendida (Millspaugh & Washburn, 2004; Touma & Palme, 2005). Ainda considerar quanto tempo decorreu desde que foi excretada, até ser conservada corretamente,

sendo que, idealmente, as amostras devem ser congeladas imediatamente após a defecação. No entanto, em estudos sobre populações *in situ*, isto é extremamente difícil de alcançar (Schwarzenberger, 2007, Palme, 2019).

Seria importante avaliar a influência dos aspetos ambientais, especialmente meteorológicos, como a temperatura e a chuva, na degradação dos metabolitos de cortisol nas fezes (Washburn & Millspaugh, 2002; Donini *et al.*, 2022). A quantidade de água no dejetos parece ter uma forte influência na quantidade de FCMs ainda presentes, podendo aumentar, diminuir, ou manter o valor verdadeiro da hormona, sendo que até a própria alteração pode ser variável (Mesa-Cruz, Brown & Keely, 2014; Webber, Henley, Pretorius, Somers & Ganswindt, 2018; Santamaria, Schlagloth, Palme & Henning, 2021). Também o contrário pode acontecer, em que os FCMs podem degradar-se pela secagem sob altas temperaturas ou pelo metabolismo bacteriano que é alterado, tal como Terio (2002) demonstrou em chitas.

Em adição às diferenças entre espécies, diferentes protocolos de recolha, preparação e análise da amostra, existem ainda inúmeros fatores inerentes ao próprio animal, que podem influenciar os níveis de metabolitos esteroides, não só nas fezes, mas também em outras amostras, incluindo o plasma (Millspaugh & Washburn, 2004; Palme, 2019). Cada indivíduo tem características variáveis que podem alterar os níveis de GCs, como a genética, as suas próprias experiências anteriores, stress pré-natal, estado reprodutivo, sexo, idade, dieta, entre outros (Sapolsky, 2000; Busch & Hayward, 2009).

Outro fator a considerar é a alta variabilidade na localização dos metabolitos no próprio dejetos, pois nem sempre estes estão homogeneamente distribuídos. Visto que a análise é feita com apenas uma pequena porção da amostra (cerca de 0,2g), esta deve ser homogeneizada antes de proceder à extração hormonal (Brown, Wasser, Wildt & Graham, 1994; Wasser, Papageorge, Foley & Brown, 1996; Wasser *et al.*, 2000; Washburn & Millspaugh, 2002). Em 2003, Millspaugh e Washburn testaram as diferenças de valores de FCMs em diferentes porções de dejetos, antes e depois da homogeneização, sendo que, para além dos valores serem mais variáveis antes da homogeneização, também eram mais elevados.

Após a subamostragem, as amostras devem ser pulverizadas num pó fino, anteriormente à extração. No caso da espécie em estudo ser um carnívoro, há um fator importante a considerar, não necessário quando se trata de uma espécie não predatória, pois as fezes dos predadores são muitas vezes constituídas por material indigerível das presas pelas quais se alimentam, como ossos e pelo. Isto não só pode afetar o peso das amostras na sua preparação, como também levanta a questão se o pelo das presas pode libertar esteroides e alterar os valores hormonais. Ainda mais, sendo que não se sabe se a passagem

de esteroides do pelo para o dejetos pode ocorrer durante o período de armazenamento, a remoção do pelo anteriormente à extração não resolve o problema (Sands & Creel, 2004; Greenberg, Montgomery, Holekamp & Beehner, 2022).

Em 2022, Greenberg e colaboradores, realizaram um estudo em hienas, adicionando e removendo pelo a diferentes amostras, antes do processo de extração para corticosterona e progesterona, na tentativa de avaliar a transferência de hormonas do pelo para o material fecal durante o processo. Os resultados observados nesse estudo não foram significativos para nenhuma das hormonas aquando da remoção de pelo, o que conclui que não há transferência hormonal durante o processo de extração. No caso da adição de pelo, houve diferenças significativas para a progesterona, mas os níveis eram abaixo dos controlos, o que sugere que também não haja transferência da hormona previamente ao processo de extração.

3.3. Extração hormonal e ELISA

Seguindo para a fase seguinte, na extração dos metabolitos é necessária uma cuidadosa escolha do solvente para extração, sendo o metanol e o etanol os mais comuns e o metanol o mais utilizado, especificamente em mamíferos (Möstl & Palme, 2002; Palme, 2005). Após a preparação da amostra e a extração dos metabolitos, a análise é feita geralmente com a utilização de imunoensaios competitivos específicos e muito sensíveis, podendo ainda ser imunoensaios enzimáticos (ELISA) ou radio-imunoensaios. O radio-imunoensaio depende de um isótopo radioativo para a quantificação dos GCs, enquanto os ensaios enzimáticos utilizam enzimas, que geram um sinal de cor para essa mesma quantificação, sendo este último preferível para a maioria dos investigadores. (Sheriff *et al.*, 2011; Palme, 2019).

O método de ELISA é um método bioquímico analítico quantitativo, principalmente utilizado na área da imunologia, para deteção de um anticorpo ou antigénio numa determinada amostra, sendo também um popular método diagnóstico em áreas de medicina. Moléculas com baixa concentração, como proteínas, vitaminas e hormonas, têm grande especificidade, sendo então possível desenvolver reações antigénio-anticorpo específicas e assim quantificar amostras com pouca concentração da hormona procurada (Hornbeck, 1992; Chem, 2005; Engvall, 2010).

4. Objetivos

Este estudo pretende comparar os valores de cortisol fecal em dejetos recolhidos entre outubro de 2020 e setembro de 2022, pertencentes a indivíduos de duas alcateias de lobo-ibérico, ocupantes numa área circundante a uma mina de lítio em expansão no distrito de Vila Real. Assim, os objetivos neste trabalho são os seguintes:

- Comparação global dos níveis de cortisol fecal em lobos da alcateia do Barroso e da alcateia do Leiranco
- Avaliação da influência de fatores intrínsecos e extrínsecos nos valores de cortisol dos lobos da alcateia do Barroso e da alcateia do Leiranco

Capítulo III – Materiais e Métodos

1. População e área de estudo

Este trabalho integra-se no ‘Plano de Monitorização do Lobo-Ibérico na Mina do Barroso’, o qual tem por objetivo o estudo do impacto no lobo na área deste projeto. Este plano teve início em 2020 e decorrerá até ao final da recuperação ambiental da área da exploração mineira. Os resultados obtidos até ao início da fase de construção das infraestruturas da mina servirão para a elaboração da situação de referência a qual permitirá analisar os possíveis impactos da exploração desta mina.

1.1. Área de estudo

A área da concessão mineira situa-se nas freguesias de Dornelas e de Covas do Barroso (maioritariamente em Covas do Barroso), concelho de Boticas, distrito de Vila Real, entre a Serra do Barroso e o rio Tâmega. Esta região é considerada Património Agrícola Mundial, em 2017, pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO). A área de estudo apresenta uma densa rede viária formada por diversas estradas nacionais, estradas municipais e caminhos florestais.

É uma área montanhosa, onde se destacam a serra do Barroso (1279 m), a serra do Leiranco (1155 m), a Lomba da Seixa (1174 m) e o Monte Minheu (1203 m), situado na serra do Alvão, com vertentes acentuadas e planaltos em altitude. Esta região caracteriza-se por um verão seco e temperado e inverno chuvoso, com queda de neve frequente no inverno. A temperatura média anual ronda os 10°C, existindo uma grande variação ao longo do ano. As manadas de bovinos em regime extensivo e o tradicional pastoreio de rebanhos, maioritariamente de cabras, fazem grande parte da paisagem da região (Roque, 1999; Petrucci-Fonseca, Vieira, Duarte, Almeida & Campos, 2022). As áreas de pastoreio extensivo predominam nas zonas de maior altitude (Figura 9). A densidade populacional é relativamente baixa (INE, 2021), concentrada especialmente em pequenas aldeias e diminuindo em altitude (Figura 10).

De acordo com o ‘Plano de Monitorização do Lobo-Ibérico na Mina do Barroso’, a área de estudo compreende a concessão mineira e áreas adjacentes para uma melhor compreensão da estrutura populacional da espécie, tendo em conta a sua grande mobilidade. Assim, a área de estudo compreende 36 quadrículas UTM de 5x5 km, num total de 900 km².

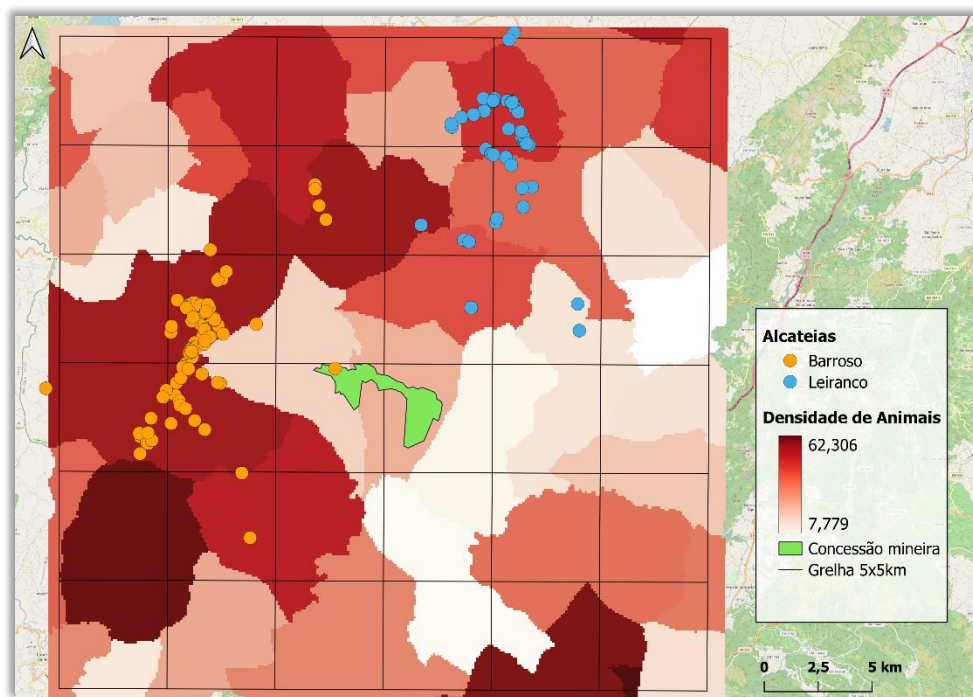


Figura 9 – Representação da densidade de animais domésticos na área de estudo, com pontos de recolha das amostras e respetivas alcateias. (QGIS 3.30.3).

Fonte: Com base nos dados do censo de 2001 do INE (www.ine.pt).

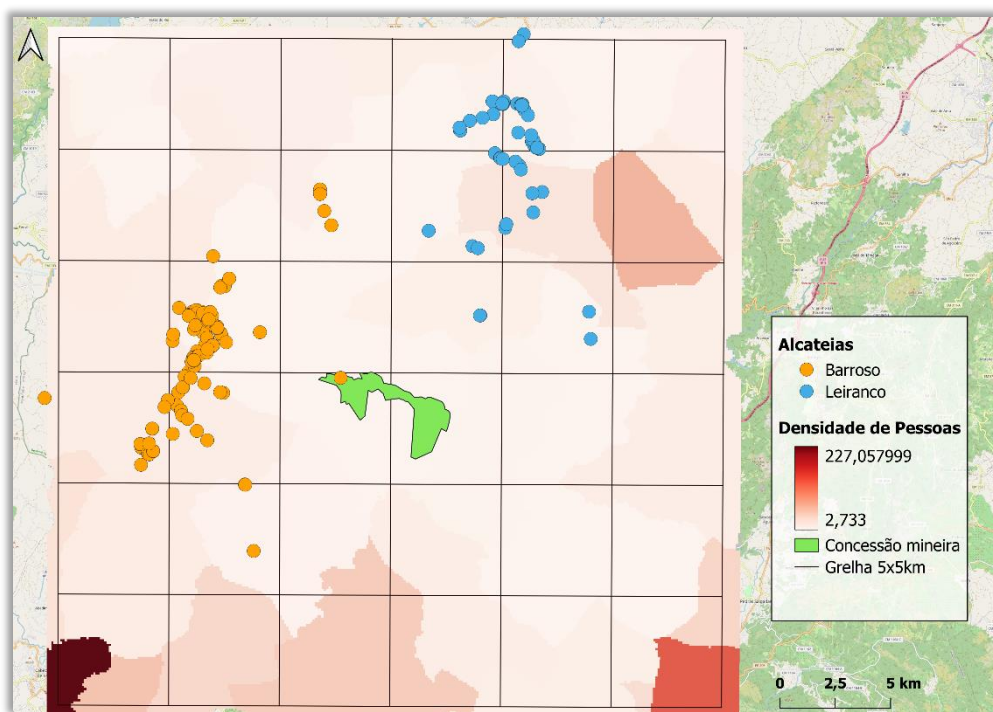


Figura 10 – Representação da densidade populacional na área de estudo, com pontos de recolha das amostras e respetivas alcateias. (QGIS 3.30.3).

Fonte: Com base nos dados do censo de 2001 do INE (www.ine.pt).

1.2. População lupina

A área de estudo abrange o território de quatro alcateias, entre as quais se incluem as alcateias estudadas – alcateia do Barroso e alcateia do Leiranco (Figura 11), pertencentes ao núcleo populacional lupino de Peneda-Gerês, como caracterizado no último censo do lobo-ibérico realizado em Portugal (Pimenta *et al.*, 2023).

No decorrer dos primeiros anos do ‘Plano de Monitorização do Lobo-Ibérico na Mina do Barroso’ (Petrucchi-Fonseca *et al.*, 2022), os dados recolhidos permitiram caracterizar as duas referidas alcateias e os seus indivíduos. Foram identificados nos dois anos de amostragem 15 lobos na alcateia do Barroso e 10 na alcateia do Leiranco, sendo que houve desaparecimento de indivíduos de um ano para o outro, que pode ser devido a mortes ou à dispersão natural para novos territórios.

As alcateias foram identificadas através da relação entre as informações geográficas de cada amostra e as áreas referidas no censo de 2002/2003 (Pimenta *et al.*, 2005) para cada uma destas, em conjunto com relações de parentesco identificadas pela análise genética (Petrucchi-Fonseca, Vieira, Duarte, Almeida & Campos, 2024).

Foi também calculada a área mínima de cada uma das alcateias, que em Portugal pode variar entre 50 e 300 km². O valor da área ocupada pela alcateia do Barroso é maior (129 km²), em relação ao valor da área ocupada pela alcateia do Leiranco (67 km²). É também de ter em conta que a área da alcateia do Leiranco poderá ainda ocupar território a norte do limite da área de estudo (Roque, Álvares & Petrucci-Fonseca, 2001).

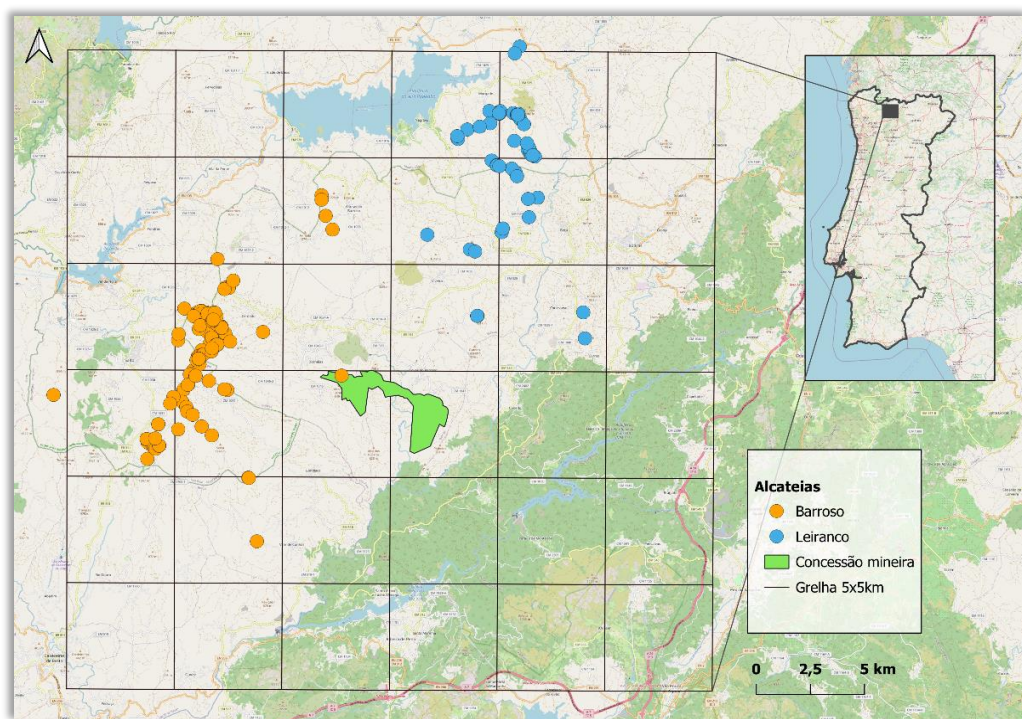


Figura 11 – Mapa da área de estudo, incluindo representação da mina, localização de cada amostra e respetiva alcateia. (QGIS 3.30.3).

2. Amostragem

2.1. Trabalho de campo

Neste estudo, foi realizada a recolha de dejetos, o vestígio de presença de lobo mais comum, e que nos permite obter diferentes tipos de informação que possibilitam a extensão do conhecimento em vários aspetos da ecologia e biologia do lobo (Millsaugh & Washburn, 2004). Assim, foram percorridos percursos ao longo de caminhos e trilhos e recolhidos os dejetos identificados morfológicamente como sendo da espécie. Estes foram individualmente identificados com um número, coordenadas do local e data de recolha. De seguida foram armazenados e transportados até ao laboratório na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), onde foram mantidos a -20°C, de forma a minimizar a sua degradação.

2.2. Análise molecular

Devido à grande semelhança morfológica entre os dejetos de lobo e os dejetos de cães de grande porte, os dejetos recolhidos foram inicialmente analisados no laboratório de genética do Centro de Ecologia, Evolução e Alterações Ambientais (cE3c), na FCUL. Primeiramente foi descrito o seu estado geral, nomeadamente a humidade, a cor e/ou cheiro, a quantidade de restos de presas, como pelo e ossos, e outras observações relevantes para uma descrição macroscópica completa.

De seguida, foi feita a extração de ADN em todas as amostras, seguida de PCRs para a amplificação e sequenciação de uma sequência específica de *Canis lupus* de forma a confirmar a espécie (Albaugh, Iyengar & Lohani, 1992; Petrucci-Fonseca *et al.*, 2022).

Foi também realizada a sexagem molecular das amostras já confirmadas como sendo de lobo, através da amplificação de duas sequências, uma localizada no cromossoma X, e outra no cromossoma Y, sendo cada amostra identificada como pertencente a um indivíduo fêmea, macho ou de sexo não identificado.

Ainda no laboratório de genética, foi feita a genotipagem utilizando um painel de 10-18 microssatélites para a identificação de indivíduos e das respetivas alcateias. O trabalho genético prévio à análise do cortisol foi descrito mais extensivamente na casuística de estágio (Capítulo I) apresentada no início deste trabalho.

3. Análise hormonal

3.1. Preparação de amostras

Em preparação para a análise hormonal, foram selecionadas apenas as amostras como sendo de lobo, e foram reavaliadas macroscopicamente, tendo em conta a quantidade de amostra disponível, humidade e rácio entre pelo e dejecto. As amostras selecionadas para análise hormonal foram descongeladas durante a noite no frigorífico a 4°C, e numa câmara de biossegurança, foram recolhidos entre 5 a 10 g de amostra, dependendo da humidade e quantidade da amostra original, para tubos falcon de 50 ml, tendo o cuidado de recolher pedaços de diferentes áreas dentro da mesma amostra, de forma a obter uma subamostra representativa do dejecto.

Seguiu-se uma adaptação dos protocolos desenvolvidos para a extração de hormonas glucocorticoides em dejectos, inicialmente de babuínos (Wasser, Monfort, Southers & Wildt, 1994), e mais tarde desenvolvidos para carnívoros (Young *et al.*, 2004). Para a preparação anterior à extração, as amostras foram liofilizadas durante 48 a 72 horas, antes de serem pulverizadas em um pó fino, com recurso a um almofariz e pilão, com (38 amostras) ou sem (48 amostras) adição de azoto líquido, consoante a consistência de cada amostra. As amostras com maior conteúdo de pelo (150 amostras) foram pulverizadas posteriormente utilizando um moinho de esferas (RETSCH MM 400).

3.2. Protocolo de extração hormonal

Foram pesados 0,2 g de amostra pulverizada para um tubo de ensaio de vidro, foram adicionados 5 ml de etanol 90%, e foi colocado um berlinde de vidro no topo do tubo. De seguida, os tubos foram colocados num tacho com areia, sob uma placa de aquecimento. A temperatura foi subida até ao ponto de ebulição do etanol (aproximadamente 78°C) e foi estabilizada por volta dos 80°C, usando um tubo com 5 ml de etanol 90% e um termómetro como referência. As amostras foram fervidas durante cerca de 20 minutos, e o berlinde permitiu a libertação de gases (ou seja, pressão) durante a fervura. Os tubos foram retirados para um suporte, onde permaneceram a arrefecer durante cerca de 40 minutos.

As amostras foram transferidas para tubos de ensaio de plástico, foi adicionado 1 ml de etanol 90% a cada tubo e, de seguida, foi feita uma centrifugação durante 20 minutos a 1800 rotações por minuto (rpm). Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml. Este processo foi repetido mais duas vezes, adicionando mais 5 ml e 4 ml, respetivamente, seguido de 1 minuto de vórtex e mais 20 minutos de centrifugação.

No final, juntou-se o sobrenadante de todos os passos no mesmo tubo Falcon, obtendo 15ml de líquido. Estes foram colocados numa estufa a cerca de 60°C, sem tampa, durante aproximadamente 3/4 dias, até o etanol evaporar 13/14 ml dos 15 ml iniciais. Após atingir essa marca, o restante líquido foi transferido para criotubos e foi colocado novamente na estufa até o restante etanol evaporar, o que demorou cerca de mais 3 dias.

Após a evaporação, as amostras foram resuspendidas uma última vez em 1 ml de metanol 100%, seguido de vórtex durante 1 minuto. Em seguida, foram mergulhadas em banho de ultrassons durante 15 minutos, seguido de vórtex durante 30 segundos. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C até serem analisadas para quantificação dos níveis de cortisol.

3.3. Determinação dos níveis de cortisol

Os níveis de cortisol foram determinados através de um método de ensaio imunoenzimático (ELISA), com recurso a um kit comercial (Enzo Life Sciences ADI-900-071). O kit foi validado para diversas matrizes, nomeadamente os dejetos, em diferentes espécies (Ezenwa, Ekernas & Creel, 2012; Running, 2015; Cinque *et al.*, 2017), incluindo um carnívoro, o leão (Creel, Christianson & Schuette, 2013).

A técnica consiste na utilização de uma placa previamente revestida com o anticorpo específico para a molécula pretendida, o cortisol. Através de uma série de reações enzimáticas, é desencadeado um processo que resulta em cores (Figura 12). Os diferentes gradientes de cores são quantificados através da densidade ótica, lida por espectrofotometria.

Todo o procedimento foi realizado seguindo as indicações do fabricante (Anexo II). Foi realizado um primeiro ensaio com apenas metade de uma placa, onde foram colocadas 4 amostras em diferentes diluições, de forma a decidir qual a mais correta a utilizar para as restantes placas, sendo que foi escolhida a diluição 1:10 para a grande maioria.

Após a leitura da densidade ótica, as concentrações de cortisol foram calculadas através do programa *MyAssays.com*, onde se encontra disponível o modelo de cálculo recomendado pelo fabricante. Depois de inserir todos os dados, foi gerada uma curva padrão de 4 parâmetros, utilizando os padrões de diluição e os valores de densidade ótica, e foram por fim selecionadas as amostras que se encontravam entre o limite superior e inferior apresentados na curva padrão. Aquelas que se encontravam fora da curva foram excluídas do estudo ou repetidas com diluições diferentes.

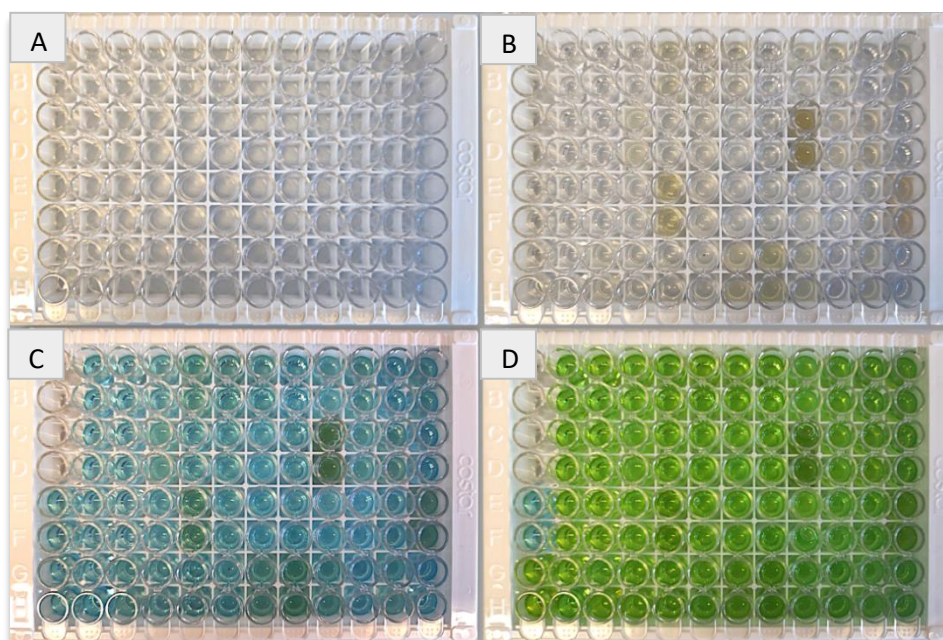


Figura 12 – Ilustração do preenchimento de uma placa ELISA, em 4 fases de adição de reagentes. **(A)** Placa prévia a qualquer adição. **(B)** Placa após a adição dos padrões e amostras. **(C)** Placa após a adição do conjugado azul nos respectivos poços. **(D)** Placa após a adição do anticorpo amarelo nos respectivos poços e a sua reação.

4. Análise Estatística

Os dados foram organizados e transformados no *software Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*. Inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados, que consistiu em medidas descritivas para as diferentes variáveis, testes para avaliação da normalidade da distribuição de probabilidades da variável contínua e teste de homogeneidade de variâncias (teste de *Levene*). Na fase final da exploração de dados, foram construídos gráficos *box-plot*, ou caixa-de-bigodes, para uma visualização gráfica das variações na concentração de cortisol, considerando as categorias das diferentes variáveis qualitativas.

Esta análise inicial tem como objetivo a compreensão das principais características dos nossos dados, o que vai influenciar a escolha de testes utilizados na fase seguinte, a inferência estatística. De seguida, foram realizados testes paramétricos, como o teste *t* para amostras independentes e o modelo de análise de variância (ANOVA). O nível de significância foi de 5%, sendo que a hipótese nula (H_0) considera não existirem diferenças estatisticamente significativas e a hipótese alternativa (H_1) considera que existem diferenças estatisticamente significativas.

Resumindo, foram testadas as possíveis diferenças entre a quantificação de cortisol e as variáveis alcateia, estação do ano e sexo. Após estes resultados, foi ainda realizado o mesmo teste entre os sexos dentro da mesma alcateia.

4.1. Análise exploratória e descrição das variáveis

4.1.1. Ano de recolha

O ano de recolha foi usado para estudar a diferença na quantidade de amostras recolhidas em cada ano. Isto é relevante, pois a frequência com que os percursos foram realizados para a recolha de amostras variou de um ano para o outro. Para a análise estatística, esta variável foi dividida em ano 1 (amostras entre outubro de 2020 e setembro de 2021) e ano 2 (amostras entre outubro de 2021 e setembro de 2022).

4.1.2. Sexo

Como já foi referido, para a determinação desta variável foram utilizadas técnicas genéticas, e nem sempre foi possível determinar o sexo da amostra. No entanto, a exclusão das amostras não identificadas resultaria numa quantidade muito pequena de amostras para as análises deste trabalho. Assim, foram classificadas três categorias: masculino, feminino e não determinado.

4.1.3. Alcateia

A alcateia é uma das variáveis mais relevantes para este projeto. As amostras foram classificadas em duas categorias nesta variável consoante a sua origem geográfica e/ou genética, sendo estas a alcateia do Barroso e do Leiranco. As amostras recolhidas pertencentes a outra alcateia ou a alcateias desconhecidas foram eliminadas deste estudo.

4.1.4. Estação do ano

Para esta variável, foram utilizadas as datas de recolha de cada uma das amostras. Assim, foram utilizadas quatro categorias, sendo estas o Outono (setembro, outubro e novembro), o Inverno (dezembro, janeiro e fevereiro), a Primavera (março, abril e maio) e o Verão (junho, julho e agosto).

4.1.5. Concentração de cortisol

Primeiramente, foram calculadas as medidas estatísticas média, mediana, variância e desvio-padrão, e foram produzidos gráficos, como o histograma da densidade de observações, com o objetivo de visualizar a sua distribuição e conhecer o padrão dos dados. Foram ainda realizados testes de normalidade, teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, que confirmam o que pode ser observado nas representações gráficas. Sendo que os dados não apresentam uma distribuição normal, foi aplicada uma transformação logarítmica de base 10 (Log_{10}), e repetida a análise.

Capítulo IV – Resultados

1. Análise Exploratória dos dados

1.1. Variáveis qualitativas

O cortisol foi quantificado em 236 amostras, das quais 193 seguiram para análise estatística. Em relação ao ano de recolha, no primeiro ano foi recolhido um número inferior de amostras, o que se traduziu num número inferior de amostras disponíveis para este estudo. Posto isto, foram analisadas 75 (38,9%) amostras do primeiro ano e 118 (61,1%) do segundo ano de recolha (Figura 13, A). Na variável sexo, das 193 amostras analisadas, não foi possível determinar o sexo em 62 (32,1%) amostras. Das restantes, 50 (25,9%) eram pertencentes a fêmeas e 81 (42%) a machos (Figura 13, B). Relativamente à alcateia, foram descartadas as amostras pertencentes a outras alcateias e alcateias desconhecidas, sendo que apenas as pertencentes às alcateias do Barroso e do Leiranco foram contabilizadas para a análise estatística. Assim, foram analisadas 133 (68,9%) amostras pertencentes à alcateia do Barroso, e 60 (31,1%) pertencentes à alcateia do Leiranco (Figura 13, C). Por fim, em relação à estação do ano, foram analisadas 40 (20,7%) amostras com data de recolha no inverno, 65 (33,7%) na primavera, 57 (29,5%) no verão e 31 (16,1%) no outono (Figura 13, D).

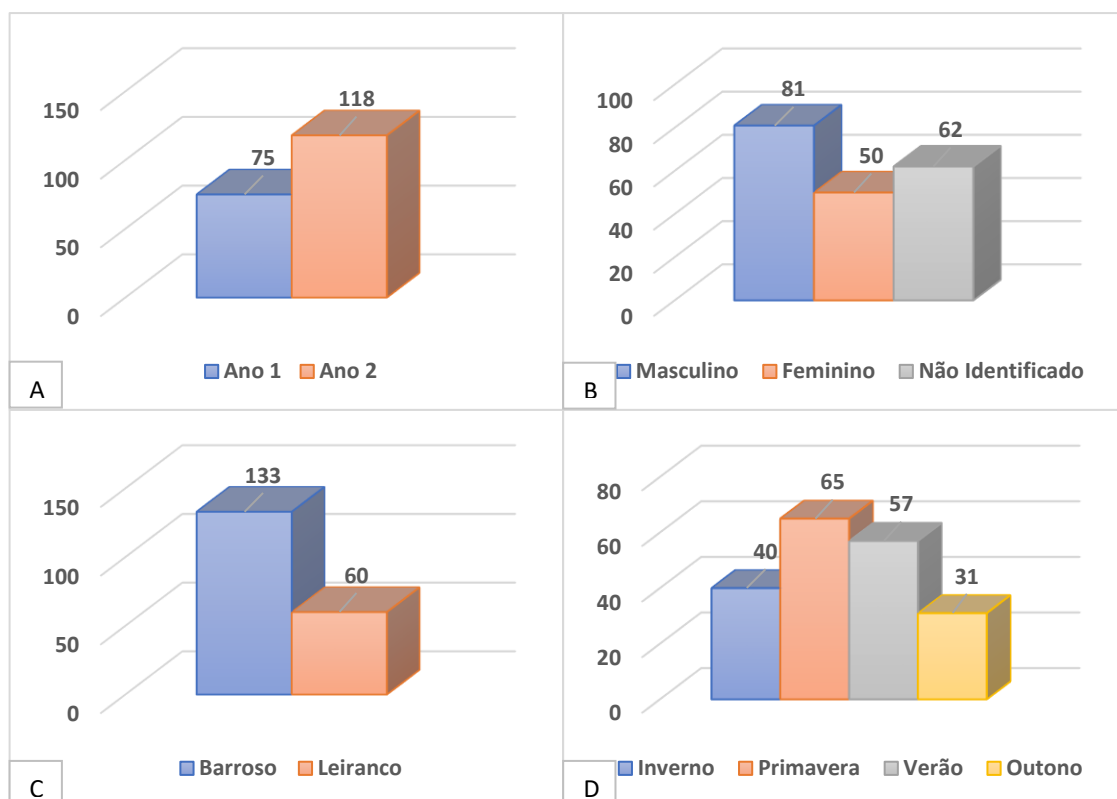


Figura 13 – Frequências absolutas para: **(A)** Variável ano de recolha. **(B)** Variável Sexo. **(C)** Variável alcateia. **(D)** Variável estação do ano.

1.2. Variável quantitativa continua

Os valores de cortisol variaram entre 7,50 ng/g e 618 ng/g e apresentam um valor médio de 105,95 ng/g, uma variância de 11058,44 e desvio-padrão de 105,16.

1.3. Variações na concentração de cortisol com as variáveis qualitativas

As médias da concentração de cortisol para cada categoria foram calculadas, no entanto, nos gráficos, foi utilizada a mediana como medida de tendência central, visto que as distribuições não são simétricas e a média é muito influenciada por valores extremos. Assim, relativamente à variável sexo, a média dos valores de concentração de cortisol foi de 1,90 para os machos, 1,83 para as fêmeas e 1,78 para as amostras de sexo não identificado. Neste primeiro gráfico (Figura 14), podemos observar que, apesar do centro da distribuição de valores seja a mesma para machos e fêmeas, a dispersão da concentração de cortisol nos machos assume valores mais altos do que nas fêmeas. Podemos ainda observar que o valor máximo e mínimo nos machos é mais extremo do que nas fêmeas e que a assimetria de distribuição de valores é positiva para os machos e negativa para as fêmeas. Para as amostras de sexo não identificado, a média e mediana são mais baixas, mas os valores máximo e mínimo são semelhantes aos dos machos, o que faz sentido, visto que, em regra geral, temos mais amostras de machos do que de fêmeas.

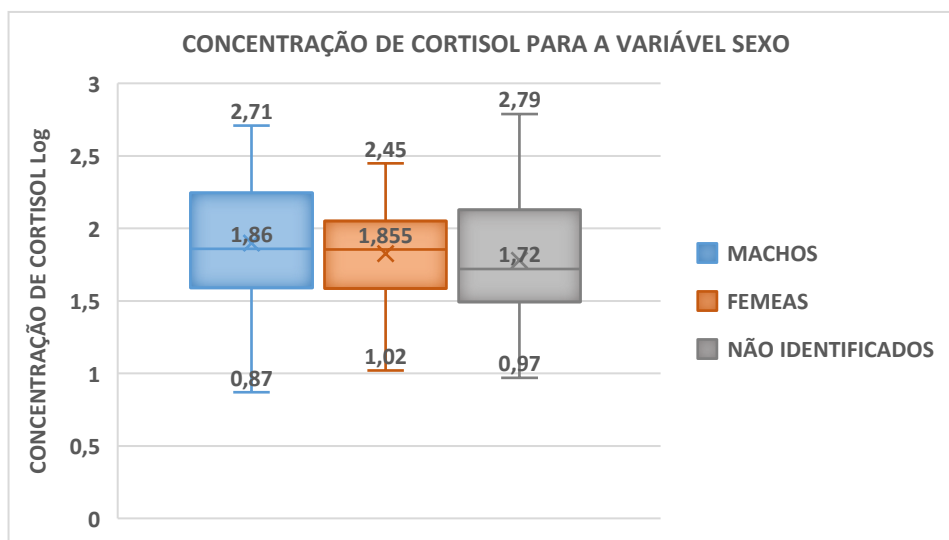


Figura 14 – Concentração de cortisol Log por cada categoria da variável sexo, incluindo valor de mediana, mínimo e máximo.

Em relação à alcateia, os valores médios de concentração de cortisol são de 1,79 e 1,96 para as alcateias do Barroso e do Leiranco, respetivamente. Podemos observar no gráfico seguinte (Figura 13) que também existe uma diferença significativa entre os valores de mediana das duas alcateias, sendo o da alcateia do Leiranco superior ao do Barroso.

A dispersão dos valores, para ambas as alcateias, é mais simétrica que na variável anterior, mas na alcateia do Leiranco a concentração é em valores mais elevados que na alcateia do Barroso. Os valores máximos e mínimos são próximos de uma alcateia para a outra, não deixando de se verificar valores mais extremos para a alcateia do Leiranco. Podemos corroborar o gráfico apresentado na Figura 15 com uma representação das médias de cortisol por quadrícula da área de estudo (Figura 16).

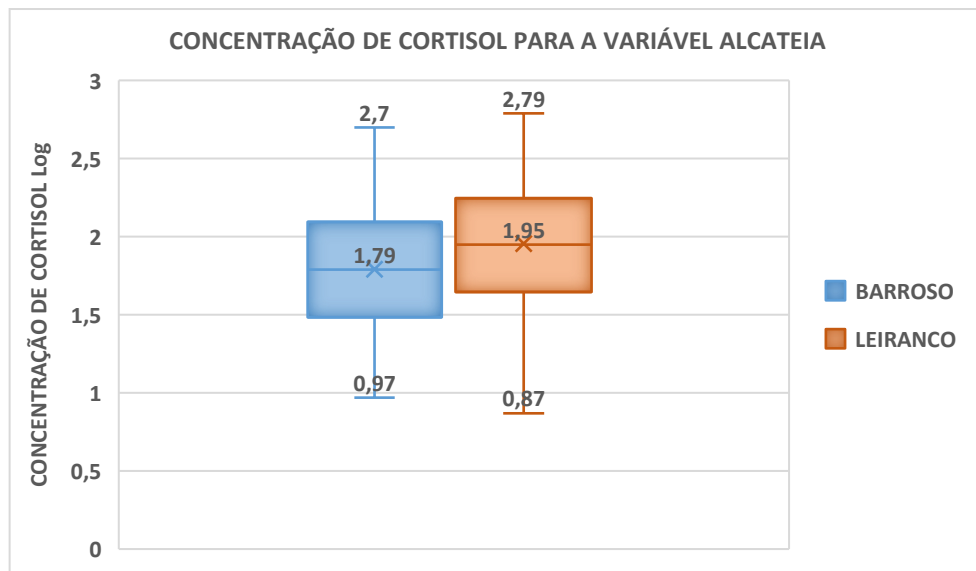


Figura 15 – Concentração de cortisol Log por cada categoria da variável alcateia, incluindo valor de mediana, mínimo e máximo.

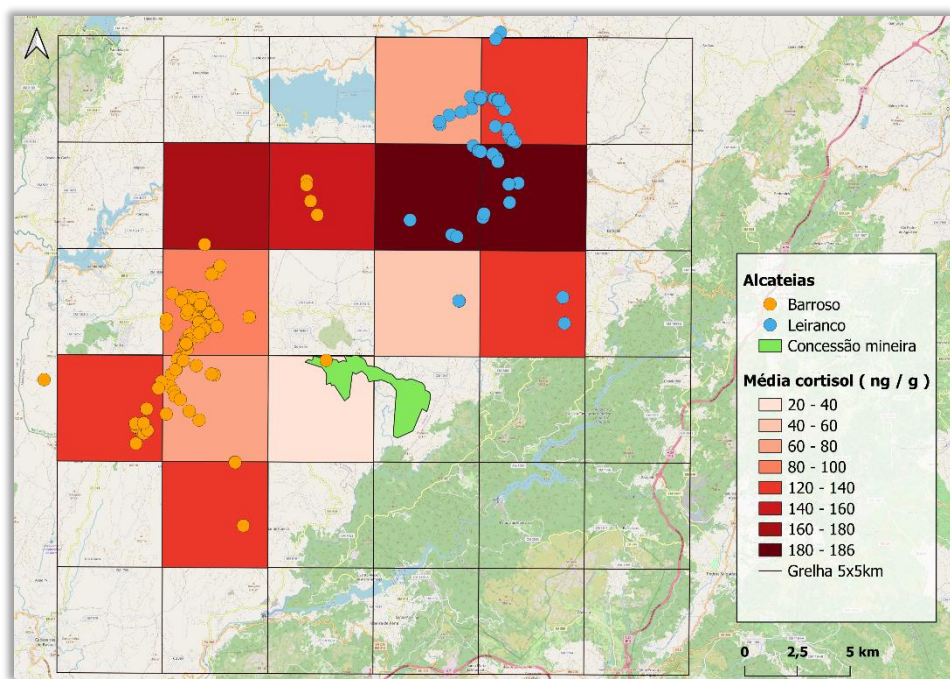


Figura 16 – Representação da concentração de cortisol em ng/g, por quadricula da área de estudo em que se enquadram amostras recolhidas. (QGIS 3.30.3).

Por fim, para a variável estação do ano, os valores médios de concentração de cortisol são de 1,70 para o inverno, 1,79 para a primavera, 1,89 para o verão e 2,06 para o outono. Com o auxílio da figura 15, podemos verificar que em ambas as medidas de tendência central, a subida de valores é significativa de estação para estação. A dispersão de valores é, com exceção do verão, assimétrica positivamente e os valores máximos e mínimos não são muito diferentes, com exceção do outono, em que verificamos que o valor mínimo é significativamente mais elevado que nas restantes estações.

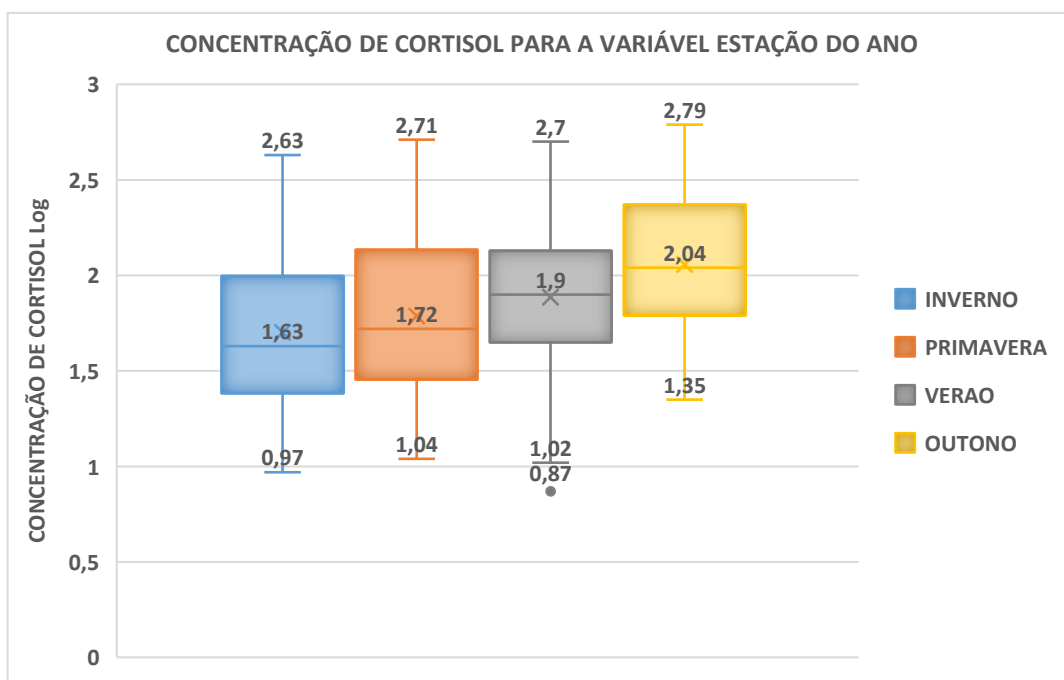


Figura 17 – Concentração de cortisol Log por cada categoria da variável estação do ano, incluindo valor de mediana, mínimo, máximo e outlier.

2. Inferência estatística

Utilizando testes estatísticos paramétricos, podemos confirmar as observações anteriores, nas caixas *box-plot*. Assim, é possível verificar pelos testes *t* realizados, que existem diferenças estatisticamente significativas para a variável alcateia ($p\text{ value} = 0,009$), mas não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para a variável sexo entre machos e fêmeas ($p\text{ value} = 0,217$). A análise seguinte, da variável sexo em cada alcateia, também não apresentou diferenças estatisticamente significativas, sendo que $p\text{ value} = 0,103$ na alcateia do Barroso e $p\text{ value} = 0,631$ na alcateia do Leiranco.

Para a variável estação do ano, com o auxílio da ANOVA, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p\text{ value} = 0,001$, $F = 5,418$, $df = 192$).

Capítulo V – Discussão

Com este trabalho, foi possível quantificar os metabolitos da hormona cortisol nas fezes de lobo-ibérico, *Canis lupus signatus*, e comparar os valores obtidos para cada sexo, alcateia e estação do ano, durante os dois anos de amostragem do Plano de Monitorização do Lobo-Ibérico – Mina do Barroso. Por ser uma espécie altamente perseguida pelo Homem e classificada como “Em Perigo”, especialmente em Portugal, onde o contacto é tão próximo entre a população humana e lupina, é essencial encontrar um equilíbrio (Pimenta *et al.*, 2005; Torres & Fonseca, 2016).

Com esta proximidade, os lobos são confrontados regularmente com situações que podem despoletar reações de stress, o que pode provocar diversas consequências biológicas no organismo podendo causar suscetibilidade a doenças graves, supressão reprodutiva, ou até morte, se em exposição por um longo período, colocando inevitavelmente em risco a recuperação e conservação da espécie (Sapolsky, 2002; Walker *et al.*, 2005; Torres & Fonseca, 2016).

Este trabalho é pioneiro para o lobo-ibérico em Portugal, tendo a metodologia utilizada já sido validada em vários outros canídeos próximos, nomeadamente no lobo, *Canis lupus* (Sands & Creel, 2004; Molnar *et al.*, 2015), no lobo mexicano, *Canis lupus baileyi* (Pifarré *et al.*, 2012) e também no cão doméstico, *Canis lupus familiaris* (Schatz & Palme, 2001). Posto isto, estudos como este devem ser cuidadosamente analisados e interpretados, e os valores não devem ser comparados estritamente entre estudos, mas sim comparados os padrões hormonais encontrados.

Relativamente aos resultados obtidos para a variável sexo, podemos observar que o número de amostras identificadas como sendo de macho é superior ao das amostras identificadas como sendo de fêmea (Figura 13 (B)). Isto pode ser explicado pelas características da própria espécie, visto que os machos tendem a movimentar-se e a marcar o território com mais frequência, nomeadamente em cruzamentos, facilitando assim a deteção e recolha destas amostras durante o trabalho de campo (Mech & Boitani, 2003; Barja, de Miguel & Bárcena, 2004; Rio-Maior, Beja, Nakamura & Álvares, 2018).

Na quantificação de FCMs para a variável sexo, a diferença não foi estatisticamente significativa, o que vai de encontro aos resultados obtidos em estudos realizados no lobo, *Canis lupus* (Bryan *et al.*, 2015; Molnar *et al.*, 2015), em outra subespécie, *Canis lupus ligoni* (Roffler, Karpovich, Charapata & Keogh, 2022) e também em diferentes espécies de

carnívoros, como nas hienas, *Crocota crocuta* (Montgomery *et al.*, 2022) e no cão doméstico, *Canis lupus familiaris* (Sandri, Colussi, Perrotta & Stefanon, 2015).

Podemos observar que o número de amostras recolhidas pertencentes à alcateia do Barroso é mais do dobro das pertencentes à alcateia do Leiranco (Figura 13 (C)). Esta diferença é proporcional ao tamanho da área ocupada e quantidade de indivíduos pertencentes a cada uma das alcateias, sendo de 129 km² para 15 indivíduos na alcateia do Barroso e 67 km² para 10 indivíduos na alcateia do Leiranco.

Relativamente à quantificação dos níveis de cortisol, a alcateia do Leiranco apresenta valores significativamente maiores em relação à alcateia do Barroso (Figuras 15 e 16). Esta diferença pode dever-se a diversos fatores, especialmente relacionados com a presença humana e disponibilidade de alimento. Em um estudo realizado em 2011 (Eggermann e colaboradores), onde foram relacionadas diversas variáveis com a presença de lobos, concluiu-se que o fator com maior influência em Vila Real é a presença de gado. Já Ferrão da Costa (2013), em outro estudo, sugere que o fator mais relevante para a presença de lobos em todo o território português, é a altitude, que se correlaciona com uma maior disponibilidade de gado em regime extensivo, em simultâneo com uma menor densidade populacional humana.

A avaliação dos possíveis fatores de stress para qualquer estudo *in situ* é complexa. Especialmente no caso da subespécie ibérica em causa neste trabalho, sendo que a grande proximidade a fatores antropogénicos, à presença e perseguição direta pelo Homem, às infraestruturas e estradas próximas, e ainda uma época venatória ocorrente na área são fatores extremamente importantes de analisar.

De facto, a alcateia do Leiranco encontra-se numa zona com maior densidade humana e menor densidade de gado, em comparação com a área ocupada pela alcateia do Barroso (INE, 2021; Figuras 9 e 10). Isto poderá justificar os níveis mais elevados de cortisol encontrados neste estudo nos indivíduos pertencentes à alcateia do Leiranco (Figuras 15 e 16), o que vai de encontro aos resultados mencionados nos estudos acima referidos (Eggermann *et al.*, 2011; Ferrão da Costa, 2013).

Em 2015, Molnar e colaboradores sugerem que o tamanho da alcateia também pode influenciar a quantificação de cortisol, sendo que as alcateias maiores parecem apresentar maior estabilidade e, portanto, menores níveis da hormona de stress, o que vai de encontro aos dados deste trabalho, sendo que nos 2 anos de amostragem, na alcateia do Barroso e do Leiranco foram identificados 15 e 10 indivíduos, respetivamente.

Esta estabilidade pode ser influenciada pela estrutura social da alcateia estar, ou não, bem definida, e os confrontos que possam existir entre indivíduos de dentro ou fora da alcateia, sendo que as interações antagonistas e agressivas são potenciais fatores de stress (Creel, 2001; Sands & Creel 2004; Creel 2005). No caso dos lobos, perder lutas pode aumentar os níveis de GCs (Creel, 2005) e tem sido discutida a possibilidade de o stress crónico poder estar na base da supressão reprodutiva dos indivíduos socialmente subordinados.

Em um estudo realizado em lobo-ibérico por Barja, Silván & Illera (2008), em Espanha, foram analisadas as hormonas sexuais e as hormonas de stress, e concluiu-se que manter a dominância pode ter vantagens (acesso a alimento e parceiros de reprodução), mas os valores de hormonas de stress eram superiores. Este resultado foi similar a outros estudos, como em lobos da Etiópia, *Canis simensis* (van Kesteren *et al.*, 2012) e em lobo, *Canis lupus* (Sands & Creel, 2004; Creel, 2005), em que indivíduos dominantes apresentavam valores mais elevados de GCs.

Contrariamente, o estudo de Molnar e colaboradores (2015) encontrou um indivíduo que diminuiu o seu nível de excreção de cortisol para metade após passar de submisso para dominante. A morte de um indivíduo numa alcateia também pode causar o aumento dos GCs, e é ainda mais relevante quando este faz parte do casal reprodutor (Brainerd *et al.*, 2008), especialmente por impor uma reestruturação da alcateia (Packard, 2012). Em 2015 (Bryan *et al.*), quando comparados os níveis de cortisol entre alcateias de *habitats* diferentes, a alcateia que sofreu uma redução populacional por um programa de abate de lobos, era a alcateia com valores de cortisol mais elevados.

Estas observações destacam a complexa interação entre comportamento social e fisiologia do stress nos lobos, sugerindo que a posição na hierarquia social e a dinâmica do grupo podem ter impactos significativos nos níveis hormonais de stress.

Por último, podemos identificar óbvias diferenças no número de amostras recolhidas nas várias estações do ano (Figura 13 (D)) e que as estações com épocas chuvosas e de tempo mais turbulento são as que apresentam menor número. Isto pode dever-se não só à menor facilidade no trabalho de campo, mas também às condições a que as amostras em si estão sujeitas, podendo estas ser danificadas, dispersadas ou até destruídas, por exemplo, pelo vento, chuva e neve (Millspaugh & Washburn, 2004; Donini *et al.*, 2022).

Relativamente aos valores de cortisol, dois dos maiores fatores a ter em conta na análise desta variável são o ciclo reprodutivo da espécie e a época de caça nesta região. O estado reprodutivo, interligado à sazonalidade, pode influenciar a produção e metabolismo

dos esteroides em muitas espécies de mamíferos, especialmente em fêmeas gestantes, lactantes e/ou perto do parto. Alguns estudos relatam valores superiores no mês de janeiro/fevereiro, pois existe mais produção de esteroides na altura de reprodução, e consequentemente, em fevereiro/março, existe menos produção dessas hormonas, por 'feedback' negativo (Ganong, 1995; Millspaugh & Washburn, 2004; Edwards & Boonstra, 2018). No entanto, o cortisol não está identificado nesta associação em lobos em nenhuma das fases de gestação, assim como já foi descrito em cães (exceto durante o parto, onde há variação) (Seal, Plotka, Mech & Packard, 1987; Olsson, Bergström, Kindahl & Lagerstedt, 2003). Esta não associação está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, visto que o inverno foi a estação do ano com menores valores de cortisol (Figura 17).

A época venatória próxima à área de estudo decorre entre setembro e fevereiro (ICNF, s.d.), porém maioritariamente no outono, que corresponde à estação que apresenta valores de cortisol mais elevados no presente trabalho (Figura 17). Embora em Portugal não seja permitida a caça de lobos, a presença de pessoas e o aumento de perturbações sonoras dão a perceção de perigo, gerando os mesmos sinais de alerta.

Um estudo realizado em 2012 (Pifarré *et al.*) quantificou os níveis de cortisol em fezes de lobo mexicano, *Canis lupus baileyi*, para avaliar o efeito que os visitantes do zoo tinham nos seus níveis de possível stress. Os níveis de FCMs eram superiores nos períodos com mais visitantes no zoo, demonstrado também por alterações comportamentais. Estes resultados vão ao encontro de um estudo similar em leopardo-das-neves (*Panthera uncia*), onde os valores de cortisol eram mais elevados nos animais expostos a visitantes, comparados com os que não eram (Wielobnowski, Fletchall, Carlstead, Busso & Brown, 2002). Estes estudos reforçam os efeitos negativos da presença humana mais próxima destes animais, podendo surgir o mesmo durante a época de caça em Portugal, na nossa área de estudo.

Capítulo VI - Conclusão

Este estudo alcançou os objetivos propostos, comparando os níveis de metabolitos da hormona cortisol nas fezes de lobo-ibérico, *Canis lupus signatus*, em duas alcateias que ocupam áreas circundantes a uma concessão mineira em fase de elaboração do Relatório de Conformidade Ambiental do Projeto de Execução (RECAPE), no distrito de Vila Real. A diferença de valores foi estatisticamente significativa entre as alcateias, e entre as quatro estações do ano, mas não foi estatisticamente significativa entre sexos, o que está de acordo com a literatura.

No caso deste trabalho ser repetido, e com o objetivo de otimização do método, algumas fases na recolha e processamento das amostras devem ser melhoradas. Para além de aumentar a frequência de recolha das amostras e manter a consistência entre as várias estações, a conservação destas entre a sua recolha e a chegada ao laboratório deve ser otimizada, sendo preferencialmente congeladas. No laboratório, as amostras deveriam ser homogeneizadas antes da extração e o método de pulverização deveria ter sido consistente ao longo do trabalho.

No futuro, seria relevante fazer um estudo semelhante em ambiente *ex situ* controlado, de forma a analisar as variações naturais ao longo do ano, em ambos os sexos, na tentativa de estabelecer um padrão em que pudéssemos basear os estudos *in situ*. São essenciais mais estudos endócrinos nesta espécie, possivelmente com o cruzamento de outras hormonas, como as relacionadas à reprodução e/ou estudos incidentes nas diferenças endócrinas entre indivíduos dominantes e subordinados.

Pode concluir-se que, em viso de um melhor entendimento endócrino nesta espécie, são necessários mais estudos, pois o stress pode levar a várias consequências biológicas, desde alterações comportamentais e reprodutivas, úlceras gástricas e doenças cardíacas, até imunossupressão, suscetibilidade a infeções e morte. Quaisquer novos dados são fundamentais para a inovação, planeamento, implementação e gestão dos planos de conservação do lobo-ibérico.

Referências Bibliográficas

- Albaugh, G. P., Iyengar, V., Lohani, A., et al. (1992). Isolation of Exfoliated Colonic Epithelial Cells, a Novel, Non-Invasive Approach to the Study of Cellular Markers. *Int. J. Cancer* 1992, 52, 347–350.
- Almeida, M. (2008). Caracterização de áreas de criação de lobo ibérico no nordeste português. Tese de dissertação de mestrado em biologia da conservação. Departamento de Biologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 51pp.
- Álvares, F. (2006). Espécies emblemáticas & desenvolvimento rural: o potencial do lobo-ibérico e da sua identidade na cultura popular. Actas das Jornadas sobre Biodiversidade e Mundo Rural: Perspetivas e Estratégias de Conservação da Fauna Selvagem. Associação ALDEIA/NEBUP.
- Álvares, F. (2011). Ecologia e conservação do lobo (*Canis lupus*, L.) no Noroeste de Portugal. Tese de doutoramento apresentada à Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Álvares, F., Barroso, I., Espírito-Santo, C., Ferrão da Costa, G., Fonseca, C., Godinho, R., Nakamura, M., Petrucci-Fonseca, F., Pimenta, V., Ribeiro, S., Rio-Maior, H., Santos, N. & Torres, R. (2015). Situação de referência para o Plano de Ação para a Conservação do Lobo-ibérico em Portugal. ICNF/CIBIO-INBIO/CE3C/UA. Lisboa. 67 pp.
- Álvares, F., Sá, I., Rodrigues, J. B., Casimiro, J. (2019). Manual de Convivência com o Lobo. Paredes de Coura, Portugal: ALDEIA/CIBIO/Município de Paredes de Coura.
- Angelousi, A., Margioris, A. N., & Tsatsanis, C. (2020). ACTH action on the adrenals. *Endotext*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279118/>
- Antunes, M. T. (1993). Mamíferos em Portugal: extinções desde o Plistocénico Superior. *Liberne*, 43/44: 6-10.
- Arlian, L.G., Bruner, R.H., Stuhlman, R.A., Ahmed, M., Vyszenski-Moher, D.L. (1990). Histopathology in hosts parasitized by *Sarcoptes scabiei*. *J Parasitol*. 76(6):889–894.
- Ausband, D. E., Mitchell, M. S., Bassing, S. B., Morehouse, A., Smith, D. W., Stahler, D., Struthers, J., (2016). Individual, group, and environmental influences on helping behavior in a social carnivore. *Ethology* 122, 1–10.
- Ausband, D. E., Brzeski, K. E., & Moyer, M. A. (2017). Reproductive Den Site Selection and Habitat Characteristics of Gray Wolves in the Central Rocky Mountains. *Journal of Wildlife Management*, 81(2), 273–281.

- Backus, J. W., & Wild, D. (2013). VITROS® ECiQ Immunodiagnostic System, VITROS® 3600 Immunodiagnostic System, and VITROS® 5600 Integrated System. *The Immunoassay Handbook*, 1, 579–584.
- Baker, M. R., Gobush, K. S., & Vynne, C. H. (2013). Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. *Journal for Nature Conservation*, 21(5), 309–318.
- Barber-Meyer, S. M., White, P. J., & Mech, L. D. (2007). Survey of selected pathogens and blood parameters of northern Yellowstone elk: wolf sanitation effect implications. *The American Midland Naturalist*, 158(2), 369-381.
- Barja, I., de Miguel, F. & Bárcena, F. (2004). The importance of crossroads in faecal marking behaviour in wolves (*Canis lupus*). *Die Naturwissenschaften*. 91. 489-92.
- Barja, I., Silván, G., & Illera, J. C. (2008). Relationships between sex and stress hormone levels in feces and marking behavior in a wild population of Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *Journal of Chemical Ecology*, 34(6), 697–701.
- Besedovsky, H. O., & del Rey, A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine reviews*, 17(1), 64-102.
- Brainerd, S. M., Andrén, H., Bangs, E. E., Bradley, E. H., Fontaine, J. A., Hall, W., ... & Wydeven, A. P. (2008). The effects of breeder loss on wolves. *The Journal of Wildlife Management*, 72(1), 89-98.
- Broom, D. M., Johnson, K. G. (1993). *Stress and animal welfare* (Vol. 993). London: Chapman & hall.
- Broom, D. M. (2001). Coping, stress and welfare. *Proceedings of Dahlem Conference on Coping with Challenge: Welfare in Animals Including Humans*. Berlin: Dahlem University Press, pp. 1-9.
- Brown, J. L., Wasser, S. K., Wildt, D. E., & Graham, L. H. (1994). Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biology of reproduction*, 51(4), 776-786.
- Bryan, H. M., Smits, J. E., Koren, L., Paquet, P. C., Wynne-Edwards, K. E., & Musiani, M. (2015). Heavily hunted wolves have higher stress and reproductive steroids than wolves with lower hunting pressure. *Functional Ecology*, 29(3), 347-356.
- Buckingham, J. C., Smith, T., & Loxley, H. D. (1992). The control of ACTH secretion. The adrenal gland, 2, 131-158.

- Busch, D. S., & Hayward, L. S. (2009). Stress in a conservation context: a discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. *Biological Conservation*, 142(12), 2844-2853.
- Campos, R. (2018). Survival and population dynamics of the Iberian wolf in Portugal. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto. Biodiversidade, Genética e Evolução.
- Cannon, W. B. (1929). Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Researches into the Function of Emotional Excitement. Appleton, New York.
- Cannon, W. B. (1932). The wisdom of the body. W W Norton & Co.
- Cardillo, M., Purvis, A., Sechrest, W., Gittleman, J. L., Bielby, J., & Mace, G. M. (2004). Human population density and extinction risk in the world's carnivores. *PLoS biology*, 2(7), e197.
- Cardoso, J. L. (1993). Contribuição para o conhecimento dos grandes mamíferos do Plistocénico Superior de Portugal (pp. 171-567).
- Casolini, P., Cigliana, G., Alema, G. S., Ruggieri, V., Angelucci, L., & Catalani, A. (1997). Effect of increased maternal corticosterone during lactation on hippocampal corticosteroid receptors, stress response and learning in offspring in the early stages of life. *Neuroscience*, 79(4), 1005-1012.
- Catalani, A., Casolini, P., Scaccianoce, S., Patacchioli, F. R., Spinozzi, P., & Angelucci, L. (2000). Maternal corticosterone during lactation permanently affects brain corticosteroid receptors, stress response and behaviour in rat progeny. *Neuroscience*, 100(2), 319-325.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (2020). Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(24), 13596-13602.
- Champagne, F., & Meaney, M. J. (2001). Like mother like daughter: Evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. *Prog. Brain Res*, 133287-302.
- Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J. D., Von Arx, M., Huber, D., Andrén, H., ... & Boitani, L. (2014). Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *science*, 346(6216), 1517-1519.
- Cinque, C., De Marco, A., Mairesse, J., Giuli, C., Sanna, A., De Marco, L., ... & Cozzolino, R. (2017). Relocation stress induces short-term fecal cortisol increase in Tonkean macaques (*Macaca tonkeana*). *Primates*, 58, 315-321.

- Cockrem, J. F., & Ishii, S., (1999). Conservation endocrinology - A new field of comparative endocrinology. *In: Kwon, H. B., Joss, J. M. P., Ishii, S. (Eds.), Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology*. Hormone Research Center, Kwangju, Korea, pp. 413 – 418.
- Cockrem, J. F. (2005). Conservation and behavioral neuroendocrinology. *Hormones and Behavior*, 48(4), 492-501.
- Cone, E. J. (1996). Mechanisms of drug incorporation into hair. *Therapeutic drug monitoring*, 18(4), 438-443.
- Convenção relativa à Conservação da Vida Selvagem e dos Habitats Naturais da Europa (Convenção de Berna). (1979). Conselho da Europa, Berna, Suíça.
- Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES). (1973). Washington, D.C.
- Cook, C. J., Mellor D. J., Harris P. J., Ingram J. R., & Matthews L. R. (2000). Hands-on and hands-off measurement of stress. *In: G. P., Moberg, & J. A., Mench. (Eds), The biology of animal stress: Basic Principle and Implications for Animal Welfare* (pp. 123-146). CABI Publishing.
- Creel, S. (2001). Social dominance and stress hormones. *Trends in ecology & evolution*, 16(9), 491-497.
- Creel, S. (2005). Dominance, aggression, and glucocorticoid levels in social carnivores. *Journal of Mammalogy*, 86(2), 255-264.
- Creel, S., Christianson, D., & Schuette, P. (2013). Glucocorticoid stress responses of lions in relationship to group composition, human land use, and proximity to people. *Conservation Physiology*, 1(1).
- Custer, J. W., Pence, D. B. (1981) Host-parasite relationships in the wild Canidae of North America. *In: Chapman J.A., Pursley D., editors. Worldwide Furbearer Conference Proceedings. R. R. . Donnelley and Sons; Falls Church: 1981. pp. 730–759.*
- Dantzer, B., McAdam, A.G., Palme, R., Boutin, S., & Boonstra, R. (2011). How does diet affect fecal steroid hormone metabolite concentrations? An experimental examination in red squirrels. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174:124-131
- Decreto-Lei n.º 54/2016, de 25 de agosto. (2016). *Estabelece medidas de proteção do Lobo Ibérico e revoga o Decreto-Lei n.º 139/90, de 27 de abril*. Diário da República, n.º 165/2016, Série I.

- Deem, S. L. (2015). Conservation medicine to one health: the role of zoologic veterinarians. In *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Volume 8* (pp. 698-703). WB Saunders.
- De Kloet, E. R., Sibug, R. M., Helmerhorst, F. M., & Schmidt, M. (2005). Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(2), 271-281.
- Diretiva 92/43/CEE do Conselho, de 21 de maio de 1992. (1992). *Relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e flora selvagens (Diretiva Habitats)*. Jornal Oficial da União Europeia, L 206, 7–50.
- Donini, V., Iacona, E., Pedrotti, L., Macho-Maschler, S., Palme, R., & Corlatti, L. (2022). Temporal stability of fecal cortisol metabolites in mountain-dwelling ungulates. *The Science of Nature*, 109(2), 1-10.
- Edwards, P. D., & Boonstra, R. (2018). Glucocorticoids and CBG during pregnancy in mammals: diversity, pattern, and function. *General and comparative endocrinology*, 259, 122-130.
- Edwards, K. L., Edes, A. N., & Brown, J. L. (2019). Stress, Well-Being and Reproductive Success. *Advances in experimental medicine and biology*, 1200, 91–162.
- Edwards, S. H. (2021). Corticosteroids in animals. In *Merck Veterinary Manual*. <https://www.msdsvetmanual.com/pharmacology/inflammation/corticosteroids-in-animals>
- Eggermann, J., Da Costa, G. F., Guerra, A. M., Kirchner, W. H., & Petrucci-Fonseca, F. (2011). Presence of Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in relation to land cover, livestock and human influence in Portugal. *Mammalian Biology*, 76, 217-221.
- Elsasser, T. H., Klasing K. C., Filipov, N., Thompson, F. (2000). The metabolic consequences of stress: Targets for stress and priorities of nutrient use. In: G. P., Moberg, & J. A., Mench. (Eds), *The biology of animal stress: Basic Principle and Implications for Animal Welfare* (pp. 43-76). CABI Publishing.
- Engvall, E. (2010). The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Chemistry*, 56(2), 319-320.
- Ezenwa, V. O., Ekernas, L. S., & Creel, S. (2012). Unraveling complex associations between testosterone and parasite infection in the wild. *Functional Ecology*, 26(1), 123-133.
- Fain A. (1978). Epidemiological problems of scabies. *Int J Dermatol*. 17:20–30.

- Ferrão da Costa, G. (2013). Plano de Monitorização do Lobo – Parque Eólico da Serra do Barroso III. Relatório Final de Projeto. março 2013. 60 pp.
- Fritts, S. H., Stephenson, R. O., Hayes, R. D., & Boitani, L. (2003). Wolves and humans. In L. D. Mech & L. Boitani (Eds.), *Wolves: Behavior, ecology, and conservation* (pp. 289–316). Chicago: University of Chicago Press.
- Ganong, W. F. (1995). Review of medical physiology. *Dynamics of blood and lymph flow*, 30, 525-541.
- Godinho, R., Llaneza, L., Blanco, J.C., Lopes, S., Álvares, F., Garcia, E.J., Palacios, V., Cortes, Y., Talegon, J., Ferrand, N. (2011). Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Mol Ecol* 20(24):5154–5166
- Goodman, H. M. (1980). The pancreas and regulation of metabolism. In: Moundcastle V. (Ed.) *Medical Physiology* (14). St. Louis: C. V. Mosby, pp. 1638–1673
- Greco, D. S. & Stabenfeldt, G. H. (2012). Section V: Endocrinology. In Klein, B. G. (Ed.), *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology* (pp. 359-404). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Greenberg, J. R., Montgomery, T. M., Holekamp, K. E., & Beehner, J. C. (2022). Validation and effects of drying and prey hair on fecal hormone concentrations in spotted hyenas. *Journal of Mammalogy*, 103(2), 394-406.
- Hammond, J. (1944) Physiological factors affecting birth weight. *Proceedings of the Nutrition Society* 2, 8–12.
- Hedrick, P., R. Lee, & C. Buchanan. 2003. Canine parvovirus enteritis, canine distemper, and major histocompatibility complex genetic variation in Mexican wolves. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 909–913.
- Heidemann, S. R. (2012). Section I: The cell. In Klein, B. G. (Ed.), *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology* (pp. 359-404). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Hemsworth, P. H. & Barnett, J. L. (2000). Human-animal interactions and animal stress. In: G. P., Moberg, & J. A., Mench. (Eds), *The biology of animal stress: Basic Principle and Implications for Animal Welfare* (pp. 309-336). CABI Publishing.
- Hornbeck, P. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current protocols in immunology*, 1(1), 2-1.

- Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). Zonas de Caça Municipais - Vila Real. Recuperado de [<https://www.icnf.pt/caca/zonasdecacamunicipais/vilareal>]
- IUCN (2025). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2025-1. Recuperado de [<https://www.iucnredlist.org>]
- Jackson, M. (2001). A historical perspective on stress. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 4(1), 37–44.
- Jewgenow, K., Azevedo, A., Albrecht, M., Kirschbaum, C., & Dehnhard, M. (2020). Hair cortisol analyses in different mammal species: choosing the wrong assay may lead to erroneous results. *Conservation Physiology*, 8(1).
- Kahn, L. H., Monath, T. P., Bokma, B. H., Gibbs, E. P., & Aguirre, A. A. (2012). One Health, One Medicine. In A. A. Aguirre, R. S. Ostfeld, & P. Daszak (Eds.), *New directions in conservation medicine: Applied cases of ecological health* (pp. 33–44). Oxford University Press.
- Karaer, M. C., Čebulj-Kadunc, N., & Snoj, T. (2023). Stress in wildlife: comparison of the stress response among domestic, captive, and free-ranging animals. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1167016.
- Kersey, D. C., & Dehnhard, M. (2014). The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *General and comparative endocrinology*, 203, 296-306.
- Kirschbaum, C. & Hellhammer, D. H. (1989). Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology*, 22(3), 150-169.
- Klauder, J. V. (1958). Interrelations of human and veterinary medicine: Discussion of some aspects of comparative dermatology. *New England Journal of Medicine*, 258(4), 170-177.
- Kock, M. D. (1996). Wildlife, people and development: veterinary contributions to wildlife health and resource management in Africa. *Tropical animal health and production*, 28(1), 68-80.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., Meerlo, P., Murison, R., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Sijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(5), 1291-1301.

- Kreeger, T. J. (2003). The internal wolf: physiology, pathology, and pharmacology. *Wolves: Behavior, Ecology and Conservation*. The University of Chicago Press, Chicago and London, 192-217.
- Landys, M. M., Ramenofsky, M., & Wingfield, J. C. (2006). Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *General and comparative endocrinology*, 148(2), 132-149.
- Lay, D. C. (2000). Consequences of stress during development. In: G. P., Moberg, & J. A., Mench. (Eds), *The biology of animal stress: Basic Principle and Implications for Animal Welfare* (pp. 249-268). CABI Publishing.
- Lee, D. Y., Kim, E., & Choi, M. H. (2015). Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB reports*, 48(4), 209.
- Lei n.º 90/88, de 13 de agosto. (1988). *Lei de Proteção do Lobo Ibérico*. Diário da República, n.º 186/1988, Série I.
- Li, C. H., Simpson, M. E., & Evans, H. M. (1942). Isolation of adrenocorticotrophic hormone from sheep pituitaries. *Science*, 96(2498), 450.
- Lindner, H. R. (1972). Enterohepatic circulation and the pattern of urinary excretion of cortisol metabolites in the ewe. *The Journal of Endocrinology*, 52(1), 19-20.
- Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, M. & Meaney, M. J. (2000). Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol*, 125-12.
- Lu, S., Wei, F., & Li, G. (2021). The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. *Cell stress*, 5(6), 76.
- Mason, H. L., Hoehn, W. M., & Kendall, E. C. (1938). Chemical studies of the suprarenal cortex. IV. Structures of compounds C, D, E, F, and G. *Journal of Biological Chemistry* 124(1), 459-474.
- Mathias, M.L. (coord.), Fonseca, C., Rodrigues, L., Grilo, C., Lopes-Fernandes, M., Palmeirim, J.M., Santos-Reis, M., Alves, P.C., Cabral, J.A., Ferreira, M., Mira, A., Eira, C., Negrões, N., Paupério, J., Pita, R., Rainho, A., Rosalino, L.M., Tapisso, J.T. & Vingada, J. (eds.): Livro Vermelho dos Mamíferos de Portugal Continental. FCIências.ID, ICNF, Lisboa.

- Matteri, R. L., Carroll, J. A., & Dyer, C. J. (2000). Neuroendocrine responses to stress. In: G. P., Moberg, & J. A., Mench. (Eds), *The biology of animal stress: Basic Principle and Implications for Animal Welfare* (pp. 43-76). CABI Publishing.
- McCormick, S. D., & Romero, L. M. (2017). Conservation endocrinology. *Bioscience*, 67(5), 429-442.
- McDonald, R. S., Roth, J. D., & Anderson, W. G. (2018). Prey cortisol affects the usefulness of fecal glucocorticoid metabolite concentration as an indicator of stress in a carnivore. *Canadian Journal of Zoology*, 96(4), 367-371.
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior*, 43(1), 2-15.
- Mech, L. D. (1970). The Wolf: The Ecology and Behavior of an Endangered Species. *Journal of Wildlife Management*.
- Mech, L. D., & Boitani, L. (2003). Wolf social ecology. *Wolves: Behavior, Ecology and Conservation*. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Mellor, D. J., & Beausoleil, N. J. (2015). Extending the 'Five Domains' model for animal welfare assessment to incorporate positive welfare states. *Anim. Welf*, 24(3), 241-253.
- Mellor, D. J., Hunt, S., & Gusset, M. (2015). Caring for wildlife. *The world zoo and aquarium animal welfare strategy*. Gland, Switzerland: World Association of Zoos and Aquariums (WAZA) Executive Office.
- Mesa-Cruz, J. B., Brown, J. L., & Kelly, M. J. (2014). Effects of natural environmental conditions on faecal glucocorticoid metabolite concentrations in jaguars (*Panthera onca*) in Belize. *Conservation Physiology*, 2(1).
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine reviews*, 32(1), 81-151.
- Miller W. L. (2018). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: A Brief History. *Hormone research in Paediatrics*, 89(4), 212–223.
- Millsbaugh, J. J., & Washburn, B. E. (2003). Within-sample variation of fecal glucocorticoid measurements. *General and Comparative Endocrinology*, 132(1), 21-26.
- Millsbaugh, J. J., & Washburn, B. E. (2004). Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and comparative endocrinology*, 138(3), 189-199.

- Moberg, G. P. (1985). Influence of stress on reproduction: measure of well-being. In *Animal stress* (pp. 245-267). New York, NY: Springer New York.
- Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. In: G. P., Moberg, & J. A., Mench. (Eds), *The biology of animal stress: Basic Principle and Implications for Animal Welfare* (pp. 1-21). CABI Publishing.
- Molnar, B., Duchamp, C., Möstl, K., Diehl, P. A., & Betschart, B. (2014). Comparative survey of canine parvovirus, canine distemper virus and canine enteric coronavirus infection in free-ranging wolves of central Italy and south-eastern France. *European journal of wildlife research*, 60(4), 613-624.
- Molnar, B., Fattebert, J., Palme, R., Ciucci, P., Betschart, B., Smith, D. W., & Diehl, P. A. (2015). Environmental and intrinsic correlates of stress in free-ranging wolves. *PLoS One*, 10(9), e0137378.
- Möstl, E., Messmann, S., Bagu, E., Robia, C., & Palme, R. (1999). Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 46(10), 621-632.
- Möstl, E., & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology*, 23(1-2), 67-74.
- Montgomery, T. M., Greenberg, J. R., Gunson, J. L., John, K., Laubach, Z. M., Nonnamaker, E., ... & Beehner, J. C. (2022). Measuring salivary cortisol in wild carnivores. *Hormones and Behavior*, 137, 105082.
- Müller, A., Silva, E., Santos, N., & Thompson, G. (2011). Domestic dog origin of canine distemper virus in free-ranging wolves in Portugal as revealed by hemagglutinin gene characterization. *Journal of wildlife diseases*, 47(3), 725-729.
- Munck, A., Guyre, P. M., & Holbrook, N. J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine reviews*, 5(1), 25-48.
- Naughton-Treves, L., Grossberg, R., Treves, A., (2003). Paying for Tolerance: Rural Citizens' Attitudes toward Wolf Depredation and Compensation. *Conserv. Biol.* 17, 1500–1511.
- Nowak, R. M. (2003). Wolf evolution and taxonomy. In L. D. Mech & L. Boitani (Eds.), *Wolves: Behavior, ecology, and conservation* (pp. 239–258). University of Chicago Press.
- Olsson, K., Bergström, A., Kindahl, H., & Lagerstedt, A. S. (2003). Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol and the prostaglandin F2 α metabolite during labour in the dog. *Acta physiologica scandinavica*, 179(3), 281-287.

- Packard, J. M. (2012). Wolf social intelligence. *Wolves: Biology, Behavior and Conservation*. Edited by A. P. Maia and HF Crussi. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, USA, 1-48.
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H., & Ismail, M. N. (1996). Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science*, 43(1), 43-63.
- Palme, R. & Möstl, E. (1997). Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Inst J Mammal Biol*, 62, 192-197.
- Palme, R., Schatz, S., & Möstl, E. (2001). Effect of vaccination on fecal cortisol metabolites in cats and dogs. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 108(1), 23-25.
- Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 75-80.
- Palme, R., Touma, C., Arias, N., Dominchin, M. F., & Lepschy, M. (2013). Steroid extraction: get the best out of faecal samples.
- Palme R. (2019). Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology & behavior*, 199, 229–243.
- Peterson, R.O. & P. Ciucci (2003). The wolf as a carnivore. In: L.D. Mech & L. Boitani (Eds.). *Wolves; Behavior, Ecology and Conservation*. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 104-130.
- Petrucci-Fonseca, F. (1990). O lobo (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) em Portugal. Problemática da sua conservação. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Petrucci-Fonseca, F., Vieira, J., Duarte, L., Almeida, M., & Campos, R. (2022). Plano de Monitorização do Lobo-ibérico na Mina do Barroso, relatório de dezembro 2022 (EN - Iberian wolf's Monitoring plan in Barroso's Mine, report from December 2022).
- Petrucci-Fonseca, F., Vieira, J., Duarte, L., Almeida, M., & Campos, R. (2024). Plano de Monitorização do Lobo-ibérico na Mina do Barroso, relatório de janeiro 2024. Não publicado.
- Pifarré, M., Valdez, R., González-Rebeles, C., Vázquez, C., Romano, M., & Galindo, F. (2012). The effect of zoo visitors on the behaviour and faecal cortisol of the Mexican wolf (*Canis lupus baileyi*). *Applied Animal Behaviour Science*, 136(1), 57-62.

- Pimenta, V. (1998). Estudo comparativo de duas alcateias no nordeste do distrito de Bragança: Utilização do espaço e do tempo e hábitos alimentares. Relatório de estágio. Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Pimenta V., Barroso I., Álvares F., Correia J., Ferrão da Costa G., Moreira L., Nascimento J., Petrucci-Fonseca F., Roque S. & Santos E. (2005). Situação Populacional do Lobo em Portugal: resultados do Censo Nacional 2002/2003. Relatório Técnico. Instituto de Conservação da Natureza/Grupo Lobo. Lisboa, 158 pp + Anexos.
- Pimenta, V., Barroso, I., Álvares, F., Barros, T., Borges, C., Cadete, D., Carneiro, C., Casimiro, J., Ferrão da Costa, G., Ferreira, E., Fonseca, C., García, E. J., Gil, P., Godinho, R., Hipólito, D., Llaneza, L., Marcos Perez, A., Martí-Domken, B., Monzón, A., Nakamura, M., Palacios, V., Paulino, C., Pereira, J., Pereira, A., PetrucciFonseca, F., Pinto, S., Rio-Maior, H., Roque, S., Sampaio, M., Santos, J., Serronha, A., Simões, F., Torres, R. T. (2023). Situação populacional do Lobo em Portugal: Resultados do Censo Nacional de 2019/2021. ICNF, Lisboa.
- Pimenta, V., Barroso, I., Álvares, F. & Petrucci-Fonseca, F. (2023). *Canis lupus* . In Mathias ML (coord.), Fonseca C, Rodrigues L, Grilo C, Lopes-Fernandes M, Palmeirim JM, Santos-Reis M, Alves PC, Cabral JA, Ferreira M, Mira A, Eira C, Negrões N, Paupério J, Pita R, Rainho A, Rosalino LM, Tapisso JT & Vingada J (eds.): Livro Vermelho dos Mamíferos de Portugal Continental. FCIências.ID, ICNF, Lisboa.
- Pratelli, A. (2008). Canine coronavirus inactivation with physical and chemical agents. *The Veterinary Journal*, 177(1), 71-79.
- Przekop, F., Stupnicka, E., Wolińska-Witort, E., Mateusiak, K., Sadowski, B., & Domański, E. (1985). Changes in circadian rhythm and suppression of the plasma cortisol level after prolonged stress in the sheep. *European Journal of Endocrinology*, 110(4), 540-545.
- Reeder, D. M., & Kramer, K. M. (2005). Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. *Journal of Mammalogy*, 86(2), 225-235.
- Reynaert, R., Marcus, S., De Paepe, M., & Peeters, G. (1976). Influences of stress, age and sex on serum growth hormone and free fatty acid levels in cattle. *Hormone and Metabolic Research*, 8(02), 109-114.
- Ruprecht, J. S., Ausband, D. E., Mitchell, M. S., Garton, E. O., Zager, P., (2012). Homesite attendance based on sex, breeding status, and number of helpers in gray wolf packs. *J. Mammal.* 93, 1001–1005.

- Ribeiro, S. (1996). A problemática dos cães vadios na conservação do lobo.
- Rio-Maior, H., Godinho, R. & Álvares, F. (2011). Projeto de Investigação e Conservação do lobo no Noroeste de Portugal. Relatório Técnico Final. VERANDA/CIBIO. 100 pp.
- Rio-Maior, H., Beja, P., Nakamura, M., & Álvares, F. (2018). Use of space and homesite attendance by Iberian wolves during the breeding season. *Mammalian Biology*, 92, 1-10.
- Rio-Maior H, Nakamura M, Álvares F & Beja P (2019). Designing the landscape of coexistence: Integrating risk avoidance, habitat selection and functional connectivity to inform large carnivore conservation. *Biological Conservation* 235, 178-188.
- Ripple, W. J., & Beschta, R. L. (2012). Trophic cascades in Yellowstone: the first 15 years after wolf reintroduction. *Biological Conservation*, 145(1), 205-213.
- Ripple, W. J., Estes, J. A., Beschta, R. L., Wilmers, C. C., Ritchie, E. G., Hebblewhite, M., ... & Wirsing, A. J. (2014). Status and ecological effects of the world's largest carnivores. *Science*, 343(6167), 1241484.
- Ripple, W. J., Wolf, C., Newsome, T. M., Galetti, M., Alamgir, M., Crist, E., ... & 15,364 Scientist Signatories from 184 Countries. (2017). World scientists' warning to humanity: a second notice. *BioScience*, 67(12), 1026-1028.
- Rivier, C. (1995) Luteinizing-hormone-releasing hormone, gonadotropins, and gonadal steroids in stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771, 187–191.
- Roffler, G. H., Karpovich, S., Charapata, P., & Keogh, M. J. (2022). Validation and measurement of physiological stress and reproductive hormones in wolf hair and claws. *Wildlife Society Bulletin*, 46(4), e1330.
- Roque S. (1999). Estudo eto-ecológico no Noroeste de Portugal. Tese de Licenciatura. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Roque S., Álvares F., Petrucci-Fonseca F. (2001). Utilización espacio-temporal y hábitos alimenticios de un grupo reproductor de lobos en el Noroeste de Portugal. *Galemys*, 13 (NE): 179-198.
- Running, A. (2015). Decreased cortisol and pain in breast cancer: biofield therapy potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Samuelson, D. A. (2007). Textbook of Veterinary Histology. Saunders-Elsevier.

- Sandri, M., Colussi, A., Perrotta, M. G., & Stefanon, B. (2015). Salivary cortisol concentration in healthy dogs is affected by size, sex, and housing context. *Journal of Veterinary Behavior*, 10(4), 302-306.
- Sands, J., & Creel, S. (2004). Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal behaviour*, 67(3), 387-396.
- Santamaria, F., Schlagloth, R., Palme, R., & Henning, J. (2021). Over time decay of cortisol metabolites in faecal pellets of koalas in central queensland. *Animals*, 11(12), 3376.
- Santos, N., Almendra, C., & Tavares, L. (2009). Serologic Survey for Canine Distemper Virus and Canine Parvovirus in Free-ranging Wild Carnivores from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(1), 221–226.
- Santos, N., Carvalho, H., Rio-Maior, H., Nakamura, M., & Álvares, F. (2012, novembro 23–24). Padrões espaço-temporais da sarna sarcóptica em canídeos selvagens e domésticos no Parque Nacional da Peneda-Gerês. In: *III Congreso Ibérico del Lobo* (pp. 21–22). Lugo, Espanha: Grupo Lobo.
- Santos, N., Rosa, G. M., Müller, A., & Guerra, D. (2012). Contributo das metodologias moleculares para a vigilância epidemiológica de doenças infecciosas na fauna selvagem.
- Sapolsky, R. M. (1983). Individual differences in cortisol secretory patterns in the wild baboon: role of negative feedback sensitivity. *Endocrinology*, 113(6), 2263-2267.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*, 21(1), 55-89.
- Sapolsky, R. M. (2002). Endocrinology of the stress-response. In J. B. Becker, S. M. Breedlove, D. Crews, & M. M. McCarthy (Eds.), *Behavioral endocrinology* (p. 409–450). MIT Press.
- Sapolsky, R. M. (2004). *Why zebras don't get ulcers: The acclaimed guide to stress, stress-related diseases, and coping*. Holt paperbacks.
- Schatz, S., & Palme, R. (2001). Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary research communications*, 25(4), 271-287.
- Schwarzenberger, F. (2007). The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*, 41(1), 52-74.

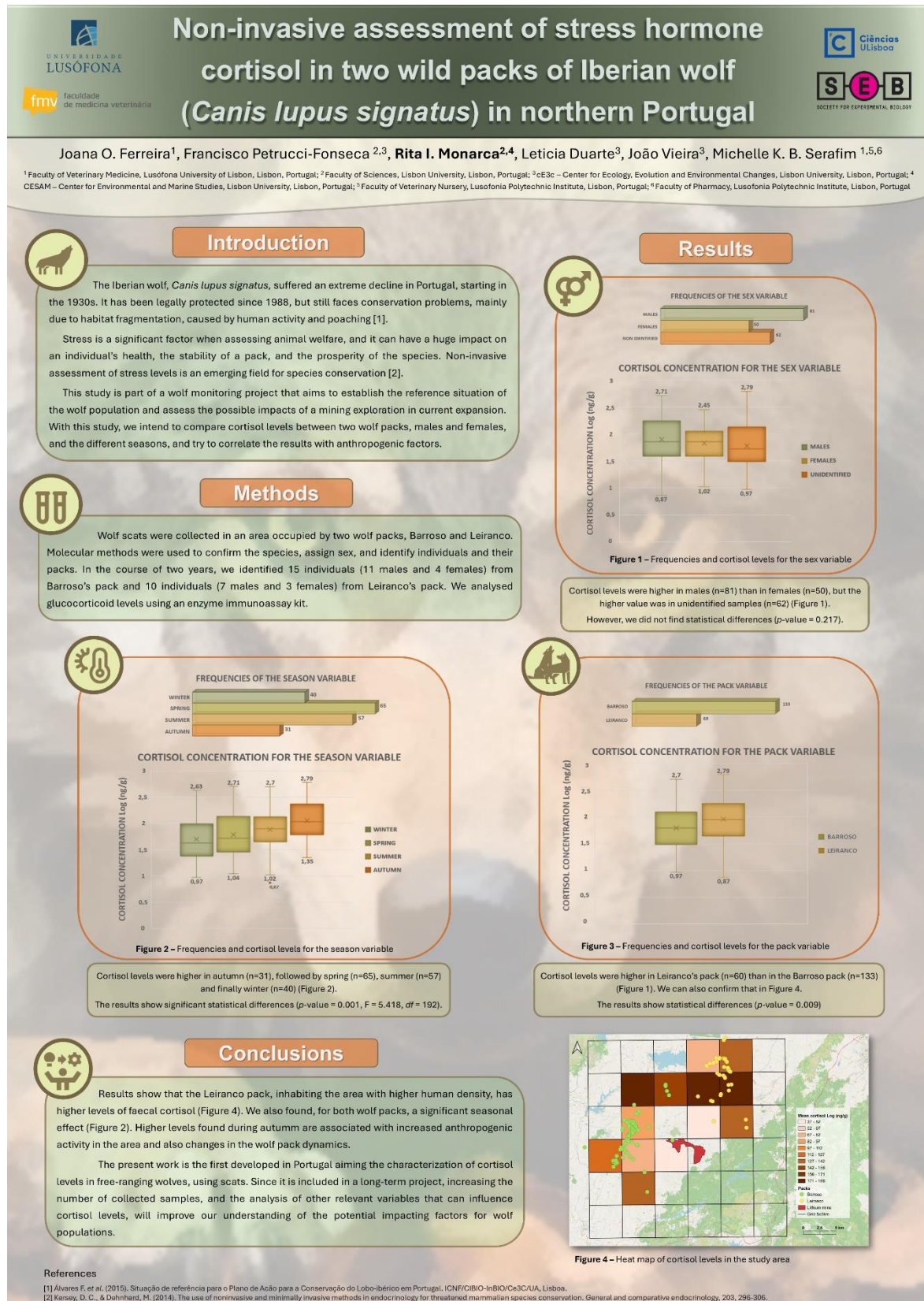
- Seal, U. S., Plotka, E. D., Mech, L. D., & Packard, J. M. (1987). Seasonal metabolic and reproductive cycles in wolves. *Man and wolf* (H. Frank, ed.). Dr. W. Junk Publishers, Boston, Massachusetts, 109-125.
- Seddon, J. M. (2005). Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*, 6(1), 147-149.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138(3479), 32.
- Selye, H. (1939) The effect of adaptation to various damaging agents in the female sex organs in the rat. *Endocrinology* 25, 615–624.
- Selye, H. (1973). The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *American scientist*, 61(6), 692-699.
- Selye H. (1974). Stress without Distress. Philadelphia: J. B. Lippincott Co.
- Sher, A. (2022). An introduction to conservation biology. Oxford University Press.
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166(4), 869-887.
- Sobrino, R., Arnal, M. C., Luco, D. F., & Gortázar, C. (2008). Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from Spain. *Veterinary Microbiology*, 126(1-3), 251-256.
- Soulé, M. E. (1985). What is conservation biology?. *BioScience*, 35(11), 727-734.
- Spencer, R. L., & McEwen, B. S. (1997). Impaired adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic ethanol stress in aged rats. *Neuroendocrinology*, 65(5), 353-359.
- Stewart, P.M. (2003) The adrenal cortex. In: Larsen, P.R., Kronenberg, H.M., Melmed, S. and Polonsky, K.S., Ed., *Williams Textbook of Endocrinology*. 10th Edition, Saunders, Philadelphia, 491-551.
- Terio, K. A., Brown, J. L., Moreland, R., & Munson, L. (2002). Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah. *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 21(3), 215-222.
- Torres, R.T., Silva, N., Brotas, G., & Fonseca, C. (2015). To Eat or Not To Eat? The Diet of the Endangered Iberian Wolf (*Canis lupus signatus*) in a Human-Dominated Landscape in Central Portugal. *PloS one*, 10(6).

- Torres, R.T., & Fonseca, C. (2016). Perspectives on the Iberian wolf in Portugal: population trends and conservation threats. *Biodiversity and conservation*, 25, 411-425.
- Torres, R. T., Ferreira, E., Rocha, R. G., & Fonseca, C. (2017). Hybridization between wolf and domestic dog: First evidence from an endangered population in central Portugal. *Mammalian Biology*, 86(1), 70-74.
- Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., & Palme, R. (2003). Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and comparative endocrinology*, 130(3), 267-278.
- Touma, C., & Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 54-74.
- Treves, A., & Karanth, K. U. (2003). Human-carnivore conflict and perspectives on carnivore management worldwide. *Conservation biology*, 17(6), 1491-1499.
- van Kesteren, F., Sillero-Zubiri, C., Millar, R., Argaw, K., Macdonald, D. W., & Paris, M. (2012). Sex, stress and social status: patterns in fecal testosterone and glucocorticoid metabolites in male Ethiopian wolves. *General and comparative endocrinology*, 179(1), 30-37.
- von der Ohe, C. G., & Servheen, C. (2002). Measuring stress in mammals using fecal glucocorticoids: opportunities and challenges. *Wildlife Society Bulletin*, 1215-1225.
- Walker, B. G., Boersma, P. D., & Wingfield, J. C. (2005). Field endocrinology and conservation biology. *Integrative and Comparative Biology*, 45(1), 12-18.
- Washburn, B. E., & Millspaugh, J. J. (2002). Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. *General and comparative endocrinology*, 127(3), 217-222.
- Wasser, S. K., Hunt, K. E., Brown, J. L., Cooper, K., Crockett, C. M., Bechert, U., ... & Monfort, S. L. (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and comparative endocrinology*, 120(3), 260-275.
- Wasser, S. K., Monfort, S. L., Southers, J., & Wildt, D. E. (1994). Excretion rates and metabolites of oestradiol and progesterone in baboon (*Papio cynocephalus cynocephalus*) faeces. *Journal of reproduction and fertility*, 101(1), 213-220.

- Wasser, S. K., Papageorge, S., Foley, C., & Brown, J. L. (1996). Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal steroid concentrations throughout the estrous cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 102(2), 255-262.
- Wasser, S. K., Thomas, R., Nair, P. P., Guidry, C., Southers, J., Lucas, J. W. D. E., ... & Monfort, S. L. (1993). Effects of dietary fibre on faecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). *Reproduction*, 97(2), 569-574.
- Wasser, S. K., Velloso, A. D. L., & Rodden, M. D. (1995). Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. *The Journal of wildlife management*, 889-894.
- Webber, J. T., Henley, M. D., Pretorius, Y., Somers, M. J., & Ganswindt, A. (2018). Changes in African Elephant (*Loxodonta africana*) faecal steroid concentrations post-defaecation. *Bothalia-African Biodiversity & Conservation*, 48(2), 1-8.
- Wielobnowski, N.C., Fletchall, N., Carlstead, K., Busso, J.M., Brown, J.L., 2002. Non-invasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biol.* 21, 77–98.
- Wikelski, M., & Cooke, S. J. (2006). Conservation physiology. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(1), 38-46.
- Wingfield, J. C., Maney, D. L., Breuner, C. W., Jacobs, J. D., Lynn, S., Ramenofsky, M., & Richardson, R. D. (1998). Ecological bases of hormone—behavior interactions: the “emergency life history stage”. *American Zoologist*, 38(1), 191-206.
- Wingfield, J. C. & Ramenofsky, M. (1999). Hormones and the behavioural ecology of stress. *In*: P. H. M., Balm (Ed), *Stress physiology in animals* (pp. 1-51). Sheffield Academic Press.
- World Organization for Animal Health (OIE). (2019). Terrestrial Animal Health Code. 28(1), 289-382.
- Young, K. M., Walker, S. L., Lanthier, C., Waddell, W. T., Monfort, S. L., & Brown, J. L. (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and comparative endocrinology*, 137(2), 148-165.
- Zarrow, M. X., Philpott, J. E., & Denenberg, V. H. (1970). Passage of 14C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature*, 226(5250), 1058-1059.

Anexos

Anexo I – Póster científico apresentado na conferência internacional SEB.



References

- [1] Álvares F, et al. (2015). Situação de referência para o Plano de Ação para a Conservação do Lobo-ibérico em Portugal. ICNF/CIBIO-INBIO/Ce3C/UA, Lisboa.
- [2] Karsay, D. C., & Dahnhard, M. (2014). The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation. *General and comparative endocrinology*, 203, 296-306.

Anexo II – Protocolo do kit comercial (Enzo Life Sciences ADI-900-071).

1.1. Preparação dos reagentes

1.1.1. Cortisol padrão

- ✓ Deixar a solução a temperatura ambiente
- ✓ Rotular 7 tubos de ensaio de 1 a 7
- ✓ Pipetar 1,000 µl de solução tampão no tubo 1
- ✓ Pipetar 500 µl nos tubos 2 a 7
- ✓ Pipetar 100µl para fora do tubo 1
- ✓ Adicionar 100 µl do standard 100,000 pg/ml ao tubo 1 e vortex
- ✓ Pipetar 500 µl do tubo 1 para o tubo 2 e vortex
- ✓ Pipetar 500 µl do tubo 2 para o tubo 3 e vortex
- ✓ Pipetar 500 µl do tubo 3 para o tubo 4 e vortex
- ✓ Pipetar 500 µl do tubo 4 para o tubo 5 e vortex
- ✓ Pipetar 500 µl do tubo 5 para o tubo 6 e vortex
- ✓ Pipetar 500 µl do tubo 6 para o tubo 7 e vortex

A concentração de cortisol nos tubos de 1 a 7 será de 10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 625, 313, e 156 pg/ml respectivamente. Os padrões diluídos devem ser analisados em menos de 60 minutos após preparação.

1.1.2. Solução de lavagem

- ✓ Diluir 5ml do concentrado em 95ml de água destilada
- ✓ Pode ser mantido a temperatura ambiente até a data de validade do kit ou até 3 meses.

1.2. Ensaio

- ✓ Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente pelo menos 30 minutos antes de abrir. Todos os padrões e amostras devem ser analisados em duplicado.
- ✓ Ver na folha de ensaio para determinar o número de poços que vão ser utilizados e colocar os poços que sobram no saco seco onde vêm e fechar o zip. Deixar a 4°C.
- ✓ Pipetar 100µl de solução tampão nos poços NSB e no B0 (0 pg/ml)
- ✓ Pipetar 100µl dos padrões 1 a 7 nos respectivos poços
- ✓ Pipetar 100µl de amostras nos respectivos poços
- ✓ Pipetar 50µl de solução tampão no poço NSB

- ✓ Pipetar 50µl de conjugado azul em cada poço, exceto nos poços TA e Blank
- ✓ Pipetar 50µl de Ac amarelo em cada poço, exceto no Blank, TA e NSB

Nota: Todos os poços devem estar de cor verde, exceto o NSB que devem estar azuis. O Blank e o TA ainda estão vazios, e, portanto, sem cor.

- ✓ Incubar a placa a temperatura ambiente no agitador de placas por 2h a 500rpm. A placa deve ser tapada.
- ✓ Esvaziar o conteúdo dos poços e adicionar 400µl de solução de lavagem em cada poço. Repetir a lavagem mais 2 vezes, sendo no total 3 lavagens
- ✓ Depois da última lavagem, esvaziar ou aspirar os poços e firmemente ao bater com a placa em uma folha de papel absorvente para remover qualquer vestígio de solução de lavagem
- ✓ Adicionar 5µl de conjugado azul aos poços TA
- ✓ Adicionar 200µl do substrato pNpp a todos os poços
- ✓ Adicionar 50µl de solução de paragem a todos os poços. Este irá parar a reação e a placa deve ser imediatamente lida no espectrofotómetro
- ✓ Calibrar com os poços Blank e ler a 405nm, preferencialmente com correção entre 570 e 590 nm. Se o aparelho não der para calibrar com os poços Blank, subtrair manualmente a densidade ótica destes a todas as leituras.