



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SÉRICA EM CARNÍVOROS
SILVESTRES CAPTURADOS NO SUDESTE DE PORTUGAL

MARIA INÊS CORREIA MARTINS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Dr. Nuno Gonçalo Carço dos Santos

ORIENTADOR

Dr. Nuno Gonçalo Carço dos Santos

CO-ORIENTADOR

Doutora Sandra de Oliveira Tavares
de Sousa Jesus

2013

Lisboa



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SÉRICA EM CARNÍVOROS
SILVESTRES CAPTURADOS NO SUDESTE DE PORTUGAL

MARIA INÊS CORREIA MARTINS

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Dr. Nuno Gonçalo Carço dos Santos

ORIENTADOR

Dr. Nuno Gonçalo Carço dos Santos

CO-ORIENTADOR

Doutora Sandra de Oliveira Tavares

de Sousa Jesus

2013

Lisboa

There is more to life than just yourself, your own family, and your own kind.

Lawrence Anthony

Aos meus pais.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Nuno Santos, por me ter verdadeiramente orientado a seguir este rumo, incentivando-me a descobrir este nicho da Medicina Veterinária. Obrigada pela paciência, disponibilidade, boa-disposição, por todos os ensinamentos e conselhos durante este percurso e por me proporcionar oportunidades únicas nesta área.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Sandra Jesus, pelo apoio e disponibilidade nas fases do trabalho laboratorial e da redação desta dissertação.

À Dr.^a Elisa Maio e à Dr.^a Inês Bravo, por me terem sempre acompanhado durante o estágio e por me terem transmitido tudo o que podiam e sabiam, com uma enorme paciência e compreensão. Adorei os momentos hilariantes e inesquecíveis que passámos juntas e não poderia ter desejado melhor companhia durante aqueles 6 meses.

À Liga para a Proteção da Natureza (LPN) e à Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), pela cortesia na utilização de toda a informação obtida neste projeto, nomeadamente as amostras biológicas.

Ao Parque Biológico de Gaia, nomeadamente à Dr.^a Vanessa Soeiro e à Dr.^a Sara Loio, pela enorme simpatia com que nos receberam e por nos terem cedido amostras sanguíneas de raposas e sacarrabos em cativeiro, o que foi uma ajuda crucial neste estudo.

Ao Dr. Telmo Nunes, pela simpatia e pelos conselhos estatísticos.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho e à Professora Doutora Isabel Fonseca, pela disponibilidade e apoio no trabalho laboratorial.

À Dr.^a Lídia Gomes, pelo apoio laboratorial e por tornar os meus dias no laboratório muito mais divertidos. Aos meus colegas de laboratório (Malcata, Carol e Zé), pela ótima companhia e por fazerem o tempo passar mais rápido.

Aos meus amigos de faculdade (Anita, Nélia, Letícia, Filipa, Diogo, Catarina, Beta, Zé, Joana, Inês, Mariana), por terem transformado estes 7 anos numa experiência inesquecível.

Aos meus amigos de sempre (Ana, Lichi, Carol, Joana, Inês, Raquel, João, Luís, Pipa, Miguel) porque sem eles não seria a mesma coisa.

Ao Filipe, pela paciência infinita e por estar sempre presente.

À minha família, em especial aos meus pais, por sempre apoiarem as minhas decisões e por me darem espaço para “voar”.

Caracterização hematológica e bioquímica sérica em carnívoros silvestres capturados no sudeste de Portugal

Resumo

A avaliação de indicadores fisiológicos é cada vez mais importante na área da medicina e biologia da conservação, na medida em que pode refletir o estado de saúde e a condição fisiológica de indivíduos e populações, bem como traduzir a qualidade do habitat. Para que isto seja possível, é necessário estabelecer valores basais nas espécies de fauna silvestre que se pretende estudar.

O principal objetivo deste estudo foi determinar valores fisiológicos basais de vários parâmetros hematológicos e de bioquímicas sanguíneas em carnívoros silvestres capturados em caixas-armadilha e em Collarum®, no sudeste de Portugal, entre janeiro de 2012 e fevereiro de 2013. Os objetivos secundários residiram na pesquisa de hemoparasitas em esfregaços de sangue periférico e no estudo do efeito de fatores fisiológicos (sexo e idade) e da infeção por hemoparasitas nos resultados dos parâmetros analisados.

Foram avaliados parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, índices eritrocitários, leucócitos e contagens celulares diferenciais) e bioquímicos (ureia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, creatina quinase, glucose, colesterol, triglicéridos, bilirrubina total, sódio, potássio, cloro, cálcio, fósforo, proteínas totais, albumina e globulinas). Os intervalos da amostra para cada parâmetro foram obtidos através do método robusto, utilizando o software Reference Value Advisor. Foram incluídos 79 carnívoros de 6 espécies (*Felis silvestris*, *Genetta genetta*, *Herpestes ichneumon*, *Martes foina*, *Mustela putorius* e *Vulpes vulpes*) no estudo.

Os resultados de parâmetros hematológicos e bioquímicos que diferiram mais de valores documentados na literatura para as mesmas espécies, encontrando-se mais elevados no presente estudo, foram as contagens de neutrófilos, a ureia, a aspartato aminotransferase e a creatina quinase. Estas discrepâncias podem ser atribuídas aos efeitos do stress de captura e ao uso de diferentes metodologias e técnicas na análise das amostras.

Na pesquisa de hemoparasitas, verificou-se a infeção por *Mycoplasma* nas espécies *G. genetta*, *H. ichneumon* e *V. vulpes* e a infeção por *Hepatozoon* na espécie *V. vulpes*.

Relativamente à influência de fatores fisiológicos e da infeção por hemoparasitas, as diferenças estatisticamente significativas encontradas entre grupos de diferentes sexos e idades, bem como a influência da infeção por hemoparasitas, devem-se provavelmente à dimensão reduzida da amostra.

Palavras-chave: conservação, carnívoros silvestres, Portugal, stress de captura, hematologia, bioquímica sérica, hemoparasitas.

Characterization of hematological and serum biochemical parameters from wild carnivores captured in Southeastern Portugal

Abstract

The evaluation of physiological indicators is becoming increasingly important in conservation medicine and biology, as it can reflect the health status and the physiological condition of individuals and populations, as well as the habitat quality. For this to be possible, it is necessary to establish basal values in wild species.

The main goal of this study was to assess the normal values for several hematological and serum biochemical parameters values in free-ranging wild carnivores captured by cage-traps and Collarum® traps in southeastern Portugal, between January 2012 and February 2013. The secondary goals were to search for blood parasites in peripheral blood smears and to study the effect of physiologic factors (sex and age) and the infection by blood parasites in the results of the parameters.

The evaluated issues included hematological (packed cell volume, hemoglobin, erythrocytes, erythrocyte indices, white blood cells, differential blood counts) and biochemical parameters (urea, creatinine, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatine kinase, glucose, cholesterol, triglycerides, total bilirubin, sodium, potassium, chloride, calcium, phosphorus, total protein, albumin, and globulins). Sample intervals for each parameter were obtained by the robust method, using Reference Value Advisor software. Seventy nine wild carnivores from 6 species (*Felis silvestris*, *Genetta genetta*, *Herpestes ichneumon*, *Martes foina*, *Mustela putorius* and *Vulpes vulpes*) were included in the study.

The hematologic and biochemical parameters that differed more from values reported in literature for the same species, showing an elevation in the present study, were the neutrophil counts, the urea, the aspartate aminotransferase and the creatine kinase. These differences may be attributed to the effects of capture stress and to the use of different methodologies and techniques in the sample analysis.

In the search for blood parasites, we found the presence of *Mycoplasma* infection in *G. genetta*, *H. ichneumon* and *V. vulpes*, and the presence of *Hepatozoon* in *V. vulpes*.

Concerning the influence of physiologic factors and the infection by blood parasites, the statistically significant differences found between groups of different sexes and ages, as well as the effect of the infection by blood parasites, are probably due to the small size of the sample.

Key-words: conservation, wild carnivores, Portugal, capture stress, hematology, serum chemistry, blood parasites.

Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de símbolos.....	xiv
1. Introdução: enquadramento do projeto	1
1.1. Atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular	2
2. Revisão bibliográfica	4
2.1. Breve caracterização das espécies de carnívoros silvestres estudadas.....	4
2.1.1. Gato-bravo (<i>Felis silvestris</i>)	4
2.1.2. Geneta-comum (<i>Genetta genetta</i>).....	4
2.1.3. Sacarrabos (<i>Herpestes ichneumon</i>).....	5
2.1.4. Fuinha (<i>Martes foina</i>).....	6
2.1.5. Toirão (<i>Mustela putorius</i>)	6
2.1.6. Raposa comum ou raposa vermelha (<i>Vulpes vulpes</i>).....	6
2.2. Breve referência às relações filogenéticas entre as espécies estudadas	7
2.3. Estatuto de conservação dos carnívoros silvestres portugueses e principais ameaças que enfrentam	8
2.4. Fisiopatologia do stress	10
2.4.1. Impacto a curto e médio prazo do stress de captura.....	11
2.5. Contenção química: quetamina e medetomidina	13
2.6. Hemoparasitas	15
2.6.1. Género <i>Hepatozoon</i>	15
2.6.2. Género <i>Mycoplasma</i>	16
2.7. Eritrócitos falciformes em genetas (<i>G. genetta</i>).....	16
2.8. Parâmetros bioquímicos: breve descrição da fisiologia e principais alterações.....	17
2.8.1. Metabolitos: ureia e creatinina	17
2.8.2. Enzimas hepáticas e/ou musculares (CK, AST e ALT)	18
2.8.3. Glúcidos plasmáticos (glucose).....	20
2.8.4. Lípidos plasmáticos: triglicéridos e colesterol.....	20
2.8.5. Bilirrubina	21
2.8.6. Eletrólitos	21
2.8.7. Cálcio e fósforo	22
2.8.8. Proteínas plasmáticas	22
3. Componente experimental.....	25
3.1. Introdução	25
3.2. Principais objetivos do estudo	26
3.3. Materiais e métodos	26
3.3.1. Métodos de captura	26
3.3.2. Caracterização da amostra.....	27
3.3.3. Contenção química e monitorização dos parâmetros biológicos durante a anestesia.....	31
3.3.4. Colheita e armazenamento das amostras sanguíneas	34

3.3.5. Análises laboratoriais hematológicas	35
a) Determinação do microhematócrito	35
b) Determinação da concentração de hemoglobina.....	35
c) Contagem celular	36
d) Preparação, fixação, coloração e observação do esfregaço sanguíneo.....	37
e) Contagem diferencial de leucócitos e pesquisa de hemoparasitas	37
f) Contagem de eritrócitos falciformes na espécie <i>G. genetta</i>	38
3.3.6. Análise laboratorial bioquímica.....	39
3.3.7. Análise estatística.....	40
3.4. Resultados	41
3.4.1. Gato-bravo (<i>F. silvestris</i>)	41
a) Parâmetros hematológicos.....	42
b) Parâmetros bioquímicos	43
3.4.2. Geneta (<i>G. genetta</i>)	44
a) Parâmetros hematológicos.....	44
b) Parâmetros bioquímicos	45
3.4.3. Sacarrabos (<i>H. ichneumon</i>)	46
a) Parâmetros hematológicos.....	47
b) Parâmetros bioquímicos	48
c) Influência do sexo nos parâmetros hematológicos e bioquímicos	49
3.4.4. Fuinha (<i>M. foina</i>).....	50
a) Parâmetros hematológicos.....	50
b) Parâmetros bioquímicos	51
3.4.5. Toirão (<i>M. putorius</i>)	52
a) Parâmetros hematológicos.....	52
b) Parâmetros bioquímicos	52
3.4.6. Raposa (<i>V. vulpes</i>).....	53
a) Parâmetros hematológicos.....	54
b) Parâmetros bioquímicos	55
c) Influência do sexo e da idade nos parâmetros hematológicos e bioquímicos	56
3.4.7. Lesões de captura	57
3.4.8. Hemoparasitas	58
a) Gato-bravo (<i>F. silvestris</i>), fuinha (<i>M. foina</i>) e toirão (<i>M. putorius</i>).....	58
b) Geneta (<i>G. genetta</i>).....	58
c) Sacarrabos (<i>H. ichneumon</i>).....	58
d) Raposa (<i>V. vulpes</i>)	59
3.4.9. Eritrócitos falciformes na espécie <i>G. genetta</i>	60
3.5. Discussão.....	61
3.5.1. Parâmetros hematológicos.....	61
a) Contagem total de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina	61
b) Índices eritrocitários (VCM, HCM e CHCM).....	62
c) Contagem total de leucócitos e leucograma	63
d) Rácio neutrófilos:linfócitos	64
3.5.2. Parâmetros bioquímicos.....	65
a) Ureia e creatinina	65
b) Enzimas hepáticas e/ou musculares.....	66
c) Glucose.....	68
d) Lípidos plasmáticos: colesterol e triglicéridos.....	69
e) Bilirrubina total.....	69
f) Eletrólitos (sódio, potássio, cloro), cálcio e fósforo.....	69
g) Proteínas totais, albumina e globulinas.....	70

3.5.3. Hemoparasitas.....	70
3.5.4. Eritrócitos falciformes na espécie <i>G. genetta</i>	72
3.5.5. Limitações dos intervalos da amostra definidos nas espécies <i>G. genetta</i> , <i>H. ichneumon</i> e <i>V. vulpes</i>	72
3.6. Conclusões e perspectivas futuras	74
4. Bibliografia.....	76

Índice de figuras

Figura 1: Mapa do sudeste de Portugal, com destaque para as zonas de captura (Zonas de Proteção Especial do Vale do Guadiana, da Serra do Caldeirão e de Moura-Mourão-Barrancos) (Liga para a Proteção da Natureza, 2012).....	3
Figura 2: Árvore representativa da evolução dos carnívoros (<i>Carnivora</i>). As famílias que englobam as espécies estudadas foram destacadas com um quadrado vermelho e os números representam os seus nodos de divergência (adaptado de Eizirik & Murphy, 2009). 8	8
Figura 3: Caixa Tomahawk® ativada no campo, com o pormenor de um dejetto (seta branca) nas proximidades, sinal de passagem de um pequeno carnívoro e de marcação do território (canto inferior esquerdo).....	27
Figura 4: Distribuição, em percentagem, das espécies capturadas durante a totalidade do estudo (entre janeiro de 2012 e fevereiro de 2013).....	28
Figura 5: Distribuição mensal do número de capturas durante a totalidade do estudo (frequências absolutas), de janeiro de 2012 a fevereiro de 2013. Não se efetuaram quaisquer capturas entre março e junho (inclusivé) de 2012, por coincidir com a época reprodutiva dos animais.....	28
Figura 6: Representação gráfica da distribuição relativa das espécies nas quais se realizaram análises bioquímicas.....	30
Figura 7: Colheita de sangue num gato-bravo (<i>Felis silvestris</i>) na veia cefálica (membro anterior esquerdo) e monitorização dos parâmetros biológicos (fotografia original)	34
Figura 8: Geneta (<i>Genetta genetta</i>) em recuperação anestésica na jaula de contenção (fotografia original).....	34
Figura 9: Pormenor da Câmara de Neubauer Improved. As contagens de leucócitos efetuaram-se nos 4 quadrados L e as contagens de eritrócitos nos 5 quadrados preenchidos a preto (adaptado de Electron Microscopy Sciences, 2013).....	36
Figura 10: Representação simplista do método errante utilizado na zona de camada unicelular do esfregaço sanguíneo, para contagem diferencial de leucócitos (original).....	38
Figura 11: Representação simplista da localização aproximada dos 5 campos da zona de camada unicelular do esfregaço sanguíneo fotografados para posterior contagem de eritrócitos falciformes, na espécie <i>G. genetta</i> (original).....	38
Figura 12: Concentração sérica do sódio (Na) em função do sexo (0=machos; 1=fêmeas), na espécie <i>H. ichneumon</i>	49
Figura 13: Concentração sérica do fósforo (P) em função do sexo (0=machos; 1=fêmeas), na espécie <i>H. ichneumon</i>	49
Figura 14: Concentração sérica do potássio (K) em função do sexo (0=machos; 1=fêmeas), na espécie <i>V. vulpes</i>	56
Figura 15: Concentração sérica da globulina α_2 em função do sexo (0=machos; 1=fêmeas), na espécie <i>V. vulpes</i>	56
Figura 16: Concentração sérica de creatinina em função da idade (0=juvenis; 1=adultos), na espécie <i>V. vulpes</i>	56
Figura 17: Hematócrito em função da idade (0=juvenis; 1=adultos), na espécie <i>V. vulpes</i> . .	56
Figura 18: Hematócrito em função da infeção por <i>Mycoplasma</i> (0=sem evidência de infeção; 1=infeção por <i>Mycoplasma</i> spp.) na espécie <i>H. ichneumon</i>	58
Figura 19: Representação gráfica das prevalências de infeções com hemoparasitas encontradas na espécie <i>V. vulpes</i> , em percentagem.....	59

Figura 20: *Mycoplasma* (seta preta) em sangue periférico de sacarrabos (*H. ichneumon*), observado ao microscópio ótico com a objetiva de imersão (ampliação de 1000x) (fotografia original)..... 59

Figura 21: *Hepatozoon* (2 exemplares, setas pretas) em sangue periférico de raposa (*V. vulpes*), observado ao microscópio ótico com a objetiva de imersão (ampliação de 1000x) (fotografia original)..... 59

Figura 22: Concentração sérica de glicose (GLU) em função da infecção por *Mycoplasma* (0=sem evidência de infecção; 1=com infecção por *Mycoplasma*), na espécie *V. vulpes*..... 60

Figura 23: Eritrócitos falciformes (setas pretas) num esfregaço de sangue periférico da espécie *G. genetta*, observado na objetiva de imersão (ampliação de 1000x) (fotografia original)..... 60

Índice de tabelas

Tabela 1: Variação na concentração plasmática de alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos em consequência de atividade física intensa, lesão muscular, desidratação e stress de captura (adaptado de Marks, 2010).	13
Tabela 2: Exemplos de proteínas pertencentes às classes das α , β e γ globulinas (classificação de acordo com a sua mobilidade eletroforética) (adaptado de McGrotty & Tennant, 2005).	24
Tabela 3: Distribuição do sexo e idade das espécies capturadas.	29
Tabela 4: Números absolutos (n) e frequências relativas (%) da realização do hematócrito (HT), contagem de eritrócitos (CE), contagem de leucócitos (CL), contagem diferencial de leucócitos (CDL) e análises bioquímicas (BQ), em cada espécie de carnívoro silvestre.	30
Tabela 5: Médias e intervalos das doses de quetamina, medetomidina e atipamezol (mg/kg) administradas a cada espécie, tendo em conta apenas os casos nos quais foi feita uma única administração (sem necessidade de reforço). Os intervalos das doses foram deixados em branco nos casos em que se administrou sempre a mesma dose em todos os animais dessa espécie.	32
Tabela 6: Número de animais de cada espécie e respetivas frequências relativas, nos quais se fez uma administração única ou houve necessidade de reforço anestésico para indução anestésica.	32
Tabela 7: Modo de ação, vantagens e desvantagens do anticoagulante EDTA (adaptado de Voigt, 2000).	35
Tabela 8: Parâmetros bioquímicos avaliados no Laboratório Veterinário Inno (Braga, Portugal) e respetivos métodos químicos.	39
Tabela 9: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie <i>F. silvestris</i> .	42
Tabela 10: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros bioquímicos relativos à espécie <i>F. silvestris</i> .	43
Tabela 11: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie <i>G. genetta</i> .	44
Tabela 12: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros bioquímicos relativos à espécie <i>G. genetta</i> .	45
Tabela 13: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie <i>H. ichneumon</i> .	47
Tabela 14: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros bioquímicos relativos à espécie <i>H. ichneumon</i> .	48
Tabela 15: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie <i>M. foina</i> .	50
Tabela 16: Resultados dos parâmetros bioquímicos na única fuinha (<i>M. foina</i>) capturada.	51
Tabela 17: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie <i>M. putorius</i> .	52
Tabela 18: Perfil leucocitário do único toirão (<i>M. putorius</i>) capturado.	52
Tabela 19: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie <i>V. vulpes</i> .	54
Tabela 20: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros bioquímicos relativos à espécie <i>V. vulpes</i> .	55

Tabela 21: Número absoluto, frequências relativas, descrição e classificação das lesões de captura encontradas nas espécies capturadas.57

Lista de abreviaturas

ADH: hormona anti-diurética

ADP: Adenosina difosfato

Alb:glob: Rácio albumina:globulina

ALT: Alanina aminotransferase

ARN: Ácido ribonucleico

AST: Aspartato aminotransferase

ATP: Adenosina trifosfato

BT: Bilirrubina total

CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CK: Creatina quinase

CO₂: Dióxido de carbono

DGAV: Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DP: Desvio padrão

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FMV-UL: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Glob.: Globulina

HCM: Hemoglobina corpuscular média

ICNF: Instituto da Conservação da Natureza e Florestas

IFCC: International Federation for Clinical Chemistry

ISO: Organização internacional para a standardização

LNIV: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

LPN: Liga para a Proteção da Natureza

Máx.: Máximo

Med.: Mediana

Min.: Mínimo

n: Dimensão da amostra

Neut.: Neutrófilos

N:L: Rácio neutrófilos:linfócitos

NMDA: N-metil-D-aspartato

PCR: "Polymerase Chain Reaction" (reação em cadeia da polimerase)

PT: Proteínas totais

Ref. Val. Adv.: Reference Value Advisor

Rpm: Rotações por minuto

Seg.: Segmentados

T: Total

TRIG: Triglicéridos

UICN: União Internacional para a Conservação da Natureza

VCM: volume corpuscular médio

Lista de símbolos

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
cm	Centímetro
γ	Gama
dL	Decilitro
fL	Fentolitro
g	Gramma
kg	Kilograma
L	Litro
mEq	Miliequivalente
mL	Mililitro
pg	Picograma
UI	Unidades Internacionais

1. Introdução: enquadramento do projeto

A importância da preservação da biodiversidade é um conceito relativamente recente na sociedade portuguesa. A partir dos anos 1960, época em que o governo ainda financiava o extermínio dos animais considerados os “grandes nocivos” (lobos, águias, etc.), desenvolveram-se leis para proteger espécies em risco de extinção e promover o seu habitat, bem como esforços de educação e sensibilização ambiental. Atualmente, existem inúmeros projetos, muitos deles co-financiados pela Comissão Europeia, que reúnem esforços multidisciplinares com o objetivo de estudar, proteger e promover espécies de fauna e flora silvestre autóctones.

O projeto LIFE-Natureza “Promoção do Habitat do Lince-ibérico e do Abutre-Preto no Sudeste de Portugal” (LIFE08 NAT/P/000227), também conhecido por LIFE Habitat Lince Abutre, promovido pela Liga para a Proteção da Natureza (LPN) em conjunto com outras entidades parceiras e financiado pela Comissão Europeia, apresenta como principal objetivo a promoção e manutenção de habitats mediterrânicos no Sudeste de Portugal com condições propícias para a existência destas duas espécies, actualmente em perigo de extinção em Portugal. As várias ações levadas a cabo pretendem também beneficiar as espécies coabitantes (Projeto LIFE Habitat Lince Abutre, 2013).

No âmbito deste projeto, foi efetuado um rastreio sanitário das populações de carnívoros silvestres nos potenciais locais de futura reintrodução do Lince-ibérico (Moura-Barrancos, Vale do Guadiana e Serra do Caldeirão), sendo a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) o parceiro do projeto responsável por esta ação. Isto justifica-se pelo facto de estes carnívoros partilharem o mesmo habitat com o Lince-ibérico, podendo ser eventuais fontes de transmissão de agentes infecciosos e também por serem bioindicadores dos agentes patológicos que circulam no ambiente, aos quais o lince poderá estar exposto, após a reintrodução. Para levar a cabo este estudo, foram capturados carnívoros silvestres nas três zonas-alvo referidas. A maior parte das amostras recolhida foi encaminhada para as entidades oficiais (DGAV e Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – LNIV), para a realização das devidas análises para pesquisa de agentes infecciosos. Esses dados e os respetivos resultados não serão apresentados nesta dissertação de mestrado. A quantidade restante das amostras de sangue foi utilizada para a realização de análises hematológicas, bioquímicas e parasitológicas, cujos resultados constituem o cerne desta dissertação de mestrado.

Uma vez que o conhecimento acerca destas espécies é ainda muito escasso, todas as informações obtidas com a análise de amostras biológicas são extremamente úteis para a compreensão da sua fisiologia, patologia, biologia e ecologia. Em última análise, isto

contribui para suportar decisões no maneiio e conservação da fauna autóctone portuguesa, não só relativamente a espécies em risco de extinção, mas também a todas as outras que contribuem para o equilíbrio do ecossistema e para a preservação da biodiversidade.

1.1. Atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular

Esta dissertação de mestrado é parte integrante dum Estágio Curricular que decorreu entre setembro de 2012 e junho de 2013.

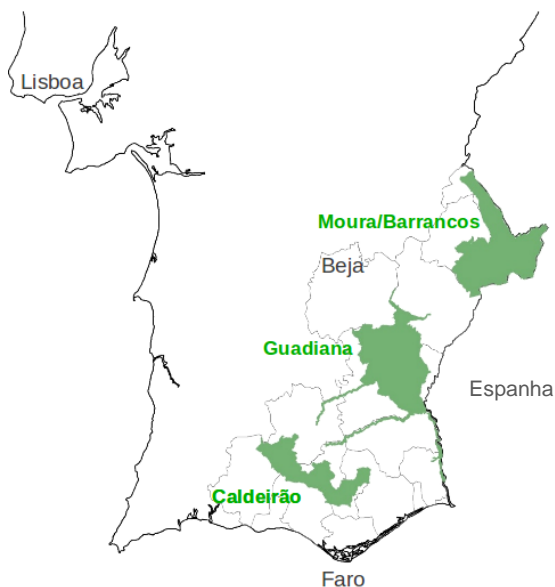
A primeira parte do estágio consistiu em integrar um projeto cujo principal objetivo foi o rastreio sanitário de carnívoros silvestres nas regiões de futura reintrodução do Lince-ibérico, como já foi referido. O projeto abrangeu uma grande área na zona sudeste de Portugal e decorreu entre janeiro de 2012 e fevereiro de 2013, com uma interrupção de 4 meses, entre março e junho de 2012 (coincidente com a época reprodutiva dos animais). A partir de setembro de 2012, a autora desta dissertação juntou-se à equipa de trabalho, com a qual colaborou durante 6 meses, até ao final do projeto (fevereiro de 2013). As capturas foram realizadas em três grandes regiões geográficas: Zonas de Proteção Especial do Vale do Guadiana, da Serra do Caldeirão e de Moura-Mourão-Barrancos (Figura 1).

O trabalho de campo (entre setembro de 2012 e fevereiro de 2013) consistiu em 4 campanhas de captura, cada uma com a duração aproximada de 20 dias e cerca de 12 horas de trabalho diário, o que fez 960 horas de trabalho. Este período de trabalho constituiu uma oportunidade única de integrar ativamente todas as atividades diárias inerentes ao projeto e conhecer a realidade de um médico veterinário de animais silvestres, sobretudo na área da medicina e biologia da conservação.

As principais atividades realizadas no campo foram a montagem e verificação de armadilhas, a captura dos animais, a anestesia e manipulação (cujo principal objetivo era a recolha de amostras biológicas) e a libertação após recuperação anestésica. No total, foram capturados 79 animais, dos quais 33 sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), 17 genetas (*Genetta genetta*), 16 raposas (*Vulpes vulpes*), 6 fuinhas (*Martes foina*), 4 gatos-bravos (*Felis silvestris*) e 3 toirões (*Mustela putorius*).

No final de cada dia de trabalho, as amostras de sangue eram processadas num pequeno laboratório portátil. A partir do sangue em ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) fez-se a determinação do microhematócrito, as contagens celulares na câmara de Neubauer e a realização de esfregaços sanguíneos para posterior observação. O sangue sem adição de anticoagulante foi deixado a repousar, durante 24 horas, em refrigeração, para que ocorresse a extração do soro. Passado esse período de tempo, realizou-se a centrifugação e a maioria do soro separado foi enviado para as entidades responsáveis (DGAV e LNIV); a quantidade restante foi enviada para análise de parâmetros bioquímicos num laboratório comercial (Laboratório Inno, Braga).

Figura 1: Mapa do sudeste de Portugal, com destaque para as zonas de captura (Zonas de Proteção Especial do Vale do Guadiana, da Serra do Caldeirão e de Moura-Mourão-Barrancos) (Liga para a Proteção da Natureza, 2012).



Terminada esta fase, procedeu-se à realização das restantes análises hematológicas na Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa (FMV-UL). Os esfregaços sanguíneos foram observados para contagem diferencial de leucócitos, pesquisa de hemoparasitas e contagem de eritrócitos falciformes (esta última apenas na espécie *G. genetta*), no laboratório de Doenças Parasitárias. Foi também efetuada a determinação da concentração de hemoglobina durante esse período. Foram despendidas cerca de 200 horas de trabalho neste processo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Breve caracterização das espécies de carnívoros silvestres estudadas

2.1.1. Gato-bravo (*Felis silvestris*)

O gato-bravo é um felino que, de relance, pode ser facilmente confundido com o gato-doméstico. No entanto, a sua cabeça é maior e a sua pelagem é cinza ou cinzenta-acastanhada e com um padrão característico: apresenta uma linha longitudinal dorsal e três a cinco anéis escuros na cauda. Pesa entre 3 a 4 kg e mede cerca de 80 a 90 cm de comprimento (Castro, 2012).

Na Península Ibérica (assim como na maioria da Europa), a sua distribuição é generalizada mas fragmentada (Oliveira, Godinho, Randi, Ferrand & Alves, 2008b). Encontra-se ausente dos arquipélagos da Madeira e Açores (Castro, 2012).

Este animal, de hábitos solitários e atividade maioritariamente noturna, ocupa habitats florestais e parece preferir zonas com baixa densidade humana (Cabral *et al.*, 2006). Apesar da sua preferência por pequenos mamíferos (roedores e coelho-bravo), o gato-bravo não é um predador especialista, demonstrando uma enorme plasticidade relativamente à disponibilidade espacial e sazonal de presas (Carvalho & Gomes, 2004; Biró, Lanszki, Szemethy, Heltai & Randi, 2005; Castro, 2012).

2.1.2. Geneta-comum (*Genetta genetta*)

A geneta é um pequeno predador com cerca de 1,7 a 2 kg (Carvalho & Gomes, 2004), pertencente à família dos viverrídeos. Mede cerca de 90 cm de comprimento incluindo a cauda, que pode representar quase metade do comprimento total (Alves, 2012).

Esta espécie foi introduzida na Península Ibérica no século XV e atualmente é um dos carnívoros mais abundantes em Portugal (Santos, Pinto & Santos-Reis, 2007), com uma distribuição generalizada por todo o território, com exceção dos arquipélagos da Madeira e Açores (Alves, 2012).

Habita uma grande variedade de habitats, mas prefere zonas arborizadas e com arbustos (Alves, 2012). Grande parte da atividade deste animal é noturna. É um ágil caçador trepador que se alimenta preferencialmente de micromamíferos (roedores), mas também duma variedade de outros animais vertebrados, insetos e frutos (Carvalho & Gomes, 2004). A dieta da geneta varia com a disponibilidade de recursos, o que reflete o carácter oportunista deste animal. Este tipo de estratégia alimentar faz da geneta uma especialista facultativa: é uma excelente caçadora de micromamíferos, a sua presa predileta, mas explora os

restantes recursos de acordo com a zona e a época do ano (Virgós, Llorente & Cortés, 1999).

A sua principal característica morfológica é a sua pelagem acinzentada com manchas negras longitudinais e a sua cauda muito longa com oito a dez anéis negros circulares (Alves, 2012), o que torna este carnívoro único e inconfundível entre os carnívoros ibéricos.

2.1.3. Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*)

Este carnívoro, pertence à família dos herpestídeos, é originário do continente africano. Santos et al. (2007) defendem que terá sido introduzido na Península Ibérica no século XIX, mas estudos recentes refutam essa hipótese e demonstram que as populações de sacarrabos ibéricas terão evoluído separadamente das populações do norte de África desde a última idade do gelo, resultado da dispersão natural da espécie através do estreito de Gibraltar (Gaubert *et al.*, 2011; Balmori & Carbonell, 2012).

A forma como estes animais se deslocam (em fila indiana, com a cauda do animal anterior a tocar ou mesmo a sobrepor-se ao focinho do animal que segue imediatamente atrás) concedeu-lhe este nome peculiar. É um marchador típico e um fraco trepador (Rosalino & Chambel, 2012).

Tal como a geneta, o sacarrabos é um pequeno predador com cerca de 2 a 3 kg (Barros, 2009) e 90 cm de comprimento, incluindo a cauda (Rosalino & Chambel, 2012). Morfologicamente é inconfundível, devido à sua silhueta esguia, ao pelo cerdoso de cor acinzentada e às pupilas horizontais.

Até à década de 1990, esta espécie estava ausente na região norte do nosso país, mas atualmente verifica-se a sua expansão progressiva no território português (Barros, 2009). Borralho, Rego, Palomares e Hora (1996) acreditam que a distribuição do sacarrabos sofreu uma série de expansões e regressões no território nacional e que os dados atuais demonstram, na realidade, a recolonização de áreas historicamente ocupadas por esta espécie. Não existem nos arquipélagos da Madeira e Açores (Rosalino & Chambel, 2012).

O sacarrabos é o único carnívoro português maioritariamente diurno. O fato das restantes espécies de carnívoros serem noturnas diminui a competição na atividade predatória diurna do sacarrabos, o que lhe permite ampliar o seu espectro alimentar (Barros, 2009; Rosalino & Chambel, 2012). Para além disto, esta espécie apresenta um carácter generalista e oportunista em termos alimentares e parece consumir os alimentos localmente mais abundantes ou de mais fácil acesso (Rosalino & Chambel, 2012).

2.1.4. Fuinha (*Martes foina*)

A fuinha é um pequeno mustelídeo nativo da Europa e atualmente distribuído por praticamente todo o continente. Em Portugal, a sua distribuição é generalizada com exceção dos arquipélagos da Madeira e Açores (Santos & Matos, 2012).

A sua principal característica morfológica é uma mancha branca no peito que contrasta com a restante pelagem de cor castanho-mel. Pesa entre 1 a 2 kg e mede cerca de 65 a 80 cm de comprimento, incluindo a cauda (Santos & Matos, 2012).

Este carnívoro é muito versátil no que concerne ao habitat. Em Portugal e no sul da Europa no geral, prefere habitats florestais e rurais (Santos & Matos, 2012). Tal como a maioria das espécies de carnívoros, a fuinha apresenta hábitos noturnos e solitários e baseia a sua dieta em diversos alimentos de acordo com a sua disponibilidade. Os frutos são um componente importante da sua dieta (López-Martín, 2006; Santos *et al.*, 2007).

2.1.5. Toirão (*Mustela putorius*)

O toirão é um pequeno mustelídeo originário do continente europeu, que pode pesar entre 500 gr a 2 kg e medir entre 60 a 70 cm de comprimento (incluindo a cauda). Atualmente, encontra-se em muitas partes do mundo, quer por dispersão natural, quer por introdução por parte do Homem como medida de controlo biológico. Em Portugal, tem uma distribuição generalizada mas descontínua, encontrando-se ausente do arquipélago da Madeira e Açores (Santos, 2012).

Este pequeno carnívoro caracteriza-se por uma pelagem de cor castanho escura e uma faixa mais clara de pelo em torno dos olhos, nariz e boca, fazendo lembrar uma "mascarilha", que o distingue dos restantes espécies de carnívoros. Esta espécie foi domesticada, dando origem ao furão doméstico (Santos, 2012).

A variedade de habitats que ocupa e a diversidade de presas (sobretudo pequenos mamíferos e anfíbios) que caracterizam o seu regime alimentar (Lodé, 1997) levam a pressupor uma elevada capacidade de adaptação (Cabral *et al.*, 2006). Tal como a maioria dos carnívoros, apresenta hábitos noturnos e solitários (Santos, 2012).

2.1.6. Raposa comum ou raposa vermelha (*Vulpes vulpes*)

A raposa comum ou vermelha é um canídeo extremamente adaptável a qualquer tipo de habitat, principal razão pela qual apresenta uma ampla distribuição mundial. A nível ibérico, distribui-se regular e uniformemente por todo o território, com exceção dos arquipélagos da Madeira e Açores. É um dos maiores carnívoros a nível nacional, pesando em média entre 5 a 7 kg e com um comprimento total um pouco maior que 1 metro. O seu nome advém da sua pelagem de coloração castanho-avermelhado no dorso (Loureiro, 2012).

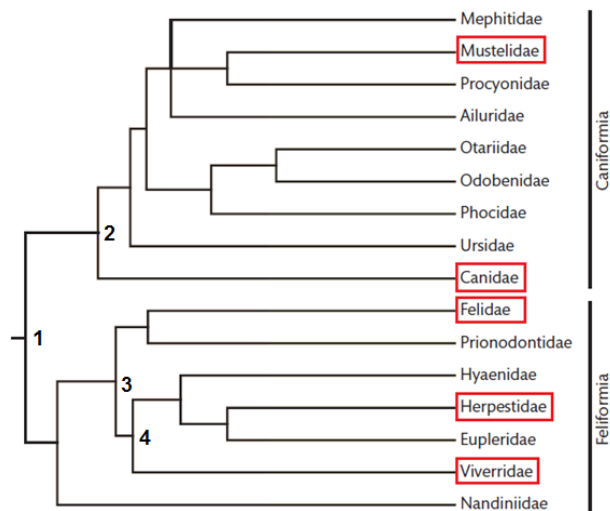
Na realidade, estes animais não são verdadeiros carnívoros, mas sim omnívoros. Alimentam-se de um grande leque de alimentos disponíveis, desde roedores e lagomorfos (as suas presas prediletas) (Pires, 2001; Loureiro, 2012) a cadáveres e restos de lixo, o que representa o seu carácter oportunista, ou seja, a raposa pode ser caçadora e/ou necrófaga de acordo com a disponibilidade de recursos (Loureiro, 2012).

É interessante salientar que esta espécie apresenta algumas características morfológicas e comportamentais que a situam entre os canídeos e os felídeos: a sua fisionomia está muito bem adaptada à corrida e à caça solitária e as suas pupilas são elípticas e orientadas verticalmente, o que lhe facilita a visão em qualquer situação (tal como os felídeos), uma vez que apresenta hábitos maioritariamente noturnos (Loureiro, 2012).

2.2. Breve referência às relações filogenéticas entre as espécies estudadas

Uma vez que o conhecimento acerca da maioria das espécies de carnívoros silvestres abrangida neste estudo é ainda bastante escasso, torna-se muitas vezes necessário extrapolar dados de espécies filogeneticamente próximas. Desta forma, é muito útil conhecer as relações filogenéticas entre as espécies estudadas. Como se pode verificar na figura 2, as famílias *Mustelidae* (à qual pertencem a fuinha e o toirão) e *Canidae* (à qual pertence a raposa) estão incluídas na subordem *Caniformia*, enquanto as famílias *Felidae* (gato-bravo), *Herpestidae* (sacarrabos) e *Viverridae* (geneta) pertencem à *Feliformia*. Apesar de atualmente em famílias distintas, o sacarrabos e a geneta eram incluídos na mesma família até há cerca de duas décadas (Barros, 2009). O nodo de divergência das suas famílias (representado com o número 4 na Figura 2) ocorreu há 39,7 milhões de anos, enquanto as divergências das restantes famílias assinaladas com os números 2 e 3 (Figura 2) ocorreram há mais de 40 milhões de anos. A divergência entre as subordens *Caniformia* e *Feliformia* ocorreu há 52,9 milhões de anos (Eizirik & Murphy, 2009).

Figura 2: Árvore representativa da evolução dos carnívoros (*Carnivora*). As famílias que englobam as espécies estudadas foram destacadas com um quadrado vermelho e os números representam os seus nodos de divergência (adaptado de Eizirik & Murphy, 2009).



2.3. Estatuto de conservação dos carnívoros silvestres portugueses e principais ameaças que enfrentam

O estatuto de conservação das várias espécies de vertebrados portugueses baseia-se na distribuição e abundância das mesmas em território nacional e segue os critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) (Loureiro, Pedroso, Santos & Rosalino, 2012). O Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal classifica essas espécies de acordo com a sua probabilidade de extinção, num dado período de tempo, tendo em conta as condições passada, atual e futura. Para tal, tem em consideração processos externos (influência humana), fatores internos (características biológicas) e a sua interação (Cabral *et al.*, 2006).

A maioria dos carnívoros acima referidos, nomeadamente a geneta, a raposa, a fuinha e o sacarrabos, apresentam um estatuto de conservação "Pouco preocupante" no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. O toirão encontra-se listado como uma espécie cuja informação existente não é suficiente para que se lhe atribua um estatuto, ou seja, está na categoria de "Informação Insuficiente" (Loureiro *et al.*, 2012). No entanto, é sabido que a sua distribuição e as densidades populacionais têm vindo a diminuir nas últimas décadas em vários países europeus (incluindo Portugal) (Pertoldi *et al.*, 2006). Por este motivo, considera-se que esta espécie está vulnerável na maioria dos países europeus e até ameaçada nalguns. O gato-bravo foi recentemente catalogado como "Vulnerável", devido à redução de 30% da população nacional nas últimas décadas (Cabral *et al.*, 2006).

Destas espécies de carnívoros, a raposa e o sacarrabos são as únicas com estatuto cinegético em Portugal, ou seja, são passíveis de serem caçadas pelo Homem, de outubro a fevereiro. Para além da caça, estas duas espécies são também objeto de ações de correção de densidades, vulgarmente designadas como controlo de predadores (Barros, 2009; Loureiro *et al.*, 2012). No entanto, a maioria destas atividades não são fiscalizadas e os métodos aplicados são pouco seletivos, o que provoca alguma mortalidade não natural em todas as espécies de carnívoros (Loureiro *et al.*, 2012).

A grande pressão predatória por parte do Homem (onde se inclui a caça legal e ilegal e o controlo de predadores) é, provavelmente, a principal ameaça às populações de carnívoros no nosso país (Loureiro *et al.*, 2012). Também a destruição e fragmentação de habitats provocadas pela construção de grandes infraestruturas (como auto-estradas e barragens) e outras ações de origem antropogénica representam um impacto muito negativo nestas espécies (Grilo, Bissonette & Santos-Reis, 2009; Loureiro *et al.*, 2012).

O toirão e o gato-bravo sofrem ainda como fator de ameaça adicional a hibridação com os seus parentes domésticos, o que resulta numa redução da diversidade genética das espécies silvestres (Pierpaoli *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2008b; Oliveira, Godinho, Randi & Alves, 2008a). Para além disto, os híbridos provocam um efeito nefasto imediato, na medida em que competem com a espécie silvestre por espaço e alimento.

Apesar de não se incluir nas espécies capturadas e diretamente estudadas neste estudo, o lince-ibérico (*Lynx pardinus*) merece referência por ser atualmente o mamífero carnívoro mais ameaçado da Europa e o felino mais ameaçado do mundo (Delibes, Rodríguez & Ferreras, 2000; Pedroso & Loureiro, 2012) e por ser um dos principais objetos do projecto Life-Natureza, no qual se insere este estudo. Apresenta atualmente o estatuto "Criticamente em Perigo" no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Cabral *et al.*, 2006), sendo que não existem atualmente populações estáveis deste felino em Portugal, considerando-se a situação de pré-extinção a nível nacional (Pedroso & Loureiro, 2012). As principais ameaças que enfrenta são as semelhantes às referidas para os restantes carnívoros (redução e fragmentação do habitat e mortalidade não natural), acrescidas da regressão das populações de coelho-bravo, uma vez que o lince-ibérico é um carnívoro especialista na sua alimentação e com pouca capacidade de adaptabilidade (Cabral *et al.*, 2006; Pedroso & Loureiro, 2012). Com vista à resolução deste problema, foi adotado o "Plano de ação europeu para a conservação do lince-ibérico" (Delibes *et al.*, 2000), cujo objetivo é "conservar e recuperar populações de forma a assegurar a viabilidade a longo prazo do lince-ibérico, endémico da Europa, como um elemento essencial do ecossistema florestal mediterrânico na Península Ibérica". As medidas definidas neste plano reúnem-se em quatro grandes vertentes:

- Ações de conservação *ex-situ*, cujo principal objetivo é a conservação de 85% da variabilidade genética actualmente existente na natureza, durante 30 anos, e a criação de exemplares de lince-ibérico, destinados a fundar novas populações de lince em áreas de distribuição histórica ou reforçar populações já existentes (Despacho nº 12697/2008). O Centro Nacional de Reprodução do Lince-ibérico, em Silves, pertence à rede dos centros de reprodução a nível ibérico (Pedroso & Loureiro, 2012), e tem tido um grande sucesso nos últimos anos.
- Ações de conservação *in-situ*, cujo principal objetivo é conservar o habitat e promover as populações de presas (coelho-bravo), mas também efetuar procedimentos preparatórios de reintrodução nos locais de futura reintrodução do lince-ibérico (Despacho nº 12697/2008), nos quais se inclui o presente estudo.
- Investigação e monitorização (Despacho nº 12697/2008);
- Educação, sensibilização e comunicação (Despacho nº 12697/2008).

2.4. Fisiopatologia do stress

O conceito de stress, apesar de ser de difícil definição, é geralmente aceite como “uma constelação de eventos (fatores stressantes), que precipitam uma reação no cérebro (perceção do stress), que subseqüentemente ativa sistemas de fuga fisiológicos no organismo (resposta de stress)” (Dhabhar & McEwen, 1997; Dhabhar, 2002). O stress agudo pode ser físico, emocional ou induzido por doença (Jain, 1993; Gregory, 2004) ou, nalguns casos, pode ser a conjugação dos três.

Como já foi referido, a captura é um dos momentos mais stressantes na vida de um animal silvestre de vida livre. A resposta de stress começa sempre com a perceção do sistema nervoso central de que existe uma potencial ameaça à homeostase, sendo que essa perceção é o ponto verdadeiramente crítico (independentemente do estímulo – o fator stressante – ser ou não uma ameaça real; Moberg, 2000). Isto despoleta no organismo quatro tipos principais de respostas: respostas comportamentais, ativação do sistema nervoso autónomo simpático, ativação do sistema neuroendócrino e ativação do sistema imunitário (Moberg, 2000). A resposta comportamental é sempre a primeira a ser ativada, apesar de muitas vezes ser inútil para o animal. Quando esta falha em neutralizar o(s) fature(s) stressante(s), desencadeia-se a segunda linha de defesa ativa durante a resposta de stress: a ativação do sistema nervoso autónomo simpático, que desencadeia uma série de efeitos comportamentais e fisiológicos no animal, que constituem a reação de alarme (Kreeger, White, Seal & Tester, 1990b; Fowler, 1995; Moberg, 2000). A epinefrina e a norepinefrina produzidas na medula da adrenal originam respostas fisiológicas que incluem a mobilização de glicogénio hepático, a mobilização de ácidos gordos livres do tecido

adiposo, a dilatação das pupilas, o aumento da frequência cardíaca e contractabilidade, a vasoconstrição e a diminuição das secreções e mobilidade do intestino delgado (Gregory, 2004). Quando o animal é incapaz de eliminar ou neutralizar o fator stressante (que no caso da captura se traduz pela incapacidade de escapar da armadilha), há uma ativação das vias neuroendócrinas, ou seja, uma estimulação da atividade hipotalâmica-adenohipofisária-adrenocortical, com a libertação de glucocorticóides na circulação sanguínea (Kreeger *et al.*, 1990b; Fowler, 1995; Moberg, 2000; Gregory, 2004), com efeitos de longa duração no organismo. Os glucocorticóides libertados promovem a proteólise e gluconeogénese no músculo esquelético e no fígado, exercem efeitos anti-inflamatórios (reduzindo a dor) e suprimem a resposta imunitária (Gregory, 2004).

A leucocitose fisiológica que ocorre tipicamente em situações de stress agudo é mediada essencialmente pela ação de catecolaminas (nomeadamente a epinefrina) e de corticosteróides (Jain, 1993). A libertação de epinefrina provoca uma leucocitose rápida e transitória (que normalmente dura menos que 30 minutos), caracterizada por neutrofilia e/ou linfocitose. A neutrofilia é mais pronunciada no gato que no cão, devido às diferenças na distribuição intravascular de neutrófilos nestas duas espécies. O fato de os gatos possuírem um grande *pool* marginal de neutrófilos contribui para a facilidade com que esta espécie desenvolve leucocitose fisiológica (Jain, 1993). Rovira, Munoz e Benito (2008) verificaram que se desenvolve uma leucocitose fisiológica em resposta ao exercício físico em cães devido a uma mobilização de leucócitos do *pool* marginal para a circulação devido à ação de catecolaminas. Ao contrário do que acontece com as catecolaminas, a libertação de corticosteróides pelo córtex da adrenal provoca uma resposta demorada, que se manifesta algumas horas após o estímulo. A resposta típica consiste numa leucocitose caracterizada por neutrofilia, linfopénia e eosinopénia. A neutrofilia ocorre devido à libertação de neutrófilos maduros a partir da reserva da medula óssea, à diminuição na diapedese dos neutrófilos circulantes para os tecidos e a uma maior movimentação das células do *pool* marginal (Bishop *et al.*, 1968; Jain, 1993; Zahorec, 2001). A linfopénia resulta duma redistribuição dos linfócitos do sangue para outros compartimentos corporais, da apoptose de linfócitos circulantes ou do sequestro preferencial destas células em tecidos linfóides (Jain, 1993; Dhabhar, Miller, McEwen & Spencer, 1996; Zahorec, 2001). A causa da eosinopénia mantém-se especulativa (Jain, 1993).

2.4.1. Impacto a curto e médio prazo do stress de captura

São capturados anualmente milhões de mamíferos silvestres (Iossa, Soulsbury & Harris, 2007) por motivos de conservação, manejo de fauna silvestre ou recreação (Muñoz-Igualada, Shivik, Domínguez, Lara & González, 2008). Infelizmente, os métodos utilizados e a legislação em vigor não asseguram um nível de bem-estar animal aceitável para a grande

maioria dos animais capturados (Harris, Soulsbury & Iossa, 2006; Iossa *et al.*, 2007). Atualmente, a normativa ISO 10990-5 1999 define os melhores critérios para a avaliação da eficácia e humanidade dos métodos de armadilhagem restritiva. No entanto, o impacto a longo prazo das lesões, da dor e do stress fisiológico não são incorporados nesta avaliação (Harris *et al.*, 2006).

A captura é sempre um momento altamente stressante na vida dum animal silvestre e é praticamente impossível que seja um procedimento inócuo. Procedimentos que provoquem níveis elevados de stress nos animais não só levantam questões de ética e bem-estar animal como também afetam o comportamento e fisiologia do animal, podendo adulterar os resultados da investigação (Powell & Proulx, 2003). Marks (2010) concluiu que um dos principais problemas do ponto de vista do bem-estar animal é a intensidade com que o animal se debate após a captura, devido ao potencial de causar lesões mais ou menos graves, exaustão e desidratação, com as respetivas repercussões nos indicadores fisiológicos, como está evidenciado na Tabela 1. Por este motivo, é complicado estabelecer valores de referência fidedignos em espécies silvestres capturadas neste tipo de estudos (Cattet, Boulanger, Stenhouse, Powell & Reynolds-Hogland, 2008). É então do interesse do investigador reduzir o impacto negativo causado pela captura, não só para benefício direto do animal, mas também para salvaguardar a fiabilidade dos resultados.

A avaliação científica da eficácia do processo de armadilhagem tem vindo a ganhar cada vez mais importância devido à preocupação crescente acerca do bem-estar animal e do impacto da captura nas espécies não-alvo (Harris *et al.*, 2006). Atualmente, esta avaliação assenta essencialmente em dois pilares: a mortalidade (das espécies alvo e não alvo) e as lesões sofridas pelos animais capturados (Iossa *et al.*, 2007), o que avalia o impacto a curto prazo do método de captura. No entanto, o verdadeiro impacto da captura e da manipulação não pode ser determinado sem avaliar os efeitos físicos, comportamentais e fisiológicos no momento da captura e nos dias e semanas que se seguem (Cattet *et al.*, 2008). Muitas lesões desenvolvem-se posteriormente e podem causar a morte do animal por si só (por exemplo lesões que infetam e levam a septicémia ou colapso circulatório devido a miopatia de captura) ou podem impedir o animal de desempenhar as suas funções vitais (por exemplo lesões dentárias graves ou lesões nas unhas que o impeçam de caçar). No futuro, todos os componentes do bem-estar animal (lesões físicas, comportamento, fisiologia, imunologia e biologia molecular) têm que ser integrados nesta avaliação (Iossa *et al.*, 2007). Powell e Proulx (2003) propõem, então, uma abordagem à captura de mamíferos silvestres que integra quatro princípios: ética (valores profissionais e código de conduta), critérios de performance, técnicas (tipo de armadilhas e métodos) e senso comum, cujo principal objetivo é a otimização das condições de bem-estar animal.

Tabela 1: Variação na concentração plasmática de alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos em consequência de atividade física intensa, lesão muscular, desidratação e stress de captura (adaptado de Marks, 2010).

	Atividade física intensa	Lesão muscular	Desidratação	Stress de captura
Aumento	CK Hematócrito	CK	Albumina	Contagem de leucócitos
			Ureia	Contagem de eritrócitos
			Cloro	Hemoglobina
			Sódio	Contagem de neutrófilos
			Proteínas totais	Neutrófilos:leucócitos
			Hematócrito	Glucose
Diminuição	Glucose			CK
				Contagem eosinófilos
				Contagem linfócitos

2.5. Contenção química: quetamina e medetomidina

A contenção química é uma ferramenta preciosa em qualquer tipo de estudo científico ou intervenção veterinária em animais silvestres, para assegurar uma manipulação segura dos animais.

Um dos pontos cruciais quando se utiliza a contenção química num animal silvestre é garantir uma anestesia e analgesia profundas, para segurança do animal e do operador. A eficácia deste processo depende de vários fatores como o método de captura, o tipo de fármaco e a dose utilizados, a espécie e características físicas do animal (como a idade e a condição corporal) e as condições ambientais. Nos mamíferos silvestres, a anestesia é particularmente desafiante porque é praticamente impossível avaliar o estado fisiológico dos animais e, como tal, o veterinário não pode avaliar muitos dos aspetos que noutras circunstâncias teriam que ser avaliados pré-anestésicamente (McLaren *et al.*, 2005). Para além disto, as próprias condições climáticas influenciam a eficácia anestésica em estudos de campo (Baldwin, Winstead, Hayden-Wing, Kreeger & Dzialak, 2008).

Existem vários métodos de contenção química e protocolos anestésicos, que variam sobretudo de acordo com a espécie que se pretende anestésiar, mas também com a experiência e preferência de cada profissional. Caulkett e Arnemo (2007) consideram que a combinação de fármacos ideal possui as seguintes características: rápido início de ação, grande margem de segurança para o animal e para o operador, elevada potência (para permitir um pequeno volume de administração), existência de um antagonista, versatilidade,

estabilidade e capacidade para provocar narcose e analgesia. Atualmente, a informação relativa à fisiologia e à resposta farmacológica de muitas espécies silvestres ainda é muito escassa. Por este motivo, a extrapolação entre espécies semelhantes é muitas vezes necessária, mas pode resultar em complicações inesperadas (Caulkett & Arnemo, 2007).

Desde o desenvolvimento da xilazina na década de 1960, o uso de agonistas dos recetores α_2 -adrenérgicos para a imobilização de animais não domésticos foi generalizado (Jalanka & Roeken, 1990). Atualmente, são a classe de sedativos mais utilizada em Medicina Veterinária (Lemke, 2007). Estes agonistas podem utilizar-se como agente único de sedação ou, mais frequentemente, em associação com ciclohexilaminas ou opióides. Uma das combinações mais utilizadas atualmente, pela sua grande eficácia, acessibilidade e margem de segurança, é a associação de quetamina e medetomidina (Jalanka & Roeken, 1990).

A quetamina é um agente dissociativo com efeitos analgésicos e amnésicos. Possui uma neuro farmacologia complexa: liga-se aos recetores N-metil-D-aspartato (NMDA) e não NMDA do glutamato, aos recetores nicotínicos, muscarínicos, colinérgicos, monoaminérgico e opióides. Pelo que se sabe, a maioria dos seus efeitos devem-se ao antagonismo não competitivo nos recetores NMDA do glutamato (Kästner, 2007). A quetamina estimula o sistema cardiovascular, provocando um aumento da frequência cardíaca, da pressão sanguínea e do débito cardíaco. A nível do sistema nervoso central, aumenta o metabolismo cerebral, o fluxo sanguíneo cerebral e a pressão intracraniana (Kästner, 2007), motivos pelos quais deve ser sempre associada a um tranquilizante ou sedativo.

A medetomidina é um potente sedativo e analgésico que previne os efeitos adversos provocados pela quetamina. É um dos agonistas dos recetores α_2 -adrenérgicos mais seletivos atualmente disponíveis (Murrell, 2007). Deprime a atividade do sistema nervoso central através da hiperpolarização neuronal e da inibição pré-sináptica da libertação de norepinefrina (Klein & Klide, 1989). O fato de ser altamente seletivo faz com que os efeitos neurológicos adversos sejam pouco frequentes (Baldwin *et al.*, 2008). Provoca efeitos cardiovasculares (sendo a bradicardia o mais proeminente) e respiratórios e afeta a termorregulação (Jalanka & Roeken, 1990), o que é particularmente importante na captura de animais silvestres, em que as condições climáticas variáveis e/ou o stress de captura influenciam a capacidade de termorregulação do animal. A medetomidina induz uma sedação profunda e dose-dependente, analgesia e relaxamento muscular (Jalanka & Roeken, 1990; Lemke, 2007; Murrell, 2007). No entanto, a partir de determinado ponto atinge-se o efeito *plateau*, ou seja, incrementos de dose provocam uma maior duração do efeito em detrimento de uma maior intensidade de sedação (Murrell, 2007). As principais vantagens na utilização de medetomidina prendem-se com o fato de ter uma ampla margem de segurança e de ser totalmente reversível com atipamezole, que é um agonista potente e

seletivo dos recetores α_2 -adrenérgicos (Jalanka & Roeken, 1990; Baldwin *et al.*, 2008). Uma vez que o atipamezole é um antagonista competitivo da medetomidina, a sua dose deve ser reduzida quando administrado no final da anestesia, pois nessa fase uma grande parte da medetomidina já foi metabolizada (Jalanka & Roeken, 1990).

2.6. Hemoparasitas

2.6.1. Género *Hepatozoon*

Este protozoário foi já identificado em várias espécies de carnívoros silvestres, nomeadamente genetas, raposas e vários mustelídeos (Mercer *et al.*, 1988), o que reflete a sua capacidade de infetar uma vasta gama de hospedeiros. O ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* é o principal hospedeiro invertebrado deste parasita (Majláthová, Hurníková, Majláth & Peiko, 2007; Gabrielli *et al.*, 2010). O modo de transmissão deste microorganismo é invulgar, na medida em que a infeção do animal vertebrado (hospedeiro intermediário) ocorre por ingestão da carraça (hospedeiro definitivo) infetada com esporozoítos (Urquhart, Armour, Duncan, Dunn & Jennings, 1996; Majláthová *et al.*, 2007; Gabrielli *et al.*, 2010; The Merck Veterinary Manual, 2013a). No organismo do hospedeiro intermediário ocorre esquizogonia nos macrófagos e células endoteliais dos músculos, coração e pulmões, seguida da produção de grandes gametócitos que parasitam os neutrófilos circulantes. O ciclo fecha-se quando o hospedeiro definitivo (ixodídeo) consome sangue contaminado (Urquhart *et al.*, 1996), no qual ocorre a reprodução sexuada do parasita, ou seja, a conclusão da gametogonia iniciada no organismo do hospedeiro intermediário, e a esporogonia (Gabrielli *et al.*, 2010).

Em Portugal, a principal espécie existente é *Hepatozoon canis*, que pode parasitar animais domésticos e animais silvestres. Em 1988, foi descrita, pela primeira vez no território português, a infeção por *Hepatozoon* em raposas (*Vulpes vulpes silacea*). A elevada prevalência encontrada em raposas (48%) contrastou com a baixa prevalência (3%) de *Hepatozoon* em cães da mesma área de estudo. Este protozoário é pouco patogénico para as raposas, já que nenhuma delas apresentava sinais clínicos, mesmo com a presença de infeções concomitantes (Conceição-Silva, Abranches, Silva-Pereira & Janz, 1988). Gabrielli *et al.* (2010) também verificaram que a prevalência deste parasita numa amostra de raposas era superior à prevalência numa amostra de cães de dimensão semelhante e na mesma região geográfica. Os autores consideram que isto se deve provavelmente a diferenças na dieta das duas espécies, uma vez que as raposas ingerem carne crua ou putrefata mais frequentemente que os cães, o que aumenta a probabilidade de ingestão acidental de artrópodes. As populações de raposas constituem provavelmente importantes reservatórios para este protozoário e representam um perigo potencial de infeção para as populações de

cães, em consequência dos seus hábitos peridomésticos, pois a ixodofauna de ambos é semelhante (Conceição-Silva *et al.*, 1988; Gabrielli *et al.*, 2010). A crescente urbanização, com a degradação de áreas silvestres e o contacto intensificado entre animais silvestres e domésticos, a par do aquecimento global, vão aumentar provavelmente o impacto de todas as doenças parasitárias com o envolvimento de vetores (nas quais se inclui a hepatozoonose) e facilitar a transmissão do parasita (Gabrielli *et al.*, 2010).

2.6.2. Género *Mycoplasma*

Os hemoplasmas ou micoplasmas hemotrópicos são bactérias gram-negativas sem parede celular, que aderem à superfície dos eritrócitos do hospedeiro (parasitas bacterianos eritrocitários epicelulares), não sendo possível cultivá-los fora do seu hospedeiro. São capazes de infetar uma grande variedade de animais vertebrados e a transmissão pode ser direta, indireta (através de vetores artrópodes) ou vertical (The Merck Veterinary Manual, 2013b).

Estes microorganismos tendem a parasitar as mucosas respiratórias e genitais, onde estabelecem infeções persistentes e clinicamente inaparentes. Muitas vezes, são oportunistas secundários à inflamação induzida por outras etiologias, uma vez que se verificam interações sinérgicas entre micoplasmas e outros agentes infecciosos. O desenvolvimento da infeção também depende da virulência do organismo e da resistência do hospedeiro. A doença respiratória (pneumonia ou pleuropneumonia) é provavelmente a manifestação clínica mais comum em mamíferos (Whithear, 2001). Também podem ocorrer doenças oculares, genitais e mastites. Quando a infeção se torna sistémica pode haver envolvimento das articulações e outras superfícies serosas ou até mesmo o desenvolvimento de septicémia (Whithear, 2001; Lappin, 2003), com graves consequências para o animal.

2.7. Eritrócitos falciformes em genetas (*G. genetta*)

A ocorrência de eritrócitos com uma forma bizarra foi descrita pela primeira vez por Gulliver, em vários mamíferos, sobretudo das família *Cervidae* e *Camelidae*, em 1840 (Taylor & Easley, 1974; Seiffge, 1983). Esses eritrócitos caracterizavam-se sobretudo por possuírem ângulos afiados e espículas em várias direções (Taylor & Easley, 1974). Undritz, em 1950, demonstrou que esta alteração podia ser provocada *in vitro* através da oxigenação do sangue (Seiffge, 1983) e da elevação do pH, podendo ser revertida através da diminuição do pH (Simpson & Taylor, 1974). Mais tarde, em 1910, Herrick descobriu eritrócitos com uma forma semelhante associados a anemia grave em paciente humanos (Seiffge, 1983). Mais tarde, verificou-se que estes eritrócitos possuem uma hemoglobina aberrante (hemoglobina S), codificada geneticamente, e que a alteração da forma ocorre sobretudo no

sangue venoso, devido à relativa desoxigenação que o sangue sofre (Barabino, Platt & Kaul, 2010).

Este fenómeno foi descrito em genetas, em 1976, por Ball, Hawkey, Hime, Keymer e Brambell:

(...) Ao contrário do que acontece no Homem, nas genetas este fenómeno não parece manifestar quaisquer alterações ou sintomas patológicos (as contagens celulares das genetas encontravam-se dentro dos limites de referência e não havia anemia ou eritropoiese aumentada). Aliás, os autores concluíram que condições exatamente opostas às descritas para o Homem provocavam a alteração na forma dos eritrócitos em genetas, na medida em que a alteração era favorecida pela oxigenação do sangue em genetas e podia ser revertido através da exposição a dióxido de carbono (CO₂) ou a agentes redutores. É interessante salientar que a oxigenação eleva o pH sanguíneo (ao substituir CO₂ por oxigénio) e que o tratamento com CO₂ e agentes redutores diminui o pH do sangue, ou seja, os autores sugerem que a alteração na forma destas células pode estar diretamente relacionada com o pH sanguíneo e independente do grau de oxigenação. Os autores propõem que, possivelmente, as condições que provocam esta alteração nas genetas não ocorrem na circulação sanguínea, uma vez que os eritrócitos observados em sangue venoso imediatamente colhido apresentavam uma forma normal. Pelo contrário, quando o sangue era misturado com EDTA, os eritrócitos manifestavam tendencialmente a forma aberrante. A adição deste anticoagulante ao sangue diminui o seu pH, ou seja, não seria de esperar que ocorresse o afoçamento. Possivelmente, existe um efeito específico do EDTA no sangue de genetas, ainda desconhecido (Ball *et al.*, 1976, tradução livre).

2.8. Parâmetros bioquímicos: breve descrição da fisiologia e principais alterações

2.8.1. Metabolitos: ureia e creatinina

A ureia é o principal resíduo nitrogenado nos mamíferos, sendo excretado quase exclusivamente por via renal. É sintetizada no fígado a partir do dióxido de carbono e da amónia, através do ciclo da ureia. A maioria da amónia incorporada na ureia provém da degradação proteica, portanto a taxa de formação da ureia é altamente dependente do conteúdo proteico da dieta e da taxa de catabolismo de proteína endógena (Squires, 2005). Consequentemente, qualquer fator que aumente a taxa de catabolismo de proteína endógena (independentemente da dieta ou função renal) provoca o aumento da concentração plasmática de ureia (por exemplo febre, fome, exercício prolongado e vigoroso, administração recente de glucocorticoides, queimaduras e sepsis) (Squires, 2005). Situações que diminuem a taxa de conversão da amónia em ureia (como *shunt* porto-sistémico e insuficiência hepática grave), provocam uma diminuição na concentração plasmática de ureia (Squires, 2005; Latimer, 2011).

A creatinina é um produto de degradação da creatina (ou creatina fosfatase) nas fibras musculares do animal, através de um processo de hidrólise não enzimática (Squires, 2005). Apenas uma pequena quantidade é adquirida através da dieta. A quantidade de creatinina formada diariamente no organismo depende da quantidade total de creatina no organismo que, por sua vez, é determinada pela dieta, taxa de síntese e, acima de tudo, pela massa muscular do animal (Squires, 2005). É excretada via intestinal e/ou renal. Passa livremente pela barreira de filtração glomerular e não é reabsorvida pelos túbulos renais (Stockham & Scott, 2008).

Quando mais de 75% dos nefrônios se tornam disfuncionais (em casos de doença renal grave), a função excretória é comprometida, o que leva ao aumento da concentração plasmática de ureia e creatinina. Existem muitos outros fatores capazes de provocar azotemia: baixa perfusão renal (por desidratação grave, por exemplo), aumento na produção de compostos nitrogenados (em consequência de dieta muito proteica, hemorragia do trato gastro-intestinal e uma maior taxa de catabolismo proteico) e rotura ou obstrução do trato urinário distal ao rim, entre outros (Squires, 2005).

2.8.2. Enzimas hepáticas e/ou musculares (CK, AST e ALT)

A creatina quinase (CK) é uma enzima crítica na produção de energia para a contração muscular, uma vez que catalisa a transferência de fosfato da creatina fosfato para a adenosina difosfato (ADP), para formar adenosina trifosfato (ATP) (Stockham & Scott, 2008; Latimer, 2011).

É um enzima citosólica com a maioria da sua atividade no músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro. É uma das enzimas mais órgão-específicas de todo o painel das enzimas clínicas, uma vez que a grande maioria da CK plasmática é de origem muscular (Latimer, 2011). A sua semi-vida plasmática é cerca de 2 a 4 horas. A sua concentração plasmática começa a aumentar 4 a 6 horas após a lesão, atinge o pico da concentração 12 horas após a libertação da enzima na circulação sanguínea e volta à normalidade dentro de 24 a 48 horas (Olby, 2005). A sua atividade plasmática pode ser influenciada por pequenas lesões do tecido muscular sem relação com qualquer doença muscular primária, como doenças do miocárdio (Marks, 2010) e diminui com o avanço da idade, em cães saudáveis (Latimer, 2011). Akimau *et al.* (2005) verificaram que, em ratinhos, o aumento da concentração plasmática de CK estava fortemente relacionada com volume de músculo traumatizado. Situações iatrogénicas que implicam um aumento da CK plasmática incluem: injeções intramusculares, fármacos irritantes (como a quetamina) e venipuntura traumática (Latimer, 2011). Deve ter-se em atenção estes fatores quando se utiliza a CK como indicador específico de doença ou lesão muscular.

A medição da concentração plasmática da alanina aminotransferase (ALT), presente originalmente no citosol dos hepatócitos, é o teste laboratorial de eleição no diagnóstico de lesões hepatocelulares em cães e gatos, devido à sua elevada sensibilidade (Hall & German, 2005). Esta enzima catalisa uma reação reversível que está envolvida na desaminação de alanina para formar piruvato (Stockham & Scott, 2008). A magnitude do aumento da atividade plasmática de enzimas hepatocelulares depende do número de hepatócitos afetados, da gravidade da lesão e da semi-vida da enzima (Latimer, 2011). Apesar de poder ser produzida noutros tecidos (como o coração, os rins e o tecido muscular), considera-se que a ALT é hepato-específica em cães e gatos. Contudo, a determinação concomitante da atividade plasmática da CK (um indicador específico de lesão muscular) pode ajudar na distinção entre uma lesão muscular e uma hepática (Latimer, 2011). Basicamente, qualquer alteração capaz de provocar um aumento na permeabilidade a nível hepatocelular pode aumentar a concentração plasmática desta enzima (Hall & German, 2005). A necrose muscular também pode provocar o aumento da sua concentração plasmática (Latimer, 2011). Situações traumáticas que envolvam a combinação de lesões hepáticas e musculares podem provocar aumentos dramáticos na atividade plasmática de ALT. A perda de sangue e o choque associados ao trauma também podem estar associados ao aumento da atividade de ALT (Latimer, 2011).

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima hepatocelular encontrada em quantidades significativas nos tecidos muscular e cardíaco, o que a torna uma enzima pouco hepato-específica. É responsável por catalisar uma reação reversível envolvida na desaminação do aspartato para formar oxaloacetato (Stockham & Scott, 2008).

Na presença de doença hepática, os aumentos na actividade da AST são, usualmente, paralelos aos aumentos da ALT. No entanto, existem duas isoenzimas da AST: citosólica e mitocondrial, sendo que a libertação da enzima mitocondrial só ocorre em casos de lesão celular grave (como necrose), e não em casos de aumento da permeabilidade da membrana do hepatócito. Por este motivo, considera-se que a AST pode ser um marcador mais específico que a ALT em casos de lesão hepática grave (Hall & German, 2005). Como já foi referido, deve ser feita a medição da atividade da CK para descartar ou confirmar a presença de lesão muscular. Uma vez que os eritrócitos contêm AST, esta enzima também pode estar aumentada em consequência de hemólise (Latimer, 2011).

A semi-vida plasmática da AST é muito maior que a da CK (cerca de 12 horas), ou seja, permanece elevada mais tempo após o incidente e a da ALT é aproximadamente 2 dias e meio (Olby, 2005; Latimer, 2011).

2.8.3. Glúcidos plasmáticos (glucose)

Existem três fontes de glucose plasmática: carboidratos da dieta, glicogenólise e gluconeogénese (Latimer, 2011).

Após um processamento parcial através das enzimas salivares e do ácido gástrico, a maioria da hidrólise dos carboidratos da dieta ocorre no intestino delgado, em animais monogástricos. Os monossacáridos resultantes são transportados via portal até ao fígado, onde são metabolizados para obtenção de energia, armazenados na forma de glicogénio ou convertidos em aminoácidos ou gordura (Latimer, 2011).

A glicogenólise é a principal fonte de glucose durante pequenos períodos de jejum e é promovida por catecolaminas, glucagina e alguns fármacos. A gluconeogénese consiste na síntese de glucose a partir de aminoácidos e lípidos e é promovida por corticosteróides, glucagon, hormona do crescimento e alguns fármacos (Latimer, 2011).

A homeostase da glucose é mantida através do equilíbrio entre a absorção de glucose, o armazenamento hepático e respetiva reabsorção e as principais hormonas que controlam as concentrações plasmáticas de glucose (insulina e glucagon) (Knottenbelt, 2005). Estes mecanismos são tão eficazes que só se verifica hipoglicémia em casos de doenças hepáticas primárias, com grave comprometimento hepático (Knottenbelt, 2005). Pelo contrário, a hiperglicémia é mais frequente e pode ocorrer em consequência de doenças endócrinas (como *Diabetes mellitus*, hiperadrenocorticismismo e hipertiroidismo), pancreatite aguda e da libertação endógena de catecolaminas e/ou corticosteróides (em resposta a dor, variações extremas na temperatura corporal e outros eventos stressantes), entre outras causas (Knottenbelt, 2005; Latimer, 2011).

2.8.4. Lípidos plasmáticos: triglicéridos e colesterol

Existem cinco principais tipos de lípidos plasmáticos: colesterol, esterés de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos e ácidos gordos não esterificados (Latimer, 2011). Das várias funções que os lípidos desempenham no organismo, destacam-se os triglicéridos e os ácidos gordos como fonte de energia química e o colesterol e como componente estrutural das membranas celulares e precursor essencial na síntese de hormonas esteróides (Duncan, 2005; Stockham & Scott, 2008).

Relativamente à sua origem, os lípidos podem ser exógenos (de origem alimentar) ou endógenos (transportados no plasma agregados a péptidos, formando lipoproteínas). Os lípidos de origem alimentar dão origem a quilomicrons após uma série de reações químicas (Stockham & Scott, 2008; Latimer, 2011). As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte de triglicéridos e colesterol no plasma (Stockham & Scott, 2008). Como tal, as concentrações plasmáticas de colesterol refletem as concentrações das lipoproteínas ricas em colesterol [como as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta

densidade (HDL)] (Stockham & Scott, 2008). Por sua vez, os triglicéridos são transportados na corrente sanguínea através dos quilomicrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Duncan, 2005).

A hipertrigliceridemia é uma alteração relativamente comum em Medicina Veterinária. Pode ser fisiológica (pós-prandial), primária (rara), secundária (a doenças endócrinas, hepáticas, intestinais, pancreáticas e renais, neoplasias, etc.), hereditária ou idiopática (Duncan, 2005; Latimer, 2011). A lipase lipoproteica retira as lipoproteínas ricas em triglicéridos da circulação sanguínea, ou seja, a atividade desta enzima também pode influenciar as concentrações plasmáticas de triglicéridos. Os perfis lipídicos também são afetados pela atividade física, pela dieta, pela condição corporal e pelo ciclo reprodutivo do animal (Latimer, 2011).

2.8.5. Bilirrubina

A bilirrubina é um pigmento biliar, produto de degradação da hemoproteína presente na hemoglobina, mioglobina e outras enzimas com grupo heme. A sua forma não conjugada liga-se reversivelmente à albumina na circulação sanguínea. Quando chega ao fígado, sofre um processo de glucoronidação e é excretada na biliar, já na sua forma conjugada. Do sistema biliar passa ao intestino, onde é processada por bactérias para formar pigmentos fecais (Latimer, 2011; Hall & German, 2005).

Quando ocorre alguma falha nos mecanismos que regulam o metabolismo da bilirrubina pode desenvolver-se hiperbilirrubinemia, que se manifesta clinicamente através de icterícia (Hall & German, 2005). Este aumento na concentração plasmática de bilirrubina pode ser causado por um aumento da produção de bilirrubina (sendo a anemia hemolítica imuno-mediada a principal causa de icterícia pré-hepática, em cães e gatos), pela diminuição da captação e secreção hepáticas (em consequência da redução da massa hepática funcional) e por colestase intra ou extrahepática (Latimer, 2011; Hall & German, 2005).

2.8.6. Eletrólitos

O sódio plasmático mantém a osmolaridade do fluido extracelular e é essencial para a retenção de água a nível renal, um mecanismo de controlo para a hidratação do organismo (Latimer, 2011). Em animais saudáveis, mais de 99% do sódio filtrado nos rins é reabsorvido (Skelly & Mellanby, 2005). É o principal catião do fluido extracelular e, para a preservação da eletroneutralidade deste compartimento, cada ião de sódio deve ser equilibrado com um anião apropriado (normalmente o cloro). As concentrações plasmáticas de sódio são controladas pela regulação do volume e osmolaridade plasmáticos através da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e da libertação da hormona anti-diurética (ADH) (Skelly & Mellanby, 2005). Como tal, a interpretação da concentração plasmática de sódio

deve ser sempre feita tendo em consideração o estado de hidratação e o volume do fluido extracelular do animal (Stockham & Scott, 2008).

O cloro plasmático é o principal anião do fluido extracelular (representa 2/3 do total de aniões do fluido extracelular, sendo o bicarbonato o segundo anião mais prevalente). Alterações na concentração plasmática de cloro tendem a acompanhar as alterações do sódio e bicarbonato, de forma a manter a eletroneutralidade (Skelly & Mellanby, 2005). Este ião é controlado sobretudo através da reabsorção e secreção renal e reabsorção intestinal a partir do ácido clorídrico (Stockham & Scott, 2008).

O potássio plasmático é mantido dentro de limites estreitos que regulam as funções neuromusculares e cardíacas no organismo. É um mau indicador do potássio total porque a maioria deste ião encontra-se no fluido intracelular, onde é mantido pela bomba ATPase sódio/potássio. O potássio entra no organismo através dos alimentos e é excretado sobretudo por via renal. A sua concentração plasmática é regulada basicamente por dois processos: distribuição entre os fluidos intra e extracelulares (influenciada pela epinefrina, insulina e pela própria concentração plasmática de potássio) e a excreção renal (regulada sobretudo pela aldosterona) (Skelly & Mellanby, 2005; Stockham & Scott, 2008). As concentrações plasmáticas dependem das trocas de potássio entre os fluidos intra e extracelulares (equilíbrio interno) e alterações no potássio total (equilíbrio externo).

2.8.7. Cálcio e fósforo

O cálcio encontra-se em três formas no plasma: cálcio ionizado fisiologicamente ativo (aproximadamente 50%), cálcio quelado complexado com lactato, citrato e bicarbonato (cerca de 5-10%) e cálcio ligado a proteínas (cerca de 40-45%). Os principais fatores que influenciam a concentração plasmática do cálcio são a idade do animal (maiores concentrações plasmáticas em animais jovens), a concentração plasmática de albumina (e de outras proteínas), o equilíbrio ácido-base, a absorção intestinal, reabsorção óssea ou deposição de cálcio nos ossos, reabsorção renal e interação com o fósforo (Stockham & Scott, 2008; Latimer, 2011). As principais hormonas responsáveis pela regulação do metabolismo do cálcio são a hormona paratiróide (PTH), a vitamina D e a calcitonina (Latimer, 2011).

2.8.8. Proteínas plasmáticas

As proteínas plasmáticas desempenham funções nutritivas, mantêm a pressão oncótica e o equilíbrio ácido-base, estão envolvidas na resposta de fase aguda, no processo de coagulação e no transporte de hormonas e fármacos, entre outras (McGrotty & Tennant, 2005; Latimer, 2011).

O plasma contém albumina e globulinas, incluindo o fibrinogênio e outros fatores de coagulação (Stockham & Scott, 2008). As proteínas de coagulação não enzimáticas (fibrinogênio e fatores V e VIII) são consumidas durante a formação do coágulo, ou seja, não estão presentes no soro (Latimer, 2011) e, por isso, não figuram no perfil bioquímico de rotina (que é feito a partir de soro na maioria das vezes, em vez de plasma).

As concentrações das proteínas plasmáticas sofrem um dinamismo relacionado com a idade do animal. As concentrações são baixas no nascimento, aumentam após a absorção do colostro, decrescem após 1-5 semanas quando o colostro é metabolizado e depois aumentam até níveis de adulto entre 6 meses a 1 ano. Na idade adulta, as concentrações de albumina decrescem ligeiramente, ao contrário das concentrações de globulinas (particularmente imunoglobulinas e proteínas de fase aguda), que aumentam progressivamente com a idade. Estas diferenças fisiológicas devem ser consideradas ao interpretar as análises bioquímicas de um animal (Jain, 1993; Latimer, 2011).

A albumina representa 35 a 50% do total das proteínas plasmáticas nos animais domésticos. É responsável pelo transporte de muitos constituintes do plasma, ou seja, qualquer alteração nas concentrações plasmáticas de albumina afeta as concentrações plasmáticas desses mesmos constituintes (Latimer, 2011). Devido à sua abundância e pequena dimensão, é responsável por 75% da pressão oncótica do plasma (McGrotty & Tennant, 2005; Latimer, 2011).

As globulinas são separadas em três classes principais por eletroforese: α e β globulinas (este grupo inclui as proteínas de fase aguda da inflamação e as lipoproteínas) e γ globulinas (constitui a maioria das imunoglobulinas; são produzidas após estimulação antigénica pelos linfócitos B e plasmócitos, sobretudo nos tecidos linfóides) (Latimer, 2011). Na Tabela 2 estão expressas as diferentes proteínas pertencentes a cada grupo. As diferentes frações podem separar-se por eletroforese de acordo com a sua velocidade de migração através de um gel de acetato de celulose no campo elétrico, a qual depende da carga elétrica, massa e forma da proteína (Stockham & Scott, 2008).

As alterações nas concentrações plasmáticas de proteínas podem ser relativas (o que ocorre quando há variações no volume plasmático; neste caso, as concentrações de albumina e globulinas variam no mesmo sentido, ou seja, o rácio albumina/globulinas permanece dentro do intervalo de referência) ou absolutas (Latimer, 2011). A desidratação é a causa mais comum para o desenvolvimento de hiperproteinémia relativa. É raro desenvolver-se uma hiperalbuminémia absoluta. Por sua vez, é muito comum ocorrer hiperglobulinémia em resposta a infeções e inflamações, devido à síntese hepática de proteínas de fase aguda e à estimulação antigénica que leva à produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (McGrotty & Tennant, 2005; Latimer, 2011).

Na resposta de fase aguda ocorrem alterações neuroendócrinas (como aumento da concentração de cortisol), hematopoiéticas (como anemia e leucocitose), metabólicas (como aumento da lipólise) e a síntese de proteínas de fase aguda (Martinez-Subiela, 2001). Esta resposta inicia-se 24 horas após o início da lesão tissular, mas pode também ocorrer em resposta a estrogénio, stress físico ou administração de corticosteróides (Latimer, 2011). Nesta resposta inflamatória, o fígado prioriza a síntese de proteínas de fase aguda (globulinas α e β) e diminui concomitantemente a síntese de albumina (que, por este motivo, é considerada uma proteína de fase aguda negativa). Normalmente, a hipoalbuminémia é contrabalançada pela hiperglobulinémia e, como tal, não se verificam alterações na concentração proteica total (McGrotty & Tennant, 2005; Latimer, 2011). As proteínas de fase aguda são consideradas indicadores inespecíficos de lesão tecidular.

No geral, a hipoproteinémia desenvolve-se devido a perda inespecífica (hemorragias e exsudações), a perda seletiva (nefropatias com perda de albumina e enteropatias com perda de albumina e globulinas, por exemplo) ou a síntese proteica deficiente (devido a doença hepática crónica, má nutrição, má digestão e má absorção, entre outros) (McGrotty & Tennant, 2005; Stockham & Scott, 2008; Latimer, 2011)

Uma vez que a albumina e as globulinas α e β são sintetizadas no fígado, estas proteínas podem ser consideradas marcadoras da função hepática. O fato do fígado ter uma grande capacidade de produção de albumina em resposta a perdas e uma capacidade de reserva funcional muito grande e da semi-vida da albumina ser bastante longa (entre uma a três semanas no cão), faz com que apenas surja hipoalbuminémia em doenças hepáticas crónicas com um grave comprometimento de função (McGrotty & Tennant, 2005).

Tabela 2: Exemplos de proteínas pertencentes às classes das α , β e γ globulinas (classificação de acordo com a sua mobilidade eletroforética) (adaptado de McGrotty & Tennant, 2005).

α globulinas	β globulinas	γ globulinas
α 1-inibidor antiproteinase	Fibrinogénio	IgA
α 1-glicoproteína ácida	Complemento	IgE
α 2-macroglobulina	Proteína C reativa	IgG
Ceruloplasmina	Ferritina	IgM
Proteína C	Algumas imunoglobulinas	
Haptoglobina		

3. Componente experimental

3.1. Introdução

A fisiologia da conservação é uma disciplina emergente cujo principal objetivo é a compreensão das respostas fisiológicas dos organismos às mudanças ambientais, maximizando, desta forma, o sucesso das estratégias de conservação. Isto inclui o estudo do metabolismo, das relações térmicas, da nutrição, das respostas endócrinas e dos parâmetros imunológicos (Wikelski & Cooke, 2006). Atualmente, a utilização de índices fisiológicos como uma ferramenta na investigação e manejo de fauna silvestre tem vindo a ganhar cada vez mais importância. Este tipo de informação é muito útil na avaliação do estado de saúde e condição fisiológica de animais silvestres individuais e de populações e pode indiretamente servir como um indicador valioso da condição e qualidade do habitat (Smith & Rongstad, 1980; McCue & O'Farrell, 1987; Wikelski & Cooke, 2006; Davis, Maney & Maerz, 2008). No entanto, antes de este tipo de avaliação ser aplicada a projetos de conservação e manejo de fauna silvestre, é necessário estabelecer intervalos de referência para as espécies em causa. A partir do momento em que estão estabelecidos os valores fisiológicos basais de determinada espécie, as alterações nos parâmetros fisiológicos podem ser utilizadas para prever e antecipar problemas futuros dessa mesma espécie; da mesma forma, podem quantificar o impacto negativo de ações antropogénicas (Wikelski & Cooke, 2006).

Uma das limitações da utilização e comparação de intervalos de referência da mesma espécie, obtidos por autores diferentes, são as discrepâncias encontradas, que podem ser explicadas por fatores como a dimensão da amostra, a idade, o sexo, o estado de saúde e nutricional dos animais, a atividade física, a condição do habitat (no caso dos animais de vida livre) o método e local de colheita sanguínea e a metodologia e técnicas laboratoriais utilizadas no processamento das amostras (Fuller, Kerr & Karns, 1985; Jain, 1993; Constable *et al.*, 1998; Marco, Martinez, Pastor e Lavin, 2000; García *et al.*, 2008; Moen, Rasmussen, Burdett & Pelican, 2010). Não menos importantes são as diferenças fisiológicas resultantes da excitação, atividade muscular, tipo de manipulação, tempo da colheita, temperatura ambiente, altitude, assim como variações diurnas e sazonais, particularmente nos animais jovens (Jain, 1993). Neste estudo em particular, os animais estiveram sujeitos a fatores stressantes suscetíveis de adulterar muitos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados (Fowler, 1995; Cattet *et al.*, 2008), como ruídos e odores estranhos, exposição anormal à luminosidade, limitação física e contacto forçado com o homem (Morgan & Tromborg, 2007). Todos estes fatores provocam uma resposta com efeitos físicos, comportamentais e fisiológicos a curto e médio prazo, muitas vezes com implicações

no bem-estar animal (Harris *et al.*, 2006; Iossa *et al.*, 2007; Cattet *et al.*, 2008). No entanto, estas alterações são inerentes aos métodos de captura utilizados, pelo que estarão sempre presentes em animais capturados desta forma.

3.2. Principais objetivos do estudo

O principal objetivo do presente estudo foi definir valores basais de parâmetros hematológicos e de bioquímicas sanguíneas de carnívoros silvestres autóctones em Portugal, de forma a tentar minimizar a grande lacuna que existe no conhecimento científico acerca destas espécies silvestres e assim contribuir para o seu estudo e conservação.

Como objetivos secundários enumeram-se:

- A caracterização da resposta fisiológica de stress nestes animais;
- A pesquisa de hemoparasitas em esfregaços de sangue periférico nestas espécies;
- A determinação da percentagem de eritrócitos falciformes na espécie *G. genetta*;
- O estudo do efeito de fatores fisiológicos como o sexo e a idade, bem como a infeção por hemoparasitas, nos resultados dos parâmetros analisados.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Métodos de captura

Foram utilizados dois tipos de armadilhas para capturar os carnívoros silvestres: caixas (Tomahawk®, Tomahawk Live Trap Co., Hazelhurst, Wisconsin, USA) e armadilhas de laço de pescoço (Collarum®, Wildlife Control Supplies, East Granby, Connecticut, USA) (Figura 3). Utilizou-se isco alimentar em todas as armadilhas, quer isco inanimado disponível para consumo pelo carnívoro (sardinha, chouriço, ovos ou cadáveres), quer isco vivo indisponível para o carnívoro (galinhas ou pombos, colocados numa gaiola acoplada à caixa-armadilha). Enquanto as caixas são armadilhas pouco seletivas, a Collarum® é uma armadilha direcionada à captura de canídeos. Num estudo comparativo de vários métodos de armadilhagem nos Estados Unidos, a Collarum® destacou-se pela sua seletividade de 100% para coiotes (Shivik, Martin, Pipas, Turnan & DeLiberto, 2005).

Foram feitas duas vistorias diárias às armadilhas (ao início da manhã e ao final da tarde). Sempre que as condições climáticas (chuva moderada/forte ou calor extremo) pudessem comprometer o bem-estar dos animais capturados, as armadilhas foram fechadas ou inativadas. Isto é particularmente importante nas espécies-alvo deste projeto, uma vez que os pequenos mamíferos são muito sensíveis a temperaturas extremas e podem sofrer

facilmente desidratação e morte por inanição devido ao seu metabolismo muito rápido, ao stress e à exaustão física durante o tempo de captura (Iossa *et al.*, 2007; Marks, 2010).

Em cada vistoria, sempre que detetada uma captura, a armadilha foi coberta com uma manta escura de forma a minimizar o stress no animal através da redução dos estímulos sensoriais. No final de cada vistoria, procedeu-se à manipulação do(s) animal(ais) capturados(s), como pormenorizado posteriormente neste capítulo.

Figura 3: Caixa Tomahawk® ativada no campo, com o pormenor de um dejetto (seta branca) nas proximidades, sinal de passagem de um pequeno carnívoro e de marcação do território (canto inferior esquerdo).

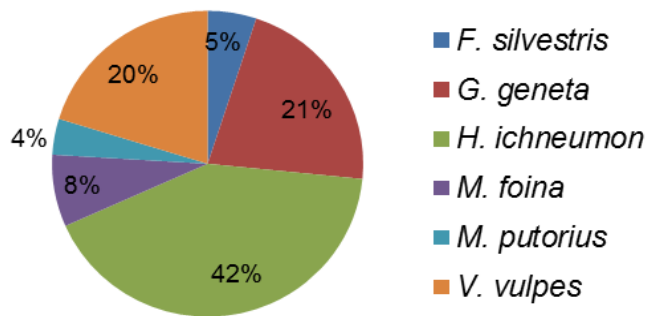


3.3.2. Caracterização da amostra

Durante o período total do estudo (entre janeiro de 2012 e fevereiro de 2013), foram capturados 79 carnívoros silvestres. A espécie mais capturada foi *H. ichneumon* (41,8%), seguindo-se *G. genetta* (21,5%) e *V. vulpes* (20,3%). As espécies *M. foina* (7,6%), *F. silvestris* (5,1%) e *M. putorius* (3,8%) estão representadas com frequências de captura muito menores (Figura 4).

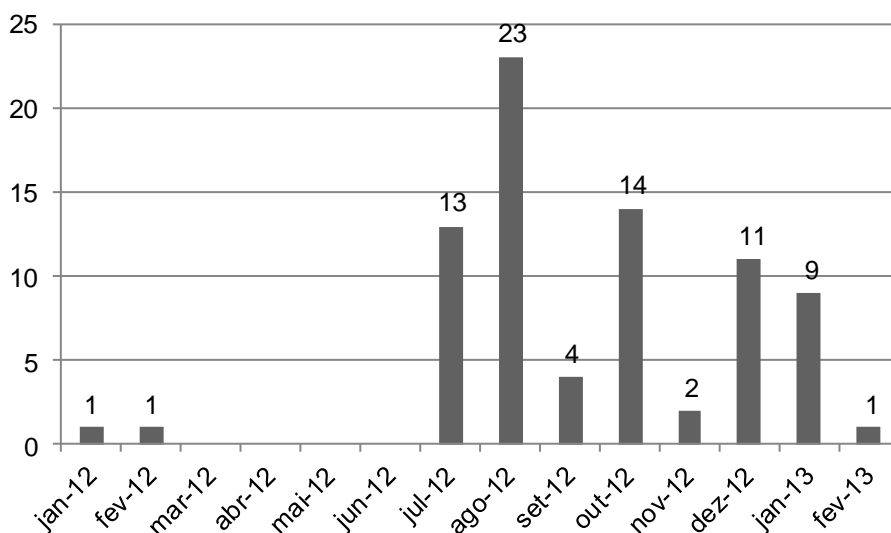
Das 17 raposas capturadas durante a totalidade do projeto, 15 (88,2%) foram capturadas em caixas-armadilha e 2 (11,8%) em Collarum®. As restantes espécies foram sempre capturadas em caixas-armadilha.

Figura 4: Distribuição, em porcentagem, das espécies capturadas durante a totalidade do estudo (entre janeiro de 2012 e fevereiro de 2013).



Efetuaram-se capturas em todos os meses exceto nos correspondentes à época reprodutiva dos animais (março, abril, maio e junho de 2012). Agosto foi o mês em que se registaram mais capturas (29,1%), seguido de outubro (17,7%) e de julho (16,5%). Os meses com um menor número de animais capturados foram janeiro e fevereiro de 2012 e fevereiro de 2013, com apenas uma captura. Na figura 5 pode visualizar-se a distribuição mensal das capturas durante a totalidade do estudo.

Figura 5: Distribuição mensal do número de capturas durante a totalidade do estudo (frequências absolutas), de janeiro de 2012 a fevereiro de 2013. Não se efetuaram quaisquer capturas entre março e junho (inclusivé) de 2012, por coincidir com a época reprodutiva dos animais.



Todos os gatos-bravos capturados foram do sexo masculino (dois juvenis e dois adultos). Foram capturadas mais genetas do sexo masculino (11) do que do sexo feminino (6) e pertencentes sobretudo à faixa etária adulta e juvenil. Pelo contrário, capturaram-se mais fêmeas (19) de sacarrabos do que machos (14); a grande maioria era de idade adulta. Relativamente às fuinhas, foram capturados 2 machos e 3 fêmeas. Não se conseguiu verificar o sexo de um dos animais devido a falta de pessoal no campo e a recuperação anestésica súbita. A maioria das fuinhas era de idade adulta. Foram capturados 2 toirões do sexo feminino e 1 do sexo masculino; todos eram adultos. Das raposas, foram capturados 7 machos e 9 fêmeas, sendo que 7 eram juvenis e 6 eram adultas. Fazendo uma análise geral, foram capturados 50% de animais do sexo feminino e outros 50% do sexo masculino, sendo que a maioria eram adultos (50,6%). A Tabela 3 apresenta a informação detalhada acerca do sexo e idade de todas as espécies capturadas.

Tabela 3: Distribuição do sexo e idade das espécies capturadas.

	Sexo				Idade					
	M	F	NE*	Total	Juvenil	Sub adulto	Adulto	Idoso	NE*	Total
<i>F. silvestris</i>	4	0	0	4	2	0	2	0	0	4
<i>G. genetta</i>	11	6	0	17	6	2	9	0	0	17
<i>H. ichneumon</i>	14	19	0	33	9	6	17	1	0	33
<i>M. foina</i>	2	3	1	6	1	1	3	0	1	6
<i>M. putorius</i>	1	2	0	3	0	0	3	0	0	3
<i>V. vulpes</i>	7	9	0	16	7	2	6	1	0	16
Total	39	39	1	79	25	11	40	2	1	79

*NE: Não especificado (a recuperação anestésica súbita do animal e a falta de pessoal não permitiram a recolha de toda a informação pertinente).

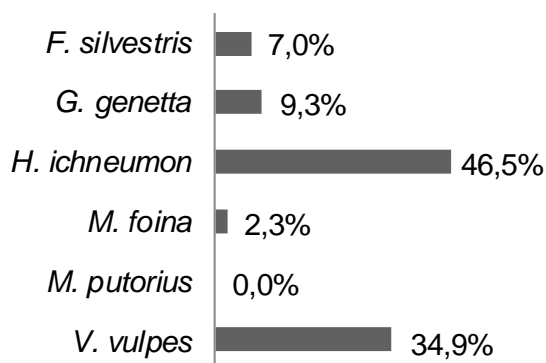
Foi obtido sangue em EDTA de 64 animais (81,0% da amostra total), mas nem sempre foi possível realizar a totalidade das análises hematológicas pretendidas, por quantidade de amostra insuficiente, falta de tempo e/ou de pessoal. Foi possível determinar o hematócrito de 61 animais (77,2%), contagem de eritrócitos de 51 animais (64,6%), contagem de leucócitos de 53 animais (67,1%), contagem diferencial de leucócitos de 63 animais (79,7%) e análises bioquímicas de 43 animais (54,4%). De uma forma geral, a maior parte das análises hematológicas foram realizadas a partir de amostras sanguíneas de sacarrabos (*H.*

ichneumon) e de raposas (*V. vulpes*). O número e tipo de análises efectuados e as respectivas frequências relativas estão pormenorizados na Tabela 4. Na Figura 6 pode observar-se a distribuição relativa das espécies nas quais se realizaram análises bioquímicas.

Tabela 4: Números absolutos (n) e frequências relativas (%) da realização do hematócrito (HT), contagem de eritrócitos (CE), contagem de leucócitos (CL), contagem diferencial de leucócitos (CDL) e análises bioquímicas (BQ), em cada espécie de carnívoro silvestre.

	HT		CE		CL		CDL		BQ	
	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
<i>F. silvestris</i>	3	5	2	4	2	4	4	6	3	7
<i>G. genetta</i>	10	16	10	20	10	19	12	19	4	9
<i>H. ichneumon</i>	27	44	23	45	23	43	27	43	20	47
<i>M. foina</i>	4	7	2	4	3	6	4	6	1	2
<i>M. putorius</i>	2	3	2	4	2	4	1	2	0	0
<i>V. vulpes</i>	15	25	12	24	13	25	15	24	15	35
Total	61	100	51	100	53	100	63	100	43	100

Figura 6: Representação gráfica da distribuição relativa das espécies nas quais se realizaram análises bioquímicas.



3.3.3. Contenção química e monitorização dos parâmetros biológicos durante a anestesia

Como já foi referido, as manipulações dos animais foram efetuadas sempre no final da vistoria às armadilhas. Fez-se a transferência dos animais capturados das caixas-armadilha para uma jaula de contenção, com o auxílio de tábuas de madeira adaptadas e de mantas ou toalhas escuras, para evitar a entrada de luz. No caso das Collarum®, recorreu-se simplesmente a uma manta e à própria contenção física oferecida pela armadilha. Durante este processo foram minimizados os ruídos, de forma a tentar reduzir o stress causado no animal. Na maioria das situações, estiveram presentes dois ou três operadores.

Após a transferência, a jaula de contenção com o animal foi pesada com uma balança (HCB20K10, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Alemanha) e, depois de calculado o peso do animal, foram preparadas as respetivas doses anestésicas. No caso das raposas capturadas nas Collarum®, o seu peso foi estimado pelo operador mais experiente.

Os animais foram anestesiados com uma combinação de quetamina (Imalgene®, 100 mg/mL, Merial Laboratorios, Porto Salvo, Portugal ou Clorketam®, 100mg/mL, Vétoquinol, Barcarena, Portugal) e medetomidina (Medetor®, 1 mg/mL, Virbac, Quinta da Beloura, Portugal ou Domitor®, 1mg/mL, Pfizer, Porto Salvo, Portugal). A anestesia foi revertida com atipamezol (Revertor®, 5 mg/mL, Virbac, Quinta da Beloura, Portugal ou Antisedan®, 5mg/mL, Pfizer, Porto Salvo, Portugal). Os fármacos foram administrados nos músculos superficiais da coxa (biceps femoral, semitendinoso ou semimembranoso), com uma seringa de 1 ou 2 mL e uma agulha 23 G (modelo Sterican®, B. Braun, Barcarena, Portugal). As doses administradas foram adaptadas a cada espécie e estão discriminadas na Tabela 5.

A indução anestésica foi conseguida com uma única administração em todos os gatos-bravos (*F. silvestris*) e toirões (*M. putorius*). Nas restantes espécies, foi necessário fazer um reforço anestésico em alguns animais, como se pode ver na Tabela 6. A fuínha (*M. foina*) foi a espécie na qual houve necessidade de fazer mais reforços anestésicos (em 50% dos animais). Isto pode dever-se sobretudo a dois fatores: dose inapropriada (uma vez que as doses utilizadas foram obtidas por extrapolação de espécies semelhantes) ou variação individual e/ou populacional na resposta aos fármacos.

Tabela 5: Médias e intervalos das doses de quetamina, medetomidina e atipamezol (mg/kg) administradas a cada espécie, tendo em conta apenas os casos nos quais foi feita uma única administração (sem necessidade de reforço). Os intervalos das doses foram deixados em branco nos casos em que se administrou sempre a mesma dose em todos os animais dessa espécie.

	Quetamina (mg/kg)		Medetomidina (mg/kg)		Atipamezol (mg/kg)	
	Média	Intervalos	Média	Intervalos	Média	Intervalos
<i>F. silvestris</i>	3		0,05	0,05 – 0,06	0,15	0 – 0,3
<i>G. genetta</i>	5	5 – 8	0,16		0,7	0 – 0,85
<i>H. ichneumon</i>	4	3 – 8	0,16	0,16 – 0,17	0,75	0 – 0,85
<i>M. foina</i>	5	3 – 6	0,09	0,07 – 0,12	0,25	0 – 0,4
<i>M. putorius</i>	3		0,06	0,06 – 0,07	0,25	0,15 – 0,35
<i>V. vulpes</i>	4		0,08	0,07 – 0,09	0,3	0 – 0,45

Tabela 6: Número de animais de cada espécie e respetivas frequências relativas, nos quais se fez uma administração única ou houve necessidade de reforço anestésico para indução anestésica.

	Administração única		Reforço anestésico	
	N	%	N	%
<i>F. silvestris</i>	4	100,0	0	0
<i>G. genetta</i>	15	88,2	2	11,8
<i>H. ichneumon</i>	32	97,0	1	3,0
<i>M. foina</i>	3	50,0	3	50,0
<i>M. putorius</i>	3	100,0	0	0,0
<i>V. vulpes</i>	15	93,8	1	6,2

Após a administração anestésica, o animal foi deixado na jaula de contenção coberta (ou apenas tapado com uma toalha/manta no caso das Collarum®) a cerca de 100 metros dos operadores. Foi feita uma monitorização do plano anestésico a intervalos regulares. Os reflexos (palpebral, panicular e auricular) do animal foram verificados até à sua perda total ou quase total. Se, findos 15-20 minutos, o animal não manifestou quaisquer efeitos, ponderou-se a administração de nova dose anestésica, o que foi necessário fazer em 7

animais (8,9%). Nesses casos, administrou-se metade das doses previamente administradas, tanto de quetamina, como de medetomidina.

No momento da perda dos reflexos, o animal foi colocado numa mesa desmontável, previamente protegida com um resguardo descartável (Figura 7).

Procedeu-se imediatamente à:

- Aplicação de soro fisiológico nos globos oculares, para proteger a córnea da dessecação e colocação de uma pequena toalha escura sobre a cabeça do animal, para prevenir lesões na retina por exposição aos raios solares;
- Colocação da sonda lingual do pulsoxímetro (modelo VM 2160, com sensor lingual Viamed, Viamed, Reino Unido) para a monitorização contínua da frequência cardíaca e da saturação parcial de oxigénio;
- Introdução do termómetro digital de monitorização contínua (modelo DataTherm II, Geratherm®, Alemanha) no reto para a medição da temperatura retal;
- Monitorização da frequência respiratória por observação dos movimentos respiratórios abdominais e com o auxílio de um cronómetro.

A idade do animal foi estimada com base no seu peso e dentição (eventual presença de dentes decíduos e desgaste dos dentes definitivos), foi feito um exame de estado geral (avaliação das mucosas, linfonodos, palpação abdominal e eventuais lesões cutâneas e músculo-esqueléticas) e foram obtidas várias biometrias (comprimento total, da cauda e do tarso). Foram também recolhidas as amostras sanguíneas a ser utilizadas neste estudo, como pormenorizado no ponto 3.3.4.

Foi introduzido um microchip (Backhome, Virbac, Quinta da Beloura, Portugal) subcutâneo na tábua do pescoço esquerda ou direita em 72 animais (91,1%), para identificação dos animais em caso de recaptura ou em caso de captura em eventuais estudos futuros na mesma zona geográfica. Este procedimento não foi possível em 7 animais (8,9%) devido a recuperação anestésica súbita. Foi efetuada uma depilação pequena mas visível na superfície dorsolateral esquerda ou direita da região cervical, para posterior reconhecimento em caso de recaptura. Nestes casos, procedeu-se à transferência do animal para a jaula de contenção, de forma a fazer a leitura do microchip e confirmar a sua identificação, sendo o animal libertado de seguida.

No final do procedimento, foi preparada a dose de atipamezol tendo em conta os reflexos (nomeadamente o palpebral e o auricular) e o estado de consciência do animal. Quando o animal não mostrou quaisquer sinais de recuperação anestésica, foi administrado um volume de atipamezol idêntico ao de medetomidina. Quando o animal mostrou alguns sinais de recuperação (reflexos recuperados, espasmos musculares, etc.), foi dada uma dose menor de atipamezol (por exemplo metade do volume administrado de medetomidina). Nos

casos de recuperação súbita da anestesia, não foi administrada qualquer dose de atipamezol.

O animal era então colocado na jaula de contenção (Figura 8), coberta com uma toalha ou manta. Esta era afastada cerca de 100-200 metros dos operadores e colocada em local abrigado.

Todo o material não descartável utilizado foi desinfetado com toalhetas húmidas com desinfetante (Clinell, Gama Healthcare Ltd., Londres, Reino Unido) e devidamente acondicionado.

O animal foi vigiado a intervalos regulares até recuperação anestésica total ou quase total. A sua libertação foi sempre efetuada em locais seguros, nunca perto de cursos de água ou precipícios, de forma a evitar acidentes.

Figura 7: Colheita de sangue num gato-bravo (*Felis silvestris*) na veia cefálica (membro anterior esquerdo) e monitorização dos parâmetros biológicos (fotografia original).



Figura 8: Geneta (*Genetta genetta*) em recuperação anestésica na jaula de contenção (fotografia original).



3.3.4. Colheita e armazenamento das amostras sanguíneas

O sangue foi colhido da veia cefálica e/ou da veia safena, consoante o operador, as dimensões do animal e o calibre das veias. Foram utilizadas agulhas de 23 ou 21 G (modelo Sterican®, B. Braun, Barcarena, Portugal), de acordo com o calibre da veia, e seringas de 1, 2 ou 5 mL. Quando a quantidade de sangue colhido foi suficiente (mais de 1 mL), colocou-se uma pequena porção num tubo com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, Tabela 7) e a restante num tubo seco para posterior realização das análises hematológicas e bioquímicas, respetivamente. Os tubos foram imediatamente e temporariamente armazenados numa geleira (a 4°C, com acumuladores de gelo) e protegidos da luz solar e da chuva.

O esfregaço sanguíneo, assim como a determinação do hematócrito e a diluição da amostra de sangue com a Solução de Natt & Herrick's foram realizados assim que possível, no máximo 12 horas após a colheita.

Tabela 7: Modo de ação, vantagens e desvantagens do anticoagulante EDTA (adaptado de Voigt, 2000).

	Modo de ação	Vantagens	Desvantagens
EDTA	Formação de sais de cálcio insolúveis	Excelente poder de conservação durante 6 horas; recomendado para hematologia de rotina	Elevada concentração (>2 mg/mL) provoca retração celular

3.3.5. Análises laboratoriais hematológicas

a) Determinação do microhematócrito

Os tubos de microhematócrito foram preenchidos com sangue em EDTA até cerca de 75% do seu volume e a sua ponta inferior foi vedada com plasticina. De seguida, foram centrifugados durante 10 minutos na velocidade máxima (4000 rpm) numa centrífuga angular analógica (CNT800D, Quirumed, Massamá, Portugal), para provocar a separação dos componentes celulares e do plasma devido à diferença das suas densidades. Após a centrifugação, fez-se a medição do comprimento total e do comprimento da porção celular e foi aplicada a seguinte fórmula, para determinação do hematócrito, em percentagem:

$$\frac{\text{Comprimento porção celular}}{\text{Comprimento total}} \times 100$$

b) Determinação da concentração de hemoglobina

Uma vez que esta análise não foi efetuada imediatamente após a colheita de sangue, tornou-se necessário congelar os tubos de sangue em EDTA, o que inviabilizou a realização desta análise em equipamentos de leitura automática. Utilizou-se então o método da hematina alcalina com leitura manual da absorvância no espectrofotómetro e posterior conversão da absorvância na respetiva concentração de hemoglobina. A amostra de sangue (20µL) foi diluída na razão de 1:151 em hidróxido de sódio (NaOH, 0,1M, 3mL) com 2,5% de detergente TritonX, para lisar os eritrócitos e transformar a hemoglobina num produto final estável (hematina alcalina), de acordo com o método AHD-575 (Lema *et al.*, 1994; Shah,

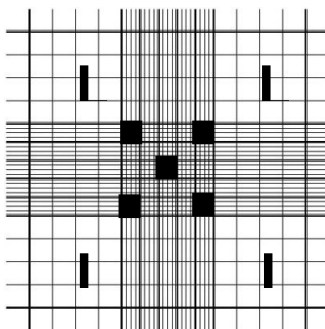
Shah & Puranik, 2011). A leitura foi efetuada num espectrofotómetro (Ultrospec® 3100 pro, GE Healthcare Europe GmbH, Carnaxide, Portugal), no comprimento de onda de 580 nm. Concomitantemente, fez-se a leitura das absorvâncias de amostras sanguíneas de cães, gatos, raposas e sacarrabos com concentrações de hemoglobina conhecidas e determinadas em laboratórios comerciais. Com base nestes dados, calculou-se a reta de regressão linear e a respetiva fórmula da concentração de hemoglobina em função da absorvância, para cada espécie. Estes cálculos foram efetuados no Microsoft Office Excel 2010. Para a transformação das absorvâncias do gato-bravo utilizou-se a fórmula referente ao gato doméstico e para a fuinha e toirão foi utilizada a fórmula do cão, devido à sua maior proximidade filogenética. As absorvâncias de raposas e sacarrabos capturados foram transformadas com base na fórmula obtida de raposas e sacarrabos em cativeiro.

c) Contagem celular

Realizou-se a contagem direta de eritrócitos e leucócitos através de um hemocítmetro (câmara Neubauer Improved, Laboroptik, Lancing, Reino Unido). Procedeu-se à diluição da amostra sanguínea com a solução de Natt & Herrick's, na razão de 1:200 (ver anexo 1 para mais detalhes). A câmara foi preenchida com a solução resultante e observada ao microscópio ótico com uma lente ocular de 10x e uma objetiva de 40x (ampliação de 400x). Foram contadas todas as células nucleadas (leucócitos) nos 4 quadrados L e todos os eritrócitos nos 5 quadrados marcados com preenchimento preto, como demonstrado na Figura 9. Aos resultados obtidos foram aplicadas as seguintes fórmulas finais (com base no fator de diluição do sangue de 0,005 e no volume total líquido contido nas zonas contadas para eritrócitos e leucócitos (0,4 µL e de 0,8 µL, respetivamente):

$$\begin{array}{l} \text{Concentração} \\ \text{eritrócitos (10}^6/\mu\text{L)} \end{array} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células}}{200} \qquad \begin{array}{l} \text{Concentração} \\ \text{leucócitos (10}^3/\mu\text{L)} \end{array} = \frac{\text{N}^\circ \text{ células}}{4}$$

Figura 9: Pormenor da Câmara de Neubauer Improved. As contagens de leucócitos efetuaram-se nos 4 quadrados L e as contagens de eritrócitos nos 5 quadrados preenchidos a preto (adaptado de Electron Microscopy Sciences, 2013).



d) Preparação, fixação, coloração e observação do esfregaço sanguíneo

Como já foi referido, os esfregaços sanguíneos foram preparados a partir de sangue em EDTA, secos ao ar e devidamente acondicionados até à sua coloração, que foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-UL. Utilizou-se uma coloração de Romanowsky, especificamente a técnica de Giemsa rápido, na qual se procede à fixação com metanol durante 1 minuto, à coloração com Giemsa puro durante cerca de 30 segundos e a posterior lavagem abundante com água. Esta coloração é composta por azul de metileno, que cora os componentes celulares ácidos [como o núcleo e o ácido ribonucleico (ARN) citoplasmático] e eosina, que cora os componentes básicos, como o citoplasma (Torrance, 2000).

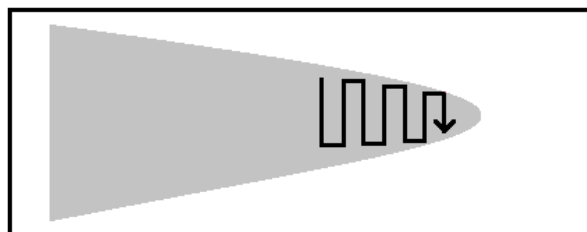
e) Contagem diferencial de leucócitos e pesquisa de hemoparasitas

No total, foram observados ao microscópio ótico 65 esfregaços sanguíneos, utilizando uma ocular de 10x e uma objetiva de imersão de 100x (ampliação de 1000x), para efetuar a contagem diferencial de leucócitos. Foram contadas 200 células nucleadas ao longo da largura da camada unicelular, de acordo com o método errante [do inglês *wandering* (Voigt, 2000)], sem nunca observar a mesma região duas vezes, como se pode verificar na Figura 10. O fato de se contarem 200 células melhora a precisão do método (Voigt, 2000). As células contabilizadas foram classificadas em: neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos ou basófilos, de acordo com a sua morfologia. Os critérios definidos foram aplicados em todas as observações para diminuir a margem de erro: células irreconhecíveis ou demasiado dúbias não foram contabilizadas e os neutrófilos em banda só foram contabilizados em casos inequívocos (em caso de dúvida foram contabilizados como segmentados). Em dois dos esfregaços observados (pertencentes à espécie *V. vulpes*) não foi possível efetuar a contagem diferencial de leucócitos (as razões são apresentadas no capítulo Discussão).

Foi também efetuada a pesquisa de parasitas sanguíneos, de acordo com o seguinte protocolo:

- Percorreu-se toda a lâmina com a objetiva seca de 4x, para a pesquisa de microfilárias ou qualquer outra irregularidade;
- Fez-se a pesquisa de *Hepatozoon* com a objetiva de 10x;
- Avaliou-se a zona de camada unicelular, com a objetiva de imersão de 100x, para a pesquisa de piroplasmas (nomeadamente *Babesia*) e micoplasmas, bem como para confirmar a presença de *Hepatozoon*, quando presente.

Figura 10: Representação simplista do método errante utilizado na zona de camada unicelular do esfregaço sanguíneo, para contagem diferencial de leucócitos (original).



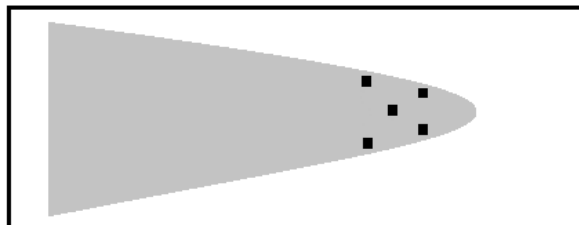
f) Contagem de eritrócitos falciformes na espécie *G. genetta*

No total, foram observados 12 esfregaços de sangue periférico relativos à espécie *G. genetta*. No entanto, para calcular a percentagem de eritrócitos falciformes nesta espécie, apenas foram considerados 4 esfregaços, pelos seguintes motivos:

- Dois dos esfregaços sanguíneos não apresentavam qualquer eritrócito falciforme nos campos fotografados;
- Os restantes 6 esfregaços estavam demasiado espessos, inclusivamente na região da camada unicelular, não permitindo a distinção morfológica entre os dois tipos de eritrócitos.

O método definido consistiu em fotografar 5 campos na zona da camada unicelular de cada esfregaço sanguíneo, com a objetiva de imersão (ampliação de 1000x), como se pode perceber na Figura 11. Posteriormente, realizou-se a contagem de eritrócitos falciformes e de eritrócitos totais em cada fotografia de forma a permitir o cálculo da percentagem de eritrócitos falciformes em cada animal. Por fim, foi efetuada a média das 4 percentagens obtidas.

Figura 11: Representação simplista da localização aproximada dos 5 campos da zona de camada unicelular do esfregaço sanguíneo fotografados para posterior contagem de eritrócitos falciformes, na espécie *G. genetta* (original).



3.3.6. Análise laboratorial bioquímica

Os tubos com sangue coagulado foram deixados a repousar no frigorífico durante 24 horas, para que ocorresse a retração celular. Após este período de tempo, foram centrifugados numa centrífuga angular analógica (CNT800D, Quirumed, Massamá, Portugal) durante 10 minutos na velocidade máxima de 4000 rpm. Os soros resultantes foram transferidos para tubos Eppendorf, imediatamente congelados e encaminhados assim que possível ao Laboratório Veterinário Inno, em Braga, Portugal, onde foram determinadas as concentrações dos parâmetros bioquímicos que figuram na Tabela 8. As análises foram efetuadas no analisador automático BS-380 (Mindray, Shenzhen, China). As concentrações foram medidas por espectrofotometria. Os parâmetros proteínas totais, albumina e fracções das globulinas foram quantificados pelo método de eletroforese de proteínas.

Tabela 8: Parâmetros bioquímicos avaliados no Laboratório Veterinário Inno (Braga, Portugal) e respetivos métodos químicos.

Parâmetros bioquímicos	Métodos químicos
Ureia	Urease GLDH, método UV
Creatinina	Método Jaffé modificado
Aspartato aminotransferase (AST) Alanina aminotransferase (ALT)	Método IFCC, sem ativação do piridoxal fosfato
Creatina quinase (CK)	Método IFCC
Proteínas totais (PT)	Método biureto
Albumina	
Globulinas α 1	
Globulinas α 2	Eletroforese
Globulinas β	
Globulinas γ	
Glucose	Método GOD-POD
Bilirrubina total	Método DAS
Sódio	
Potássio	Método ISE - Eléctrodo seletivo de iões
Cloro	
Cálcio total	Método Arsenazo III
Fósforo	Método fosfomolibdato
Colesterol	Método colesterol oxidase-peroxidase
Triglicéridos	Método glicerocinase peroxidase-peroxidase

3.3.7. Análise estatística

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos de todas as espécies foram descritos quanto aos seus indicadores estatísticos: mediana, desvio padrão e valores máximo e mínimo. Para além disto, determinaram-se intervalos de referência de cada parâmetro nas espécies *H. ichneumon* (sacarrabos) e *V. vulpes* (raposa). No entanto, devido à reduzida dimensão das amostras e a outros fatores discutidos no ponto 6.6., estes intervalos serão designados *intervalos da amostra* daqui em diante. Nos casos em que a amostra é maior que 20 indivíduos, são também apresentados os intervalos de confiança de 90% dos limites inferior e superior desses intervalos.

De acordo com a International Federation for Clinical Chemistry (IFCC) e a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), a determinação de intervalos de referência de amostras com menos de 120 indivíduos deve ser feita através de métodos robustos, sempre que a distribuição é simétrica (Geffré, Concordet, Braun & Trumel, 2011). Como tal, a estatística descritiva e o cálculo dos *intervalos da amostra* foram efetuados através de métodos robustos, no software Reference Value Advisor 2.1 (aplicado ao Microsoft Office Excel 2010). Estes métodos são capazes de manter a taxa de erro tipo I de um teste dentro de valores adequados e de manter o poder dum teste (probabilidade de um erro tipo II não ocorrer), mesmo quando a distribuição é não normal e os dados são heterocedásticos (Erceg-Hurn & Mirosevich, 2008). A mediana é utilizada como a medida de tendência central de eleição em amostras muito pequenas (sujeitas a uma maior variabilidade e sem uma distribuição normal dos seus valores) porque, ao ser o valor que divide a distribuição pela metade, é pouco afetada pela existência de *outliers* com valores extremos, ao contrário do que acontece com a média aritmética (Potvin & Roff, 1993). Os *outliers* foram identificados através do método de Tukey e analisados individual e cuidadosamente, tendo sido mantidos na grande maioria dos casos (os casos que foram excluídos serão referidos nos resultados), uma vez que é praticamente impossível saber se se tratam de valores realmente aberrantes, de acordo com as recomendações da IFCC e do CLSI (Geffré *et al.*, 2011).

Realizou-se também uma análise estatística inferencial, através do recurso ao IBM SPSS Statistics 20. Devido à pequena dimensão da amostra e à distribuição não normal dos dados, utilizou-se um teste não paramétrico (teste Wilcoxon Mann-Whitney), a fim de verificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos de indivíduos de sexos e idades diferentes, nas espécies *H. ichneumon* e *V. vulpes*. Também se estudou a influência da infeção por hemoparasitas nos resultados dos parâmetros analisados nestas duas espécies.

3.4. Resultados

3.4.1. Gato-bravo (*F. silvestris*)

Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos da amostra de *F. silvestris* serão apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Os resultados obtidos foram comparados com valores de gato-bravo em cativeiro obtidos por Marco *et al.* (2000) e com intervalos de referência do gato doméstico, segundo Jain (1993) e Latimer (2011).

Na análise dos parâmetros hematológicos verificou-se uma ligeira diminuição na contagem total de eritrócitos, bem como uma elevação dos parâmetros hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). No leucograma, verificou-se neutrofilia e linfopénia.

Na análise dos parâmetros bioquímicos, verificou-se uma elevação da concentração plasmática de quatro parâmetros (ureia, CK, fósforo e albumina), sendo que a ureia foi o parâmetro que manifestou um aumento mais marcado quando comparado com valores documentados na literatura.

a) Parâmetros hematológicos

Tabela 9: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie *F. silvestris*.

Variáveis	Unidade	N	Mediana	DP	Mín. – máx.	Valores gato-bravo ^a	Valores ref. gato doméstico ^b
Eritrócitos	10 ¹² /L	2	5.69		4.69 – 6.69	7.85 – 11.41	5.0 – 10.0
Hematócrito	%	3	34.9	12.0	23.92 – 43.1	31 – 46	24.0 – 45.0
Hemoglobina	g/dL	3	16.9	0.9	16.16 – 17.64	9.6 – 14.9	8.0 – 15.0
VCM	fL	2	71.2		64.42 – 78.04	34.7 – 47.7	39.0 – 55.0
HCM	pg	2	29.8		25.23 – 34.46	10.8 – 14.6	12.5 – 17.5
CHCM	g/dL	3	41.7	21.4	39.16 – 73.73	30.0 – 34.9	30.0 – 36.0
Leucócitos	10 ⁹ /L	2	15.4		7.25 – 23.5	9.20 – 26.10	5.5 – 19.5
Neut. seg.	%	4	83.4	12.5	73.00 – 95.00		35 – 75
Bastonetes	%	4	0.0	0.0			0 – 3
Linfócitos	%	4	11.6	9.5	2.00 – 20.51		20 – 55
Eosinófilos	%	4	2.7	4.1	0.50 – 8.50		2 – 12
Monócitos	%	4	1.3	1.7	0.00 – 2.50		1 – 4
Basófilos	%	4	0.0	0.0	0.00 – 0.50		Raros
Neut. seg.	10 ⁹ /L	2	14.4		6.53 – 22.33	3.68 – 14.88	2.5 – 12.5
Bastonetes	10 ⁹ /L	2				0.00 – 0.52	0.0 – 0.3
Linfócitos	10 ⁹ /L	2	0.53		0.47 – 0.58	1.82 – 7.35	1.5 – 7.0
Eosinófilos	10 ⁹ /L	2	0.13		0.12 – 0.15	0.29 – 3.68	0.0 – 1.5
Monócitos	10 ⁹ /L	2	0.29		0.00 – 0.59	0.11 – 0.99	0.0 – 0.9
Basófilos	10 ⁹ /L	2				0	Raros
Rácio N:L		4	6.4	23.2	3.7 – 47.5		

^aIntervalos de valores hematológicos de gatos-bravos (*F. silvestris*) em cativeiro, obtidos por Marco *et al.* (2000).

^bValores de referência do gato doméstico, segundo Jain (1993).

b) Parâmetros bioquímicos

Tabela 10: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros bioquímicos relativos à espécie *F. silvestris*.

Variáveis	Unidade	N	Mediana	DP	Mín. – máx.	Valores gato-bravo ^a	Valores de referência ^b
Ureia	mg/dL	3	143.1	21.8	120.5 – 152.7	15.4 – 57.3	19 – 34
Creatinina	mg/dL	3	1.1	0.4	0.85 – 1.42	0.77 – 1.72	0.9 – 2.2
AST	UI/L	3	63.6	40.6	34.4 – 100	23 – 74.0	7 – 38
ALT	UI/L	3	94.7	9.2	89.2 – 103.6	22.0 – 94.2	25 – 97
CK	UI/L	3	2019.6	888.0	712.6 – 2080.5	58 – 623	69 – 214
Glucose	mg/dL	3	208.8	87.1	174.5 – 301.1	101 – 316	60 – 120
Colesterol	mg/dL	3	147.7	42.6	113.3 – 182.7	43.0 – 193.0	71 – 156
Triglicéridos	mg/dL	3	101.1	23.4	66.2 – 103.5	14.3 – 106.0	27 – 94
BT	mg/dL	3	0.5	0.2	0.44 – 0.83	0 – 0.33	0.0 – 0.1
Sódio	mEq/L	3	154.3	14.1	140 – 161	156 – 172	146 – 156
Potássio	mEq/L	3	4.3	0.5	3.9 – 4.7	4.7 – 5.6	3.7 – 6.1
Cloro	mEq/L	3	114.0	3.7	111 – 117	118.8 – 130.2	115 – 130
Cálcio total	mg/dL	3	9.6	0.4	9.5 – 10.1		8.7 – 11.7
Fósforo	mg/dL	3	6.9	1.8	5.42 – 8.33		3.0 – 6.1
PT	g/dL	3	7.9	1.5	6.4 – 8.7	7.0 – 8.8	6.0 – 7.9
Albumina	g/dL	3	5.0	1.0	3.46 – 5.15	2.12 – 4.27	2.8 – 3.9
Globulina α_1	g/dL	3	0.3	0.2	0.08 – 0.34	0.2 – 0.62	0.3 – 0.9
Globulina α_2	g/dL	3	0.6	0.7	0.11 – 1.24	0.4 – 1.13	0.3 – 0.9
Globulina β	g/dL	3	0.9	0.8	0.44 – 1.65		
Globulina γ	g/dL	3	1.8	0.8	0.63 – 1.92	1.01 – 3.77	1.7 – 2.7
Alb:Glob		3	1.2	0.4	1.18 – 1.75	0.39 – 1.48	

^a Intervalos de valores bioquímicos de gatos-bravos (*F. silvestris*) em cativeiro, obtidos por Marco *et al.* (2000).

^b Valores de referência para gatos domésticos segundo Latimer (2011).

3.4.2. Geneta (*G. genetta*)

Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos da amostra de *G. genetta* serão apresentados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente. Nesta espécie, a dimensão da amostra permitiu a determinação de *intervalos da amostra* com 90% de confiança, obtidos estatisticamente através do Reference Value Advisor 2.1.. Não foram encontrados quaisquer valores hematológicos e/ou bioquímicos documentados nesta espécie, para comparação dos resultados. Não obstante, verificou-se que o valor da mediana obtido para a enzima CK se destaca por ser bastante elevado (3914,6 UI/L).

a) Parâmetros hematológicos

Tabela 11: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie *G. genetta*.

Variáveis	Unidade	N	Med.	DP	Mín. – máx.	Intervalo da amostra
Eritrócitos	10 ¹² /L	10	8.9	2.8	4.16 – 12.76	2.7 – 15.1
Hematócrito	%	10	49.5	6.6	32.90 – 53.69	34.5 – 64.5
Hemoglobina	g/dL	10	14.2	4.2	6.65 – 20.83	4.8 – 23.6
VCM	fL	9	50.0	25.8	41.07 – 118.15	0.0 – 109.4
HCM	Pg	8	15.2	4.2	7.38 – 19.01	5.3 – 25.2
CHCM	g/dL	9	31.9	10.2	13.09 – 42.48	8.3 – 55.4
Leucócitos	10 ⁹ /L	10	7.3	2.7	3.5 – 11.75	1.2 – 13.3
Neut. seg.	%	12	70.0	14.6	48.50 – 86.50	37.9 – 100
Bastonetes	%	12	0.5	0.8	0.00 – 2.50	
Linfócitos	%	12	19.3	10.8	6.00 – 37.00	0.0 – 43.0
Eosinófilos	%	12	8.8	5.8	1.50 – 18.50	0.0 – 21.6
Monócitos	%	12	0.4	1.5	0.00 – 5.00	
Basófilos	%	12	0.0	0.0	0.00 – 0.50	
Neut. seg.	10 ⁹ /L	10	5.1	2.6	2.07 – 10.16	0.0 – 11.0
Bastonetes	10 ⁹ /L	10	0.0	0.1	0.00 – 0.15	0.0 – 0.2
Linfócitos	10 ⁹ /L	10	1.0	0.8	0.56 – 3.23	0.0 – 2.9
Eosinófilos	10 ⁹ /L	10	0.6	0.3	0.15 – 1.06	0.0 – 1.3
Monócitos	10 ⁹ /L	10	0.0	0.2	0.00 – 0.49	0.0 – 0.4
Basófilos	10 ⁹ /L	10	0.0	0.0	0.00 – 0.04	
Rácio N:L		12	3.8	4.7	1.36 – 14.58	0.0 – 14.1

b) Parâmetros bioquímicos

Tabela 12: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros bioquímicos relativos à espécie *G. genetta*.

Variáveis	Unidade	N	Mediana	DP	Mín. – máx.
Ureia	mg/dL	4	65.5	48.7	56.5 – 152.5
Creatinina	mg/dL	4	0.7	0.1	0.66 – 0.83
AST	UI/L	4	230.4	81.8	87.7 – 243
ALT	UI/L	4	149.7	15.7	141.8 – 173
CK	UI/L	4	3914.6	5325.6	528.9 – 10054.4
Glucose	mg/dL	4	103.2	57.3	60.2 – 153.1
Colesterol	mg/dL	3	203.4	16.0	188.4 – 213.8
Triglicéridos	mg/dL	3	8.2	16.5	6.9 – 32.5
BT	mg/dL	4	0.3	0.3	0.16 – 0.89
Sódio	mEq/L	4	152.7	8.7	143 – 161
Potássio	mEq/L	4	5.1	0.6	4.3 – 5.5
Cloro	mEq/L	4	116.6	3.4	114 – 121
Cálcio total	mg/dL	4	9.0	0.5	8.7 – 9.7
Fósforo	mg/dL	4	5.8	1.7	4.35 – 7.29
PT	g/dL	4	7.1	0.8	6.2 – 7.8
Albumina	g/dL	4	3.1	0.4	2.81 – 3.61
Globulina α_1	g/dL	4	0.4	0.1	0.3 – 0.41
Globulina α_2	g/dL	4	1.2	0.2	1 – 1.35
Globulina β	g/dL	4	1.3	0.4	0.84 – 1.68
Globulina γ	g/dL	4	1.1	0.3	0.82 – 1.49
Alb:Glob		4	0.8	0.1	0.69 – 0.95

3.4.3. Sacarrabos (*H. ichneumon*)

Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos da amostra de *H. ichneumon* serão apresentados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. Nesta espécie, a dimensão da amostra ($n > 20$) permitiu o cálculo de *intervalos da amostra* e de intervalos de confiança dos limites inferiores e superiores, obtidos estatisticamente através do Reference Value Advisor 2.1. Os resultados foram comparados com os valores obtidos por Palomares, Delibes e Recio (1992) a partir de uma amostra de 5 sacarrabos de vida livre capturados em caixas-armadilha, no sudoeste de Espanha. Os valores descritos por estes autores servem como um guia comparativo porque as variáveis a que os animais foram sujeitos e a zona geográfica foram semelhantes às do presente estudo. Verificou-se que a maioria dos valores obtidos são muito semelhantes em ambos os estudos, com apenas algumas discrepâncias pouco marcadas.

a) Parâmetros hematológicos

Tabela 13: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie *H. ichneumon*.

Variáveis	Unid.	n	Med.	DP	Mín. – máx.	Intervalo da amostra	IC 90% limite inferior	IC 90% limite superior	Valores de sacarrabos ^d
Eritrócitos	10 ¹² /L	23	8.9	2.0	3.37 – 11.30	4.8 – 12.9	3.3 – 6.4	11.8 – 14.4	7.6 – 9.7
Hematócrito	%	27	42.9	5.6	30.23 – 59.24	31.3 – 54.5	27.4 – 35.4	50.4 – 57.9	37.0 – 47.3
Hemoglobina	g/dL	27	18.0	3.2	8.62 – 21.36	11.4 – 24.5	9.4 – 13.8	22.2 – 26.5	14.1 – 16.1
VCM	fL	23	47.6	20.8	37.20 – 128.64	4.5 – 90.7	0.0 – 29.9	63.8 – 113.0	47.7 – 49.0
HCM	Pg	23	18.9	9.8	13.11 – 59.25	0.0 – 39.1	0.0 – 12.1	25.4 – 50.6	16.6 – 18.8
CHCM	g/dL	27	41.2	7.9	20.23 – 56.45	25.0 – 57.4	20.2 – 30.8	51.1 – 62.7	34.0 – 38.5
Leucócitos	10 ⁹ /L	23	9.8	3.0	4.75 – 16.00	3.6 – 16.0	2.1 – 5.5	14.1 – 17.7	10.0 – 20.5
Neut. seg.	%	27	82.7	9.7	58.00 – 91.00	62.8 – 100	56.7 – 69.3	96.9 – 100	78 – 87
Bastonetes ^a	%	27	0.0	0.0	0.00 – 2.00				
Linfócitos ^b	%	27	16.0	9.4	6.00 – 40.00	6.1 – 47.7	5.0 – 7.9	34.7 – 64.0	10 – 18
Eosinófilos ^a	%	27	0.0	0.0	0.00 – 0.50				
Monócitos ^a	%	27	0.4	1.3	0.00 – 4.00				4 – 7
Basófilos ^a	%	27	0.0	0.0	0.00 – 0.50				
Neut. seg.	10 ⁹ /L	23	7.1	4.1	0.00 – 13.92	0.0 – 15.6	0.0 – 1.3	13.3 – 17.8	
Bastonetes ^a	10 ⁹ /L	23	0.0	0.0	0.00 – 0.15				
Linfócitos ^c	10 ⁹ /L	23	1.1	1.4	0.00 – 5.22	0.0 – 4.1	0.0 – 0.0	3.1 – 5.4	
Eosinófilos ^a	10 ⁹ /L	23	0.0	0.0	0.00 – 0.07				
Monócitos ^a	10 ⁹ /L	23	0.0	0.1	0.00 – 0.52				
Basófilos ^a	10 ⁹ /L	23	0.0	0.0	0.00 – 0.05				
Rácio N:L ^b		27	5.4	3.4	1.48 – 15.00	1.2 – 14.4	0.9 – 1.8	11.5 – 17.8	

^aNão foi possível calcular os *intervalos da amostra* dos parâmetros Neutrófilos em banda, Eosinófilos, Monócitos e Basófilos (quer de valores relativos quer de valores absolutos), porque grande parte dos valores são nulos e, como tal, a distribuição é não normal e não simétrica e o Ref. Val. Adv. não recomenda o cálculo dos *intervalos da amostra*.

^bOs *intervalos da amostra* (e respetivos intervalos de confiança) dos parâmetros Linfócitos (valores relativos) e Rácio N:L foram calculados através do método robusto após transformação Box-Cox dos dados, por apresentarem uma distribuição não simétrica.

^cNão se apresentou o intervalo de confiança do limite inferior do *intervalo da amostra* para os linfócitos (valor absoluto) porque os valores obtidos foram ambos negativos.

^dValores obtidos por Palomares *et al.* (1992).

b) Parâmetros bioquímicos

Tabela 14: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros bioquímicos relativos à espécie *H. ichneumon*.

Variáveis	Unid.	N	Med.	DP	Mín. – máx.	Intervalo da amostra	IC 90% limite inferior	IC 90% limite superior	Valores de sacarrabos ^d
Ureia	mg/dL	20	71.5	21.3	36.7 – 105.5	27.1 – 116.0	15.7 – 42.3	104.4 – 127.2	35 – 71
Creatinina	mg/dL	20	1.0	0.2	0.53 – 1.6	0.5 – 1.5	0.3 – 0.7	1.3 – 1.6	0.6 – 1.0
AST ^a	UI/L	19	149.0	99.2	85.2 – 480.7	82.2 – 441.4			153 – 301
ALT ^a	UI/L	19	99.2	36.9	56.2 – 203.9	53.9 – 210.2			104 – 246
CK	UI/L	20	334.3	1057.4	36.6 – 2993.3	0.0 – 2547.4	0.0 – 0.0	1713.1 – 3476.4	166 – 815
Glucose	mg/dL	20	122.7	34.2	73.1 – 188.2	51.2 – 194.2	34.5 – 75.8	174.0 – 214.8	119 – 259
Colesterol ^b	mg/dL	20	217.0	100.8	128.4 – 402.0	6.0 – 428.0	0.0 – 68.4	335.1 – 483.7	180 – 405
TRIG	mg/dL	20	19.1	25.7	4.7 – 104.4	4.7 – 118.1	3.2 – 7.5	62.4 – 210.2	6 – 42
BT	mg/dL	20	0.4	0.4	0.18 – 1.31	0.0 – 1.1		0.8 – 1.5	0.1 – 0.3
Sódio ^c	mEq/L	20	152.0	4.6	141 – 157	140.6 – 160.5	137.8 – 143.6	157.3 – 163.5	131 – 161
Potássio	mEq/L	20	4.5	0.5	3.8 – 5.8	3.4 – 5.6	3.1 – 3.8	5.2 – 6.0	3.9 – 4.7
Cloro	mEq/L	20	111.7	6.3	104 – 126	98.5 – 124.9	94.3 – 102.2	119.8 – 129.0	
Cálcio T	mg/dL	20	9.8	0.6	8.5 – 11.4	8.5 – 11.1			10 – 11
Fósforo	mg/dL	20	6.4	1.1	5.27 – 8.77	4.0 – 8.8	3.4 – 4.8	7.7 – 9.6	4.8 – 6.5
PT	g/dL	20	8.0	0.8	6.8 – 9.2	6.4 – 9.6	6.1 – 6.9	9.1 – 10.0	7.2 – 8.4
Albumina	g/dL	20	4.0	1.0	1.56 – 5.20	2.0 – 6.1	1.2 – 2.9	5.4 – 6.7	
Glob. α_1	g/dL	20	0.2	0.2	0.12 – 0.74	0.0 – 0.6	0.0 – 0.0	0.4 – 0.7	
Glob. α_2	g/dL	20	0.4	0.4	0.17 – 1.51	0.0 – 1.1	0.0 – 0.1	0.6 – 1.4	
Glob. B	g/dL	20	1.1	0.6	0.26 – 2.52	0.0 – 2.2	0.0 – 0.4	1.7 – 2.6	
Glob. γ	g/dL	20	2.3	0.9	0.64 – 4.09	0.3 – 4.3	0.0 – 0.9	3.6 – 4.8	
Alb:Glob		20	1.0	0.4	0.21 – 1.81	0.1 – 1.9	0.0 – 0.4	1.6 – 2.2	

^aVerificou-se, na base de dados, que o mesmo animal (48EM) apresentava valores extremos das enzimas AST e ALT (identificados como *outliers* pelo método de Tukey no Ref. Val. Adv.). No entanto, o valor de CK desse animal não foi identificado como *outlier*, portanto é pouco provável que o aumento da AST e da ALT tenha sido devido a lesões musculares durante o período de captura. Assumiu-se que este indivíduo possui, provavelmente, uma doença hepática e que não devia pertencer à população de referência para animais saudáveis deste estudo. Os dados foram analisados através do método robusto após transformação Box-Cox, devido ao fato da distribuição não ser normal nem simétrica. Como o número de indivíduos analisados foi menor que 20 (n=19), o Ref. Val. Adv. não determinou os intervalos de confiança dos limites superiores e inferiores do *intervalo da amostra*.

^bOs *intervalos da amostra* obtidos para o Colesterol devem ser utilizados com reserva uma vez que a distribuição é não simétrica e não normal.

^cA estatística do parâmetro Sódio foi efetuada pelo método *standard* por apresentar uma distribuição normal e assimétrica (teste de simetria para o método robusto <0,05).

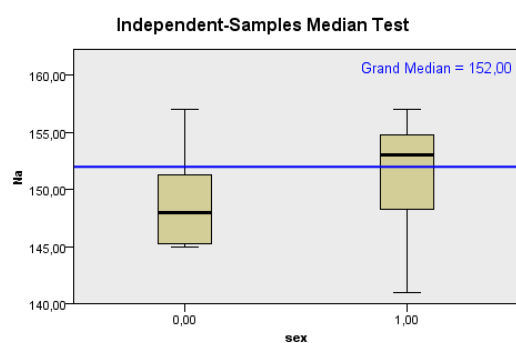
^dValores obtidos por Palomares *et al.* (1992).

c) Influência do sexo nos parâmetros hematológicos e bioquímicos

A variação na concentração dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em função do sexo, na espécie *H. ichneumon*, está representada nas Figuras 12 e 13. Apenas o sódio ($p=0,028$; para $p<0,05$) e o fósforo ($p=0,020$; para $p<0,05$) variaram em função do sexo, sendo que em ambos os casos as fêmeas apresentaram valores significativamente mais elevados que os machos.

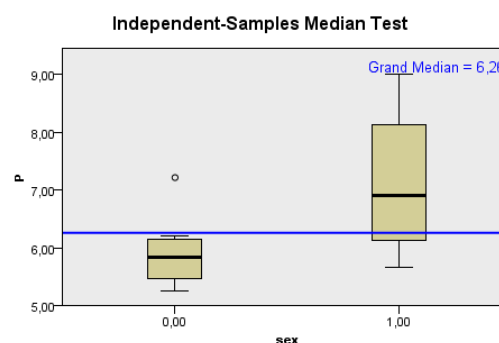
Não foi encontrada qualquer diferença significativa entre grupos de animais de idades diferentes.

Figura 12: Concentração sérica do sódio (Na) em função do sexo (0=machos; 1=fêmeas), na espécie *H. ichneumon*.



Total N	20
Median	152,000
Test Statistic	5,690
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,017
Fisher Exact Sig. (2-sided test)	,028

Figura 13: Concentração sérica do fósforo (P) em função do sexo (0=machos; 1=fêmeas), na espécie *H. ichneumon*.



Total N	20
Median	6,265
Test Statistic	7,500
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,006
Fisher Exact Sig. (2-sided test)	,020

3.4.4. Fuinha (*M. foina*)

Os resultados dos parâmetros hematológicos da espécie *M. foina* serão apresentados na Tabela 15. Os valores hematológicos obtidos foram comparados com intervalos de referência da espécie *Mustela putorius furo* (furão), por pertencer à mesma família – *Mustelidae* – da espécie *M. foina*. Verificou-se uma ligeira diminuição do hematócrito e da hemoglobina, bem como neutrofilia com desvio à esquerda e uma ligeira monocitose.

a) Parâmetros hematológicos

Tabela 15: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie *M. foina*.

Variáveis	Unidade	N	Mediana	DP	Mín. – máx.	Valores de referência ^a
Eritrócitos	10 ¹² /L	2	8.84		7.91 – 9.77	7.4 – 13.0
Hematócrito	%	4	34.6	13.6	22.73 – 50.59	40 – 70
Hemoglobina	g/dL	4	10.6	6.1	4.75 – 15.81	13.9 – 21.9
VCM	fL	2	51.0		38.00 – 63.96	49.6 – 60.6
HCM	Pg	2	17.2		14.37 – 19.99	16.1 – 19.3
CHCM	g/dL	4	28.7	8.5	20.89 – 37.82	28.7 – 33.7
Leucócitos	10 ⁹ /L	3	11.3	1.4	10.25 – 12.50	3.0 – 16.7
Neut. seg.	%	4	81.2	11.9	63.00 – 85.50	17.2 – 81.9
Bastonetes	%	4	1.4	1.1	0.00 – 2.00	0.0 – 1.2
Linfócitos	%	4	11.1	11.4	7.50 – 28.50	12.6 – 80.6
Eosifilos	%	4	0.0		0.00 – 1.00	0.0 – 5.7
Monócitos	%	4	5.5	0.9	4.50 – 6.50	0.0 – 6.5
Basófilos	%	4	0.3	0.6	0.00 – 1.00	0.0 – 1.4
Neut. seg.	10 ⁹ /L	3	8.7	1.1	8.72 – 10.31	0.9 – 7.4
Bastonetes	10 ⁹ /L	3	0.2	0.1	0.00 – 0.23	0.0 – 0.1
Linfócitos	10 ⁹ /L	3	1.2	0.6	0.77 – 1.69	0.6 – 10.5
Eosinófilos	10 ⁹ /L	3	0.0	0.0	0.00 – 0.00	0.0 – 0.7
Monócitos	10 ⁹ /L	3	0.6	0.2	0.46 – 0.81	0.0 – 0.5
Basófilos	10 ⁹ /L	3	0.0	0.0	0.00 – 0.05	0.0 – 0.2
Rácio N:L		4	7.0	4.8	2.25 – 11.67	

^aValores de referência de furões (*Mustela putorius furo*) obtidos por Hein, Spreyer, Sauter-Louis e Hartmann (2012).

b) Parâmetros bioquímicos

Apenas foi possível realizar a análise bioquímica de uma fuinha, cujos resultados se apresentam na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados dos parâmetros bioquímicos na única fuinha (*M. foina*) capturada.

Variáveis	Unidade	Valor
Ureia	mg/dL	58.9
Creatinina	mg/dL	1.01
AST	UI/L	338.5
ALT	UI/L	85.5
CK	UI/L	2383.4
Glucose	mg/dL	37.6
Colesterol	mg/dL	299.2
Triglicéridos	mg/dL	70.6
BT	mg/dL	0.37
Sódio	mEq/L	157
Potássio	mEq/L	8.7
Cloro	mEq/L	118
Cálcio total	mg/dL	9.1
Fósforo	mg/dL	7.05
PT	g/dL	8.6
Albumina	g/dL	4.49
Globulina α_1	g/dL	0.14
Globulina α_2	g/dL	0.86
Globulina β	g/dL	1.48
Globulina γ	g/dL	1.63
Alb:Glob		1.09

3.4.5. Toirão (*M. putorius*)

Os resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie *M. putorius* serão apresentados na tabela 17. Apenas foi possível realizar a contagem diferencial de leucócitos num toirão, cujo perfil leucocitário se apresenta na tabela 18.

a) Parâmetros hematológicos

Tabela 17: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie *M. putorius*.

Variáveis	Unidade	N	Mediana	Mín. – máx.	Valores de referência ^a
Eritrócitos	10 ¹² /L	2	8.3	7.02 – 9.51	7.4 – 13.0
Hematócrito	%	2	45.0	38.75 – 51.22	40 – 70
Hemoglobina	g/dL	2	14.3	14.04 – 14.50	13.9 – 21.9
VCM	fL	2	56.9	40.75 – 72.96	49.6 – 60.6
HCM	pg	2	17.6	15.25 – 20.00	16.1 – 19.3
CHCM	g/dL	2	32.4	27.42 – 37.43	28.7 – 33.7
Leucócitos	10 ⁹ /L	2	9.0	4.00 – 14.00	3.0 – 16.7

^aValores de referência de furões (*Mustela putorius furo*) obtidos por Hein *et al.* (2012).

Tabela 18: Perfil leucocitário do único toirão (*M. putorius*) capturado.

Tipo de leucócito	%	10 ⁹ /L
Neut. Segmentados	84.50	11.83
Neut. Banda	0.00	0.00
Linfócitos	13.50	1.89
Eosinófilos	1.00	0.14
Monócitos	1.50	0.21
Basófilos	0.00	0.00

b) Parâmetros bioquímicos

Não foi possível realizar a análise de parâmetros bioquímicos em nenhum animal desta espécie.

3.4.6. Raposa (*V. vulpes*)

Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos da amostra de *V. vulpes* serão apresentados nas tabelas 19 e 20, respectivamente. Nesta espécie, a dimensão da amostra permitiu o cálculo de *intervalos da amostra*. Os valores obtidos foram comparados com valores de referência obtidos por Mullineaux, Best e Cooper (2003), para a mesma espécie. Na análise dos parâmetros hematológicos, verificou-se uma diminuição na contagem de eritrócitos, um aumento no volume corpuscular médio (VCM), uma ligeira diminuição na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e ainda uma neutrofilia marcada, sem desvio à esquerda. Relativamente aos parâmetros bioquímicos, verificou-se uma elevação em quatro parâmetros (ureia, AST, CK, cloro e proteínas totais).

a) Parâmetros hematológicos

Tabela 19: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros hematológicos relativos à espécie *V. vulpes*.

Variáveis	Unidade	N	Med.	DP	Mín. – máx.	Intervalo da amostra	Valores de referência ^a
Eritrócitos	10 ¹² /L	12	6.8	4.1	1.09 – 11.48	0.0 – 15.7	8.6 – 10.6
Hematócrito	%	15	43.6	13.6	27.68 – 78.22	14.5 – 72.7	36 – 55
Hemoglobina	g/dL	16	13.4	2.1	7.82 – 16.42	9.0 – 17.7	13.4 – 17.8
VCM	fL	10	55.3	145.6	37.11 – 381.28	0.0 – 384.63	34 – 49
HCM	Pg	11	16.1	45.5	9.34 – 129.18	0.0 – 117.4	14 – 18
CHCM	g/dL	14	32.0	8.5	14.81 – 48.09	13.6 – 50.5	33 – 37
Leucócitos	10 ⁹ /L	13	13.3	5.9	3 – 21.75	0.5 – 26.1	3.7 – 7.9
Neut. seg.	%	15	76.6	15.7	37.50 – 97.00	40 – 100	
Bastonetes	%	15	1.0	2.8	0.00 – 8.00		
Linfócitos	%	15	14.1	15.2	1.00 – 53.00	0 – 50	
Eosinófilos	%	15	0.7	2.3	0.00 – 6.00		
Monócitos	%	15	3.1	3.2	0.50 – 10.50	0 – 10	
Basófilos	%	15	0.0	0.0	0.00 – 1.00		
Neut. seg.^b	10 ⁹ /L	11	10.8	5.1	1.13 – 18.14	0.0 – 22.2	1.8 – 4.8
Bastonetes	10 ⁹ /L	11	0.1	0.4	0.00 – 1.33	0.0 – 2.3	
Linfócitos	10 ⁹ /L	11	1.3	2.3	0.13 – 6.67	0.0 – 6.5	0.9 – 2.8
Eosinófilos	10 ⁹ /L	11	0.1	0.3	0.0 – 0.94		0.04 – 1.12
Monócitos	10 ⁹ /L	11	0.2	0.8	0.08 – 1.85	0.0 – 2.0	0.04 – 0.3
Basófilos	10 ⁹ /L	11	0.0	0.0	0.00 – 0.09		<0.06
Rácio N:L		13	6.2	28.6	0.73 – 97.5	0.0 – 68.4	

^aDe acordo com o descrito por Mullineaux *et al.* (2003), para a espécie *V. vulpes*.

^bA dimensão da amostra (11) é inferior à da contagem de leucócitos (13) devido à exclusão de dois esfregaços sanguíneos. Um dos esfregaços (raposa RAM1) não apresentava qualquer leucócito na observação microscópica. Assumiu-se que terá ocorrido um erro técnico, uma vez que o animal apresentava um bom estado geral. O outro esfregaço (raposa 141NS) não foi incluído no estudo devido à grande dificuldade de interpretação celular. Encontraram-se muitas células imaturas (desde mieloblastos, pró-mielócitos, mielócitos e metamielócitos a neutrófilos imaturos), sendo praticamente impossível diferenciá-las entre si e distingui-las de monócitos. Este animal foi capturado numa armadilha Collarum® que não foi corretamente ativada, sendo que o laço de metal prendeu entre as comissuras labiais e o osso occipital. O animal apresentava algumas lesões (lacerações nas comissuras labiais, gengivas e língua e mobilidade no incisivo superior esquerdo), o que terá desencadeado uma resposta de stress e inflamatória muito exuberante a fim de provocar uma neutrofilia com desvio à esquerda deste calibre. Este animal apresentou o valor máximo de CK (53345,3 UI/L) encontrado neste estudo.

b) Parâmetros bioquímicos

Tabela 20: Estatística descritiva dos resultados dos parâmetros bioquímicos relativos à espécie *V. vulpes*.

Variáveis	Unid.	N	Med.	DP	Mín. – máx.	Intervalo da amostra	Valores de referência ^c
Ureia	mg/dL	15	72.7	35.9	38.7 – 135.3	0.0 – 149.7	14.8 – 34.0
Creatinina	mg/dL	15	0.8	0.4	0.53 – 1.93	0.0 – 1.7	0.7 – 1.3
AST ^a	UI/L	15	173.3	1145.3	44.6 – 4317.9	45.3 – 7897.4	24 – 96
ALT	UI/L	15	112.8	173.4	38.6 – 526	0.0 – 484.7	<117
CK	UI/L	15	1612.0	15584.8	271.1 – 53345.3	0.0 – 35038.0	22 – 242
Glucose	mg/dL	15	97.9	35.9	7.5 – 143.4	20.8 – 175.0	87.2 – 160.5
Colesterol	mg/dL	15	190.6	52.6	132.3 – 337.1	77.7 – 303.4	129.3 – 262.2
Triglicéridos	mg/dL	15	33.4	17.4	16.5 – 79.4	0.0 – 70.7	
BT	mg/dL	15	0.8	0.7	0.34 – 2.94	0.0 – 2.2	0.4 – 1
Sódio	mEq/L	15	148.5	6.6	138 – 162	134.4 – 162.6	135 – 151
Potássio	mEq/L	15	4.4	0.7	3.7 – 5.7	2.8 – 5.9	4 – 4.8
Cloro	mEq/L	15	116.5	5.1	108 – 125	105.6 – 127.4	111 – 117
Cálcio total	mg/dL	15	9.7	1.7	4.6 – 10.9	6.0 – 13.4	8 – 10.6
Fósforo	mg/dL	15	6.8	2.0	4.09 – 11.41	2.6 – 11.0	2.5 – 6.9
PT	g/dL	15	6.8	0.8	5.8 – 8.2	5.1 – 8.6	4.7 – 6.5
Albumina	g/dL	15	3.3	0.7	2.19 – 4.47	1.8 – 4.8	2.9 – 3.7
Globulina α_1 ^b	g/dL	15	0.3	0.1	0.05 – 0.35	0.1 – 0.5	
Globulina α_2	g/dL	15	0.7	0.2	0.2 – 1.03	0.2 – 1.2	
Globulina β	g/dL	15	1.2	0.9	0.37 – 2.97	0.0 – 3.3	
Globulina γ ^b	g/dL	15	1.1	0.8	0.37 – 2.7	0.0 – 3.0	
Alb:Glob		15	1.0	0.4	0.53 – 1.64	0.1 – 1.8	

^aValores obtidos através do método robusto após transformação Box-Cox dos dados.

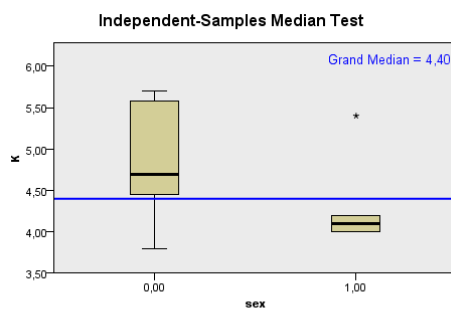
^bValores obtidos através do método *standard*.

^cDe acordo com Mullineaux *et al.* (2003).

c) Influência do sexo e da idade nos parâmetros hematológicos e bioquímicos

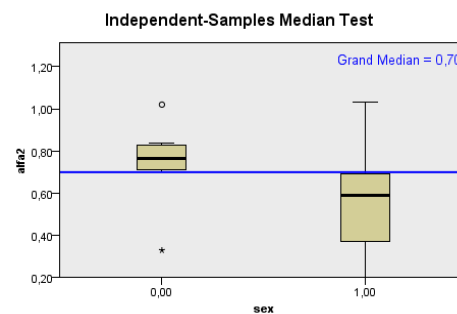
A variação da concentração dos parâmetros hematológicos e bioquímicos analisados na espécie *V. vulpes* está representada em função do sexo nas Figuras 14 e 15 e em função da idade nas Figuras 16 e 17. Verificou-se que os machos apresentaram concentrações séricas de globulina α_2 ($p=0,041$; para $p<0,05$) e potássio ($p=0,041$; para $p<0,05$) significativamente mais elevadas que as fêmeas, nesta espécie. Para além disto, os animais adultos apresentaram valores de hematócrito ($p=0,041$; para $p<0,05$) e de creatinina ($p=0,007$; para $p<0,05$), significativamente mais elevados que os animais juvenis.

Figura 14: Concentração sérica do potássio (K) em função do sexo (0=machos; 1=fêmeas), na espécie *V. vulpes*.



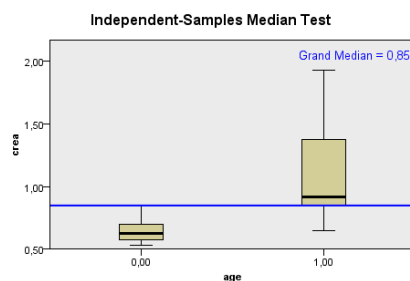
Total N	15
Median	4,400
Test Statistic	5,529
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,019
Fisher Exact Sig. (2-sided test)	,041

Figura 15: Concentração sérica da globulina α_2 em função do sexo (0=machos; 1=fêmeas), na espécie *V. vulpes*.



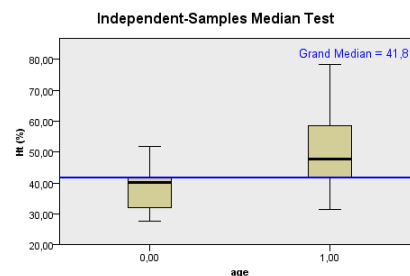
Total N	15
Median	,700
Test Statistic	5,529
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,019
Fisher Exact Sig. (2-sided test)	,041

Figura 16: Concentração sérica de creatinina em função da idade (0=juvenis; 1=adultos), na espécie *V. vulpes*.



Total N	15
Median	,850
Test Statistic	8,750
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,003
Fisher Exact Sig. (2-sided test)	,007

Figura 17: Hematócrito em função da idade (0=juvenis; 1=adultos), na espécie *V. vulpes*.



Total N	15
Median	41,810
Test Statistic	5,529
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,019
Fisher Exact Sig. (2-sided test)	,041

3.4.7. Lesões de captura

Como já foi referido, a captura consiste num momento altamente stressante para o animal, que desencadeia uma série de respostas comportamentais, físicas e fisiológicas. Durante o período de captura, o animal debate-se na tentativa de se libertar, podendo provocar algumas lesões de captura, sobretudo a nível das unhas, almofadass plantares, chanfro e dentes. As espécies que apresentaram mais lesões de captura foram a *G. genetta* (47,6%) e a *V. vulpes* (45,8%), sendo que a maioria dos traumatismos sofridos foram ligeiros, de acordo com a escala de tramatismo definida pelo ISO Technical Committee 191 (ISO 10990-5 1999). Todas as lesões encontradas nas várias espécies estão discriminadas na Tabela 21.

Tabela 21: Número absoluto, frequências relativas, descrição e classificação das lesões de captura encontradas nas espécies capturadas.

	T		Lesões		Descrição das lesões encontradas ^a	Classificação do traumatismo ^b
	n	N	N	%		
<i>F. silvestris</i>	4	1	25		Abrasão cutânea na zona do chanfro (n=1)	Ligeiro
<i>G. genetta</i>	21	10	47.6		Abrasão cutânea na zona do chanfro, com ou sem alopecia (n=7)	Ligeiro
					Erosão das almofadas plantares ou dígitos (n=2)	Ligeiro
					Fratura dentária permanente (n=1)	Moderado
					Laceração superficial do lábio (n=1)	Ligeiro
<i>H. ichneumon</i>	34	11	32.4		Fratura dentária permanente (n=6)	Moderado
					Erosão ou laceração das almofadas plantares e/ou dígitos (n=5)	Ligeiro
					Abrasão cutânea na zona no chanfro (n=3)	Ligeiro
<i>M. foina</i>	7	0	0			
<i>M. putorius</i>	3	0	0			
<i>V. vulpes</i>	24	11	45.8		Erosão ou laceração das almofadas plantares (n=6)	Ligeiro
					Fratura dentária permanente (n=5)	Moderado
					Laceração dos lábios ou comissuras labiais (n=2)	Ligeiro
					Escoriações na região cervical (n=1)	Ligeiro
					Laceração das gengivas e língua (n=1)	Moderado

^aMuitos animais apresentavam várias tipos de lesões de captura concomitantes.

^bDe acordo com a escala de traumatismo definida pelo ISO Technical Committee 191 (ISO 10990-5 1999), adaptado de Harris *et al.* (2006).

3.4.8. Hemoparasitas

a) Gato-bravo (*F. silvestris*), fuinha (*M. foina*) e toirão (*M. putorius*)

Nestas espécies não foram encontrados quaisquer parasitas sanguíneos.

b) Geneta (*G. genetta*)

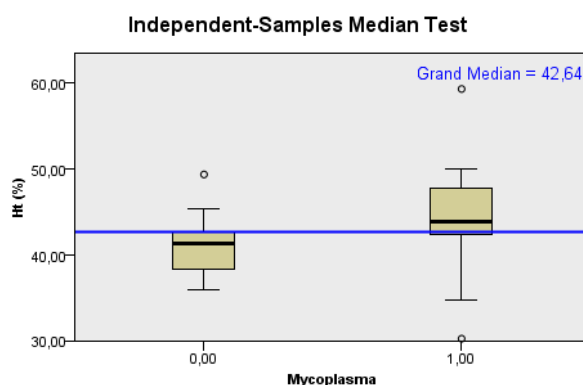
Dos 12 esfregaços sanguíneos analisados, 6 (50%) apresentaram infecção por *Mycoplasma*.

Nos restantes 6 esfregaços não foram encontrados quaisquer parasitas sanguíneos.

c) Sacarrabos (*H. ichneumon*)

Dos 28 esfregaços observados, 16 (57,1%) apresentaram infecção por *Mycoplasma*, enquanto nos restantes 12 (42,9%) não foi encontrada a presença de qualquer parasita. Verificou-se estatisticamente que a infecção por *Mycoplasma* afeta o hematócrito nesta espécie (Figura 18).

Figura 18: Hematócrito em função da infecção por *Mycoplasma* (0=sem evidência de infecção; 1=infecção por *Mycoplasma* spp.) na espécie *H. ichneumon*.



Total N	27
Median	42,640
Test Statistic	6,677
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,010
Fisher Exact Sig. (2-sided test)	,018

d) Raposa (*V. vulpes*)

Foram analisados 17 esfregaços sanguíneos pertencentes à espécie *V. vulpes*. Verificou-se uma elevada prevalência de *Mycoplasma* (64,7%), sendo que 52,9% das raposas apresentaram uma infecção exclusivamente por *Mycoplasma* e duas raposas (11,8%) apresentaram uma co-infecção por *Mycoplasma* e *Hepatozoon*. Do total de raposas analisadas, 5,9% apresentava exclusivamente uma infecção por *Hepatozoon*.

Não foi possível encontrar nenhum tipo de parasita sanguíneo em cinco (29,4%) das raposas analisadas (Figura 19). Na Figura 20 pode observar-se um exemplar de *Mycoplasma* e na Figura 21 encontram-se dois exemplares de *Hepatozoon*. Verificou-se que a infecção por *Mycoplasma* influencia a concentração sérica de glicose, nesta espécie (Figura 22).

Figura 19: Representação gráfica das prevalências de infecções com hemoparasitas encontradas na espécie *V. vulpes*, em percentagem.

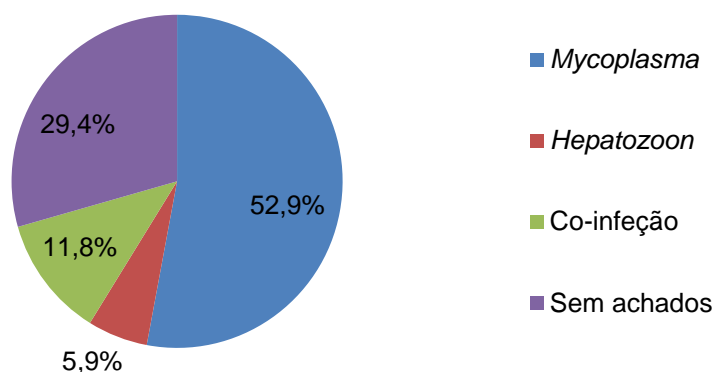


Figura 20: *Mycoplasma* (seta preta) em sangue periférico de sacarrabos (*H. ichneumon*), observado ao microscópio óptico com a objetiva de imersão (ampliação de 1000x) (fotografia original).

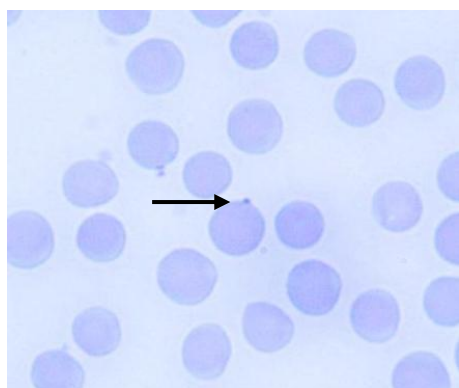


Figura 21: *Hepatozoon* (2 exemplares, setas pretas) em sangue periférico de raposa (*V. vulpes*), observado ao microscópio óptico com a objetiva de imersão (ampliação de 1000x) (fotografia original).

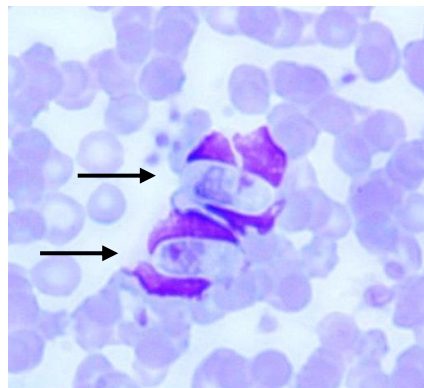
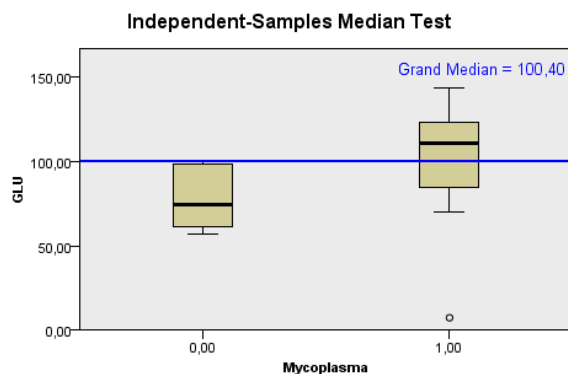


Figura 22: Concentração sérica de glicose (GLU) em função da infecção por *Mycoplasma* (0=sem evidência de infecção; 1=com infecção por *Mycoplasma*), na espécie *V.vulpes*.

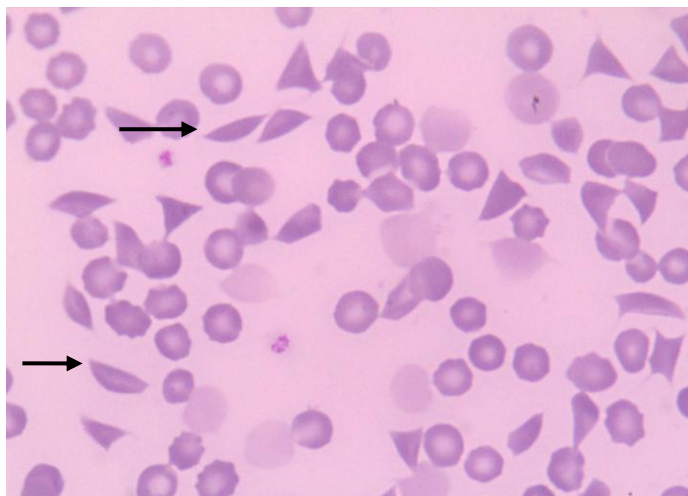


Total N	15
Median	100,400
Test Statistic	6,562
Degrees of Freedom	1
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,010
Fisher Exact Sig. (2-sided test)	,026

3.4.9. Eritrócitos falciformes na espécie *G. genetta*

A percentagem de eritrócitos falciformes encontrada nos 4 esfregaços de sangue periférico analisados foi de 36,6%. Na Figura 23 podem observar-se muitos eritrócitos falciformes, que se distinguem facilmente dos eritrócitos morfologicamente normais.

Figura 23: Eritrócitos falciformes (setas pretas) num esfregaço de sangue periférico da espécie *G. genetta*, observado na objetiva de imersão (ampliação de 1000x) (fotografia original).



3.5. Discussão

3.5.1. Parâmetros hematológicos

a) Contagem total de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina

No geral, os resultados destes parâmetros não se distanciam muito dos limites descritos por outros autores para as mesmas espécies ou para espécies filogeneticamente próximas (Palomares *et al.*, 1992; Jain, 1993; Marco *et al.*, 2000; Mulineaux *et al.*, 2003; Hein *et al.*, 2012). No gato-bravo e no sacarrabos, a concentração de hemoglobina encontrada é ligeiramente mais elevada que o descrito por Marco *et al.* (2000) e Palomares *et al.* (1992), respetivamente. Smith & Rongstad (1980) consideram que a hemoglobina pode ser um indicador da nutrição a longo prazo. Segundo Rovira *et al.* (2008) os parâmetros eritrocitários (contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito) aumentam após um período de atividade física intensa, devido à conjugação de dois fatores: contração esplénica e hemoconcentração secundária à desidratação. Marks (2010) também concluiu que a exaustão física e a desidratação que ocorrem durante o período de captura são suficientes para provocar o aumento do hematócrito.

Na raposa, a contagem de eritrócitos encontrou-se abaixo do limite descrito por Mullineaux *et al.* (2003). Nesta espécie, os animais adultos apresentaram um valor de hematócrito significativamente mais elevado que os animais juvenis, o que está de acordo com os resultados obtidos por Smith & Rongstad (1980), em coiotes (*Canis latrans*). Este autores consideram que as diferenças encontradas entre as duas faixas etárias refletem as diferenças nutricionais entre juvenis e adultos. Poder-se-ia também supor que a resposta fisiológica de stress é mais marcada em raposas adultas que em juvenis, uma vez que o stress de captura pode contribuir para o aumento do hematócrito (por provocar contração esplénica e desidratação) (Smith & Rongstad, 1980; Rovira *et al.*, 2008; Marks, 2010).

As pequenas discrepâncias encontradas na comparação com estudos anteriores (Palomares *et al.*, 1992; Jain, 1993; Marco *et al.*, 2000; Mulineaux *et al.*, 2003; Hein *et al.*, 2012) sugerem que estes parâmetros (contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina) foram pouco afetados pelos fatores stressantes a que o animal esteve sujeito durante o processo de captura e manipulação. De fato, é mais provável que as diferenças encontradas se devam à margem de erro que ocorre inevitavelmente nas técnicas hematológicas utilizadas.

Apesar da determinação do hematócrito ser uma das técnicas hematológicas mais precisas, podem ocorrer alguns erros relacionados com leituras incorretas (que podem ocorrer, por exemplo, quando o sangue não é devidamente remisturado antes do enchimento do tubo

capilar ou quando a leitura se faz acima do *buffy coat*), com altas concentrações de EDTA (que provoca a retração dos eritrócitos – diminuindo o hematócrito – e altera a morfologia celular) ou com imprecisões na centrifugação (Torrance, 2000; Voigt, 2000; Willard, Tvedten & Turnwald, 2000; Villiers, 2005).

O método manual de contagem celular no hematocítmetro implica um erro estatístico de 10 a 20% (Torrance, 2000; Voigt, 2000; Stockham & Scott, 2008; Latimer, 2011). Os erros inerentes à técnica incluem: diluições incorretas, homogeneização incompleta (do sangue com a solução de Natt & Herrick's), presença de sangue na ponta da pipeta, enchimento inadequado da câmara de Neubauer, luminosidade não ajustada e dificuldade em focar as células que não assentaram no plano (Voigt, 2000). Ao longo do período total do presente estudo, esta técnica foi realizada por vários operadores, o que também acresce alguma variabilidade ao método. O ponto mais crítico identificado *a posteriori* foi a homogeneização da solução de Natt & Herrick's com o sangue antes do enchimento da câmara (passo fundamental quando as contagens não eram feitas imediatamente após a diluição), procedimento que nem sempre foi efetuado corretamente, por falhas do operador. Por todos os motivos enumerados, a técnica de contagem manual é considerada pouco precisa e de valor limitado (Stockham & Scott, 2008; Latimer, 2011) e, como tal, é necessário fazer uma análise cuidada dos resultados obtidos. Não obstante, esta técnica torna-se necessária em muitas espécies silvestres, uma vez que os equipamentos de leitura automática estão desenhados sobretudo para a análise das espécies domésticas.

b) Índices eritrocitários (VCM, HCM e CHCM)

Estes índices encontraram-se bastante alterados em todas as espécies quando comparados com valores relatados na literatura, com exceção da fuinha. Uma vez que o cálculo destes índices foi efetuado manualmente, as suas alterações refletem a variação nos parâmetros a partir dos quais foram calculados.

No caso do gato-bravo, os três índices encontraram-se acima do descrito quer por Jain (1993), quer por Marco *et al.* (2000). Na raposa, o volume corpuscular médio (VCM) encontrou-se apenas ligeiramente acima do descrito por Mullineaux *et al.* (2003). O VCM varia diretamente em função do hematócrito e inversamente em função da contagem de eritrócitos. O fato da contagem de eritrócitos ter sido baixa nesta espécie explica os resultados obtidos.

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) é o índice eritrocitário mais preciso porque o seu cálculo não requer a contagem de eritrócitos (Latimer, 2011), o que é particularmente importante nos casos em que essa contagem é obtida através de métodos pouco sensíveis. A CHCM encontrou-se ligeiramente elevada no gato-bravo e no sacarrabos, o que reflete a concentração de hemoglobina elevada nessas espécies. Este

índice também se pode encontrar falsamente elevado quando ocorre hemólise durante ou após a colheita sanguínea, traduzindo uma contagem de eritrócitos ou um hematócrito erroneamente baixos. As principais causas para esta alteração incluem uma sucção excessiva na agulha, uma agitação excessiva do sangue no tubo e um armazenamento prolongado e/ou a altas temperaturas (Villiers, 2005).

c) Contagem total de leucócitos e leucograma

As contagens totais de leucócitos enquadraram-se dentro dos intervalos descritos por outros autores, exceto nas espécies sacarrabos e raposa. No sacarrabos, o número total de leucócitos obtido foi ligeiramente inferior ao descrito por Palomares *et al.* (1992). Pelo contrário, na raposa o número obtido foi bastante superior ao descrito por Mullineaux *et al.* (2003). White, Kreeger, Seal e Tester (1991) concluíram que raposas (*V. vulpes*) capturadas apresentavam uma maior contagem leucocitária, com neutrofilia e linfopénia significativas, em comparação com o grupo controlo (raposas não capturadas), tal como havia sido confirmado pelos mesmos autores num estudo anterior (Kreeger *et al.*, 1990b). Noutros estudos efetuados em canídeos domésticos e silvestres verificou-se também neutrofilia e linfocitose perante situações stressantes (Bergeron *et al.*, 2002; Marks, 2010). Em texugos (*Meles meles*), a contagem de neutrófilos é considerada um indicador de bem-estar animal (Montes, McLaren, MacDonald & Mian, 2004).

Esta leucocitose com neutrofilia, encontrada na maioria das espécies aqui estudadas traduz muito provavelmente a resposta fisiológica dos animais aos fatores stressantes a que estiveram sujeitos. Nestas circunstâncias, a leucocitose é mediada essencialmente pela ação de catecolaminas (nomeadamente a epinefrina) e de corticosteróides (Jain, 1993). A libertação de epinefrina provoca uma leucocitose rápida e transitória (que normalmente dura menos que 30 minutos), caracterizada por neutrofilia e/ou linfocitose. Ao contrário do que acontece com as catecolaminas, a libertação de corticosteróides pelo córtex da adrenal provoca uma resposta demorada, que se manifesta algumas horas após o início do estímulo stressante (que neste caso é a captura) através do típico leucograma de stress (neutrofilia, linfopénia e eosinopénia) (Jain, 1993). Como tal, a neutrofilia existente no momento da colheita sanguínea pode refletir a ativação do sistema hipotalâmico-hipofisário-adrenocortical que se inicia com a captura, a estimulação do sistema simpático-adrenomedular que ocorre nos picos de maior stress para o animal ou, muito provavelmente, ambas (Kreeger *et al.*, 1990b).

Rovira *et al.* (2008) verificaram ainda que se desenvolve uma leucocitose fisiológica em resposta ao exercício físico em cães devido a uma mobilização de leucócitos do *pool* marginal para a circulação devido à ação de catecolaminas.

Ao analisar o leucograma das várias espécies, a característica mais predominante e comum foi a neutrofilia madura, encontrada no gato-bravo, na fuinha e na raposa, o que pode indicar um padrão leucocitário inflamatório e/ou de stress (Torrance, 2000).

No gato-bravo verificou-se também linfopénia. Na fuinha verificou-se neutrofilia com desvio à esquerda, linfopénia e ligeira monocitose, o que pode corresponder a um padrão inflamatório (Torrance, 2000), apesar de não ser ter encontrado nenhuma lesão de captura nesta espécie.

A característica mais marcante do leucograma da raposa foi a neutrofilia madura massiva, o que se deve provavelmente à conjugação de dois fatores: stress de captura e inflamação resultante das lesões de captura (Torrance, 2000). Esta espécie, a par da geneta, foi a que manifestou um comportamento mais agitado perante a presença humana. Foi também nestas duas espécies que se verificou a maior percentagem de animais com lesões de captura (47,6% na geneta e 45,8% na raposa), como se pode ver na Tabela 20. A maioria das genetas apresentou abrasões cutâneas na zona do chanfro com ou sem alopecia, enquanto nas raposas as lesões mais comuns foram a fratura dentária permanente juntamente com a laceração ou escoriação das almofadas plantares, dos lábios e/ou do pescoço. Estas lesões podem ter desencadeado uma resposta inflamatória (para além da resposta fisiológica ao stress), suscetível de adulterar muitos dos parâmetros fisiológicos aqui analisados.

É de salientar que o leucograma obtido a partir da observação de esfregaços sanguíneos está sujeito a alguma margem de erro, como qualquer técnica manual. Geralmente, os principais problemas prendem-se com a má qualidade da coloração e com dificuldades na interpretação celular (Cowell, Tyler & Meinkoth, 1999; Voigt, 2000). O EDTA preserva a morfologia celular em amostras refrigeradas até 4 horas, sendo que as alterações celulares aumentam com o passar do tempo (Cowell *et al.*, 1999; Voigt, 2000). Infelizmente, os esfregaços sanguíneos não foram realizados imediatamente após a colheita sanguínea, o que pode ter implicado alguma perda de qualidade nos detalhes celulares. Apesar das suas limitações (nomeadamente a subjetividade inerente, que diminui com a prática), esta técnica continua a ser uma ferramenta valiosa e insubstituível na análise hematológica, sobretudo em espécies silvestres.

d) Rácio neutrófilos:linfócitos

Davis *et al.* (2008) consideram que a avaliação do perfil leucocitário é uma ferramenta muito útil e prática para veterinários, biólogos e ecologistas na avaliação da resposta de stress em animais vertebrados, nomeadamente em espécies silvestres. Este método representa uma alternativa pouco dispendiosa e prática à clássica medição de níveis plasmáticos de hormonas glucocorticóides, como o cortisol (Davis *et al.*, 2008; Marks, 2010). Uma vez que o

número de neutrófilos e linfócitos variam em sentidos opostos, pode utilizar-se o rácio neutrófilos:linfócitos (rácio N:L), que é diretamente proporcional aos níveis de hormonas glucocorticóides no sangue, para quantificar a resposta fisiológica do animal ao stress (Davis *et al.*, 2008).

Num estudo em humanos, Zahorec (2001) concluiu que a relação entre os neutrófilos e os linfócitos durante o desenvolvimento da resposta inflamatória, expressa no rácio neutrófilo:linfócitos, é um método simples, rápido e fiável para caracterizar a gravidade do stress ou da inflamação sistémica. O autor comprovou que, sob condições fisiológicas, este rácio é menor que 5, ou seja, a percentagem de neutrófilos é menor que 75% e a percentagem de linfócitos é maior que 15%. Em condições patológicas (como na inflamação sistémica), este rácio sobe para valores maiores que 6 (o que traduz a neutrofilia e/ou linfocitose presentes).

Em animais saudáveis, o número de neutrófilos excede, na grande maioria dos casos, o número de leucócitos, ou seja, o rácio N:L é sempre maior que um (Jain, 1993). Em cães este rácio é igual a 3,5 e em gatos é igual a 2 (Villiers, 2005). Marks (2010) obteve um rácio neutrófilos:linfócitos igual a 4 numa amostra de 8 raposas capturadas em caixas-armadilha e concluiu que este rácio é um bom indicador do stress de captura, sobretudo porque parece ser menos afetado pela manipulação e colheita de amostras que os restantes indicadores fisiológicos.

Os rácios obtidos nas espécies de carnívoros silvestres estudadas foram ligeiramente superiores aos valores descritos por Zahorec (2001) e Marks (2010), apesar da comparação interespecífica não ser cientificamente válida. A espécie onde se verificou um rácio mais elevado foi a fuinha. Uma hipótese que se propõe é o fato de metade dos animais desta espécie terem necessitado de reforço anestésico (uma percentagem muito superior às restantes espécies), o que com certeza constituiu um fator adicional de stress, sobretudo devido ao contacto forçado com o homem durante um maior período de tempo.

3.5.2. Parâmetros bioquímicos

a) Ureia e creatinina

Os valores de ureia obtidos foram significativamente mais elevados que os descritos por outros autores, em todas as espécies. As maiores discrepâncias foram encontradas no gato-bravo e na raposa, provavelmente porque os resultados foram comparados com intervalos de referência de animais da mesma espécie mantidos em cativeiro (Marco *et al.*, 2000; Mullineaux *et al.*, 2003; Moen *et al.*, 2010), em que a alimentação é extremamente controlada. Por sua vez, os valores do sacarrabos foram comparados com valores obtidos por Palomares *et al.* (1992) a partir de sacarrabos de vida livre capturados em caixas-

armadilhas (condições semelhantes às do presente estudo), daí a grande proximidade dos resultados.

Os valores elevados de ureia encontrados no gato-bravo e na raposa devem-se provavelmente à sua dieta altamente proteica (Fuller *et al.*, 1985; Marco *et al.*, 2000) ou a qualquer fator que provoque um aumento na taxa de catabolismo de proteína endógena (independentemente da dieta ou função renal), como por exemplo exercício prolongado e vigoroso (Squires, 2005), o que seria de esperar num animal silvestre de vida livre. O fato de se encontrar uma elevação na concentração plasmática de ureia em várias espécies de animais silvestres de vida livre (comparativamente às mesmas espécies em cativeiro), leva a crer que este parâmetro pode ser utilizado como um guia para a ingestão proteica, nas populações de animais silvestres (Seal, Verme, Ozoga & Erickson, 1972). Também a desidratação secundária à privação de água e à atividade física do animal durante o período de captura poderia levar a um aumento da concentração plasmática de ureia (Marks, 2010; Moen *et al.*, 2010).

Comparando os valores de ureia das várias espécies, o gato-bravo destaca-se por apresentar valores bastante elevados. O gato-bravo (a par da geneta) é uma espécie intermédia entre os típicos generalistas (por exemplo a raposa e a fuínha) e os carnívoros especialistas (como o lince-ibérico) (Virgós *et al.*, 1999). Os micromamíferos (sobretudo roedores) são os principais constituintes da sua dieta (Sarmiento, 1996; Virgós *et al.*, 1999; Castro, 2012), o que poderia explicar as altas concentrações de ureia plasmática. Para tirar conclusões mais fundamentadas, seria essencial estudar a dieta destas seis espécies de carnívoros (através de análises fecais, por exemplo) na região geográfica abrangida por este estudo.

A possibilidade de os animais sofrerem de doença renal é pouco provável porque os valores de creatinina de todas as espécies enquadraram-se nos intervalos de referência descritos e porque nenhum dos animais analisados apresentava sinais de mau estado geral característicos de doença renal grave.

O fato de raposas adultas apresentarem concentrações de creatinina sérica mais elevadas em comparação aos juvenis pode ser explicado pela maior atividade física dos adultos na captura, com desenvolvimento de uma eventual rabdomiólise (Latimer, 2011). No entanto, esta hipótese teria que ser suportada por outros dados, nomeadamente diferenças entre grupos de diferentes idades relativamente às enzimas que refletem lesão muscular (sobretudo a CK e a AST), o que não se verificou.

b) Enzimas hepáticas e/ou musculares

As enzimas hepáticas e/ou musculares (AST, ALT e CK) foram as que manifestaram aumentos mais marcados quando comparados com valores documentados na literatura.

Na raposa, a AST encontrou-se bastante acima do descrito por Mullineaux *et al.* (2003). Nas restantes espécies, encontrou-se dentro dos limites descritos.

A ALT encontrou-se apenas ligeiramente aumentada no gato-bravo relativamente ao descrito por Marco *et al.* (2000). Nas restantes espécies encontrou-se dentro dos intervalos descritos.

A CK foi a enzima que manifestou valores mais exuberantes em qualquer uma das espécies estudadas.

O aumento da concentração plasmática das enzimas com origem muscular foi já descrito em várias espécies de animais silvestres como consequência de exercício físico vigoroso, lesões musculares resultantes da captura (como miopatia de captura ou rabdomiólise de exercício) e agitação antes da manipulação, ou seja, estas enzimas são excelentes indicadores de stress físico nestes animais (Fuller *et al.*, 1985; Marco *et al.*, 2000). Kreeger *et al.* (1990b) concluíram que a causa mais provável para a elevação destas enzimas em carnívoros silvestres é uma rabdomiólise de exercício, confirmada pelos achados histopatológicos em raposas capturadas pelos mesmos autores. Bartsch, McConnell, Imes e Schmidt (1977) também concluíram que animais sujeitos a exercício físico intenso apresentavam frequentemente edemas, equimoses, congestões, miosites e hemorragias agudas, o que é suscetível de provocar grandes aumentos na concentração plasmática de CK. Como tal, os aumentos da concentração plasmática da CK deveram-se, muito provavelmente, ao desenvolvimento de uma rabdomiólise de exercício associada à intensa atividade física do animal, bem como a lesões de captura, que ocorreram durante o período da captura, cuja duração foi muito variável. Poder-se-ia pensar que a quantidade de lesões de capturas está diretamente relacionada com o tempo na armadilha. No entanto, Kreeger *et al.* (1990b) verificaram que não há relação entre o tempo na armadilha (2 horas *versus* 8 horas) e os resultados dos parâmetros bioquímicos, o que sugere que as alterações ocorrem nas primeiras 2 horas. No presente estudo, não foi possível determinar o intervalo de tempo entre a captura e a manipulação, devido à falta de meios visuais, o que diminuiu as possibilidades de uma interpretação mais rigorosa destes valores.

Segundo Marks (2010), os valores plasmáticos de CK estão relacionados com o tipo de armadilha, sendo muito mais elevados em armadilhas de laço do que em caixas-armadilha ou em capturas com dardo. White *et al.* (1991) verificaram que raposas capturadas em caixas apresentavam níveis mais baixos de CK e AST em comparação com raposas capturadas em armadilhas de laço de perna. Efetivamente, os valores máximos (38432,5 UI/L e 53345,3 UI/L) de CK encontrados no presente estudo pertencem a duas raposas capturadas em armadilhas Collarum®, sendo que ambas apresentavam lesões de captura. Nestas armadilhas, a raposa mantém o contacto com o solo e pode movimentar-se num raio de cerca de um metro em torno da estaca, o que lhe possibilita uma maior amplitude de

movimentos. Desta forma, o animal está sujeito a esticões e lesões enquanto se debate para se libertar. Nas caixas-armadilha o animal parece ter mais noção dos limites físicos com que se depara, o que se traduz numa menor atividade física (Marks, 2010). Teria sido muito interessante avaliar estatisticamente as respostas fisiológicas da espécie *V. vulpes* em função do tipo de armadilha utilizado (caixas-armadilha ou Collarum®), mas a grande disparidade na dimensão dos grupos não permitiu realizar essa análise.

c) Glucose

Os valores de glucose obtidos encontraram-se dentro dos limites definidos por outros autores para as mesmas espécies silvestres. No entanto, quando comparada com valores de referência do gato doméstico, a concentração plasmática de glucose do gato-bravo encontrou-se bastante elevada, o que pode ser explicado pelo stress de captura. Em gatos domésticos, o stress associado à colheita de sangue (sobretudo se o animal se debater) pode implicar o aumento dos valores de glucose para mais de 300-400 mg/dl (Marco *et al.*, 2000). Esta hiperglicémia fisiológica induzida pelo stress é consequência da libertação de catecolaminas (promotoras da glicogenólise) e da libertação de corticosteróides endógenos (promotores da gluconeogénese) (Latimer, 2011).

Outra hipótese para a ligeira hiperglicémia encontrada nestas espécies é a administração de fármacos. Num estudo efetuado em ratinhos previamente alimentados, os autores verificaram que a administração intramuscular de quetamina e xilazina provocou um aumento na concentração plasmática de glucose numa forma tempo-dependente (Saha, Xia, Grondin, Engle & Jakubowski, 2005). Esta alteração foi também associada a alterações nos níveis plasmáticos das hormonas que regulam a glicémia: os níveis de insulina, ACTH e cortisona/corticosterona diminuíram, enquanto os níveis de glucagon e hormona do crescimento aumentaram. A hiperglicémia resultante da anestesia pode ser, então, consequência duma maior libertação de glucose na corrente sanguínea, secundária a uma maior produção hepática (glicogenólise e gluconeogénese) e/ou duma supressão do consumo de glucose pelos tecidos devido a níveis baixos de insulina. Os autores inferiram ainda que, uma vez que a hiperglicémia foi revertida com a administração de iombina, as alterações nas hormonas reguladores da glicémia são, em grande parte, mediadas pelos recetores α_2 -adrenérgicos.

Uma vez que os fármacos utilizados na contenção química foram a quetamina e a medetomidina (que pertence à família dos agonistas dos recetores α_2 -adrenérgicos, tal como a xilazina), pode concluir-se que os efeitos biológicos terão sido semelhantes aos descritos no estudo referido, o que explicaria, a par do stress da captura e manipulação, a ligeira hiperglicémia encontrada.

d) Lípidos plasmáticos: colesterol e triglicéridos

No geral, as concentrações de lípidos plasmáticos (colesterol e triglicéridos) encontraram-se dentro dos limites definidos. É interessante salientar que as concentrações de triglicéridos encontradas em todas as espécies (com exceção do gato-bravo) foram muito baixas quando comparadas com os valores destes parâmetros definidas por Latimer (2011) para as espécies domésticas (cão e gato). Fatores como o exercício físico, a dieta, a condição corporal e o ciclo reprodutivo afetam a atividade plasmática destes lípidos (Latimer, 2011). Como tal, as diferenças na dieta e na atividade física dum animal silvestre relativamente a um animal doméstico podem explicar a discrepância dos valores.

No gato-bravo verificou-se uma ligeira elevação do valor máximo de triglicéridos acima do limite de referência do gato doméstico. Esta avaliação tem valor limitado porque a amostra de sangue pode ter sido colhida no período de 4 a 6 horas de hipertrigliceridémia pós-prandial (Latimer, 2011).

e) Bilirrubina total

Verificou-se hiperbilirrubinémia no gato-bravo e no sacarrabos. Normalmente, esta alteração está associada a estados patológicos (como doença hepática), mas alguns autores consideram que também pode ser devida a uma hemólise aguda que pode ocorrer em casos de atividade física intensa (Eichner, 1985; Kreeger, Seal, Tester, Callahan & Beckel, 1990a). Em humanos, o exercício físico intenso desencadeia uma resposta inflamatória suscetível de provocar alterações eletrolíticas e aumento da osmolaridade plasmática e viscosidade por desidratação e acidose. A hipoglicémia e a hipertermia resultantes também afetam a resistência osmótica dos eritrócitos. Todas estas alterações bioquímicas levam a um maior grau de lesão eritrocitária e, como tal, a uma maior taxa de hemólise intravascular (Santos-Silva *et al.*, 2001; Robinson, Cristancho & Boning, 2006). Apesar deste efeito não ter sido comprovado em carnívoros silvestres, uma possível explicação para o aumento da concentração de bilirrubina é a exaustão física do animal durante o período de captura.

f) Eletrólitos (sódio, potássio, cloro), cálcio e fósforo

Os valores plasmáticos de eletrólitos enquadraram-se nos intervalos de referência descritos na literatura. Isto deve-se provavelmente ao fato de estes parâmetros serem mantidos no organismo em concentrações muito controladas e, desta forma, variarem pouco em função do stress de captura. O único eletrólito cujo valor se encontrou ligeiramente abaixo dos intervalos definidos por Marco *et al.* (2000) e por Latimer (2011) foi o cloro plasmático, no gato-bravo. No entanto, esta pequena alteração foi desvalorizada devido à grande proximidade dos valores.

Verificaram-se algumas diferenças estatisticamente significativas entre fêmeas e machos. No sacarrabos, a análise da concentração sérica do fósforo e do sódio em função do sexo demonstrou que as fêmeas apresentaram valores significativamente mais elevados de ambas os parâmetros ($p=0,028$ no sódio e $p=0,020$ no fósforo; para $p<0,05$). Uma hipótese plausível para a elevação do sódio nas fêmeas seria a desidratação por privação de água que terá ocorrido nas capturas de maior duração. Relativamente ao fósforo, não foi encontrada nenhuma explicação que pudesse ter significado no contexto deste estudo.

Na raposa, os machos apresentaram valores mais elevados de potássio plasmático ($p=0,041$; para $p<0,05$). Uma hipercaliémia moderada pode ser explicada por atividade muscular intensa, nomeadamente quando ocorre rabiomiólise ou necrose tissular (Latimer, 2011). O fato dos valores plasmáticos de potássio nos machos se encontrarem perto do limite superior do intervalo descrito por Mullineaux *et al.* (2003) pode indicar que os animais do sexo masculino são mais ativos e agressivos durante a captura, o que se reflete numa maior atividade muscular, hipótese que já tinha sido proposta por Smith & Rongstad (1980).

g) Proteínas totais, albumina e globulinas

A elevação das proteínas totais na raposa e da albumina no gato-bravo pode ser atribuível à desidratação que ocorre durante o período de captura (Marks, 2010), que pode resultar da privação de água e/ou da intensa atividade física do animal durante esse período (Marks, 2010; Moen *et al.*, 2010).

Na raposa, verificou-se uma diferença significativa entre grupos de diferente sexo, na análise da globulina α_2 , sendo que os machos apresentaram valores mais elevados ($p=0,041$; para $p<0,05$). Neste grupo incluem-se as proteínas de fase aguda da inflamação, nomeadamente a ceruloplasmina, a haptoglobina e a macroglobulina α_2 (Jain, 1993). Seguindo a linha de pensamento de Smith & Rongstad (1980), os machos podem ter desencadeado uma resposta inflamatória mais marcada ao debaterem-se mais violentamente na armadilha, relativamente às fêmeas. No entanto, tanto os machos como as fêmeas apresentaram lesões de captura semelhantes. Para confirmar esta teoria seria necessária instalar câmaras de vídeo no local da armadilha para registar o comportamento dos animais.

3.5.3. Hemoparasitas

A prevalência de *Hepatozoon* encontrada na amostra de raposas (17,6%) é mais baixa que a descrita por Conceição-Silva *et al.* (1988) (48%). Vários fatores podem explicar as diferentes prevalências encontradas: a amostra obtida por Conceição-Silva *et al.* (1988) foi muito superior à do presente estudo (301), a região geográfica de estudo foi diferente (região centro-oeste) e os autores fizeram a pesquisa do parasita em diversas amostras

biológicas (sangue, medula óssea, baço, fígado e linfonodos). A prevalência encontrada no presente estudo aproxima-se mais da prevalência encontrada por Fishman *et al.* (2004) (24%), que conduziram um estudo em raposas silvestres baseado em testes serológicos e concluíram, tal como Conceição-Silva *et al.* (1988), que esta espécie é provavelmente um reservatório para a infecção de cães domésticos e outros canídeos silvestres. Esta hipótese poderia ser explorada através da comparação da prevalência de *Hepatozoon* em raposas com a prevalência do mesmo parasita em cães domésticos (nomeadamente cães de caçadores) da mesma região geográfica. Os resultados de um estudo desse género desvendariam com certeza muitos aspectos da epidemiologia do *Hepatozoon*, nomeadamente acerca da sua transmissão entre populações silvestres e domésticas.

A elevada prevalência de *Mycoplasma* (64,7%) encontrada na raposa está de acordo com as elevadas prevalências de hemoplasmas encontradas por Novacco *et al.* (2010), em cães domésticos (40%), em Portugal. Não se encontrou nenhum relato na literatura relativo à prevalência ou ocorrência de *Mycoplasma* nas espécies *H. ichneumon* e *G. genetta*. Não foi também encontrada nenhuma explicação plausível para o fato de sacarrabos infetados por *Mycoplasma* apresentarem um hematócrito mais elevado relativamente a sacarrabos aparentemente não infetados; seria de esperar encontrar o oposto uma vez que esta infecção pode provocar anemia. Por este motivo, assumiu-se que a diferença encontrada terá sido devida à reduzida dimensão da amostra e ao fato de os grupos analisados não serem uniformes, possuindo pouca ou nenhuma relevância prática. Uma vez que as prevalências de *Mycoplasma* encontradas no presente estudo foram bastante elevadas, seria extremamente interessante aprofundar este tópico em estudos futuros, por exemplo através da realização de técnicas genéticas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), ou de técnicas serológicas (Whithear, 2001; Willi *et al.*, 2007), para a deteção e identificação das espécies de *Mycoplasma* que infetam estas espécies de carnívoros silvestres. O fato de não se terem encontrado parasitas sanguíneos, nomeadamente hemoplasmas, em esfregaços de sangue periférico nas espécies *F. silvestris* (n=4), *M. foinea* (n=4) e *M. putorius* (n=1) deve-se provavelmente à dimensão muito reduzida das amostras, o que diminuiu a probabilidade de encontrar qualquer parasita. A identificação microscópica do *Mycoplasma* é uma técnica pouco sensível (o que depende em grande parte da experiência do operador) e, para além disto, os hemoplasmas dissociam-se dos eritrócitos e morrem após um período de tempo variável em EDTA, o que dificulta a deteção destes parasitas em amostras de sangue antigas (The Merck Veterinary Manual, 2013b; H. Tvedten, comunicação pessoal, Dezembro 1, 2013).

Atualmente, a crescente interface homens-animais domésticos-animais silvestres (resultante da urbanização, da globalização, das mudanças climáticas, etc.) deu origem a um movimento internacional e multidisciplinar intitulado *One Health*, cujo principal objetivo é

promover a saúde de humanos, de animais e do ambiente (One Health initiative, 2013). Um ponto-chave para o sucesso desta iniciativa é o estudo e a prevenção da transmissão de agentes infecciosos interespecificamente. Do ponto de vista da fauna silvestre, a compreensão da epidemiologia de agentes infecciosos, nomeadamente parasitários, é sem dúvida crucial para avaliar e minimizar o seu impacto nas populações e no ecossistema.

3.5.4. Eritrócitos falciformes na espécie *G. genetta*

Apesar da percentagem de eritrócitos falciformes nesta espécie ser bastante elevada (36,6%), pode verificar-se que os restantes parâmetros hematológicos, nomeadamente o hematócrito, as contagens de eritrócitos e a concentração de hemoglobina, são semelhantes aos obtidos por outros autores para o gato-bravo (Marco *et al.*, 2000) e para o sacarrabos (Palomares *et al.*, 1992), espécies filogeneticamente próximas à *G. genetta*. É de salientar também que todas as genetas apresentavam um bom estado geral na manipulação, o que nos remete para o estudo de Ball *et al.* (1976). Estes autores propuseram duas teorias para o fato de esta alteração não provocar sinais clínicos nas genetas:

- Os eritrócitos falciformes não possuem as propriedades anormais que levam ao reduzido tempo de semi-vida destas células e à tendência para bloquear pequenos vasos sanguíneos (como acontece na doença falciforme humana) ou
- Trata-se na realidade de uma alteração pós-colheita sanguínea (favorecida de alguma forma pela adição de EDTA).

A autora considera que seria importante o estudo mais aprofundado deste fenómeno na espécie *G. genetta*. Uma vez que o EDTA foi apontado por Ball *et al.* (1976) como um fator potenciador ou até causador desta alteração em genetas, seria extremamente interessante conduzir um estudo para analisar o sangue destes animais imediatamente após a colheita e a intervalos regulares, para comparar os efeitos de vários anticoagulantes e a sua ação no tempo. Isto pode trazer não só informações para a compreensão deste mecanismo na espécie *G. genetta*, mas também, em última análise, para uma melhor compreensão da fisiologia deste fenómeno no homem, onde causa a anemia falciforme.

3.5.5. Limitações dos intervalos da amostra definidos nas espécies *G. genetta*, *H. ichneumon* e *V. vulpes*

Como já foi referido, o principal objetivo deste estudo foi determinar valores normais de parâmetros hematológicos e de bioquímicas sanguíneas nas espécies de carnívoros capturadas, aos quais se deu o nome de *intervalos da amostra*. Devido às dimensões das amostras, isto apenas foi possível nas espécies *G. genetta*, *H. ichneumon* e *V. vulpes*. Os intervalos da amostra obtidos têm, no entanto, algumas limitações e não devem ser considerados verdadeiros intervalos de referência pelos seguintes motivos:

- As amostras têm uma dimensão reduzida. Segundo a *American Society for Veterinary Clinical Pathology* (ASVCP), um intervalo de referência deve ser idealmente estabelecido a partir de uma amostra, no mínimo, de 120 indivíduos saudáveis. Quanto menor a dimensão da amostra, maior o grau de incerteza na estimativa do intervalo de referência, porque amostras demasiado pequenas ($n < 10$) não são provavelmente representativas da distribuição de uma variável na população. É por este motivo que a maioria dos intervalos obtidos é bastante largo, refletindo a variação encontrada nos parâmetros analisados. Para além disto, estudos de campo requerem amostras de maiores dimensões do que estudos de laboratório, dado que os investigadores têm menos controlo sobre as condições (bióticas e abióticas) que produzem variação nos resultados (Animal Care and Use Committee, 1998). No entanto, no campo da Medicina veterinária, e sobretudo em estudos com fauna silvestre, é muito difícil obter amostras de grandes dimensões.
- É muito difícil avaliar o estado de saúde de um animal silvestre apenas pela avaliação do seu estado geral. Na análise estatística dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, é praticamente impossível determinar a causa de valores extremos (*outliers*), que tanto pode ser patológica (por exemplo uma infeção) como fisiológica (por exemplo o stress da captura). Por este motivo, não é correto excluir indiscriminadamente *outliers* porque estes valores podem representar a verdadeira distribuição de valores numa população saudável (Geffré *et al.*, 2011), sobretudo tendo em conta que os fatores stressantes a que o animal esteve sujeito introduziram uma grande variedade de respostas físicas, fisiológicas e comportamentais, o que se traduz na grande variabilidade de resultados hematológicos e bioquímicos encontrados (Cattet *et al.*, 2008; Marks, 2010).
- O período de captura foi muito variável. Os valores obtidos provêm, então, de animais que, apesar de aparentemente saudáveis, foram sujeitos a um período variável de stress intenso, não podendo ser comparados com valores de animais cuja captura e manipulação ocorreu num período de tempo conhecido e curto. Teoricamente, o estabelecimento de valores de referência deveria ser calculado a partir de amostras uniformes no que diz respeito ao intervalo captura-colheita sanguínea, para minimizar a variação na dinâmica temporal das concentrações plasmáticas dos parâmetros analisados. Isto é conseguido em estudos que utilizam alarmes associados à ativação da armadilha, o que garante que os operadores manipulam todos os animais capturados num curto espaço de tempo.
- A metodologia utilizada no campo (que é sempre mais ou menos influenciada pelas condições climáticas, pelo número de operadores presente no momento da manipulação, etc.) e as técnicas manuais utilizadas no processamento das amostras

biológicas introduziram algum grau de erro e imprecisão nos resultados, ao contrário do que aconteceria num ambiente mais controlado e com a utilização de técnicas mais sensíveis.

- As características da zona geográfica do estudo (área sudeste de Portugal), como a disponibilidade de recursos alimentares, o clima, a maior ou menor fragmentação do habitat, a presença do Homem, entre outros, influenciaram certamente os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais.

Não obstante, os intervalos obtidos refletem o estado fisiológico dos animais nestas circunstâncias específicas e podem ser extremamente úteis como uma ferramenta guia em estudos futuros com as mesmas espécies e metodologias semelhantes de trabalho.

3.6. Conclusões e perspetivas futuras

Ficou bem claro com a realização deste trabalho que a captura de animais silvestres é um ferramenta valiosa para o estudo e compreensão de populações de vida-livre. As discrepâncias encontradas entre animais de vida-livre e animais de cativeiro demonstraram que o fator stress de captura desempenha um papel crucial nos resultados dos parâmetros fisiológicos analisados, mas levantaram também questões relativas às características biológicas e ecológicas inerentes às populações de vida livre.

Infelizmente, as limitações do presente estudo impediram a avaliação precisa dos parâmetros fisiológicos. Uma vez que a maioria dos parâmetros varia em função do tempo, seria de extrema utilidade implementar, em estudos futuros, a colheita rotineira de informação relativa ao comportamento e atitude do animal (por exemplo através da colocação de câmaras fotográficas com deteção de movimento no local da armadilha) e também controlar a duração exata da captura (por exemplo através da utilização de alarmes acionados pela entrada do animal na armadilha). Este tipo de tecnologia é já utilizada em muitos estudos contemporâneos com espécies silvestres de vida livre e, do ponto de vista da autora, permitem uma excelente interpretação da dinâmica temporal dos parâmetros analisados, nas espécies estudadas e sob estas circunstâncias específicas, salvaguardando não só a fiabilidade dos resultados, mas também o bem-estar animal. No que concerne a esta questão do stress e bem-estar animal, cabe aos investigadores, nomeadamente médicos veterinários e biológicos, estudar e comparar métodos para minimizar o impacto negativo nas espécies silvestres capturadas e promover a uniformização, a nível internacional, de métodos de captura adequados aos padrões de bem-estar animal exigidos, o que, em última análise, possibilita uma comparação mais fiável entre estudos semelhantes. Quando todas estas dificuldades forem minimizadas, ou seja, quanto mais se souber acerca da dinâmica do stress de captura e de como evitá-lo, o estabelecimento de

intervalos de referência de parâmetros fisiológicos em espécies de animais de vida livre terá um valor inestimável. Esta informação, combinada com outros dados biológicos (como a massa corporal e taxas de sobrevivência e reprodutivas), estudos genéticos e epidemiológicos, entre outros, pode ser utilizada para inferir o estado fisiológico de determinada população e para suportar decisões de gestão e manejo de fauna, sobretudo em espécies ameaçadas, o que é cada vez mais premente.

Na Península Ibérica, o conhecimento acerca da maioria dos carnívoros silvestres estudados no presente estudo ainda é extremamente escasso, tendo-se verificado uma lacuna muito grande no que diz respeito a aspetos fisiopatológicos destas espécies. Pretende-se que os resultados do presente estudo sejam um contributo para o conhecimento da fisiologia destas espécies da fauna autóctone portuguesa, mas também um incentivo para que se aprofunde o interesse, divulgação e sensibilização acerca da importância da sua conservação.

4. Bibliografia

Akimau, P., Yoshiya, K., Hosotsubo, H., Takakuwa, T., Tanaka, H. & Sugimoto, H. (2005). New experimental model of crush injury of the hind limbs in rats. *Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care*, 58, 51-58.

Alves, F. (2012). Geneta (*Genetta genetta*): a Trepadora Africana. In F. Loureiro, N.M. Pedroso, M.J. Santos & L.M. Rosalino (eds.), *Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses*. (pp. 167-179). Lisboa: CARNIVORA.

Animal and Care and Use Committee (1998). Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *Journal of Mammalogy*, 79(4), 1416-1431.

Baldwin, J.R., Winstead, J.B., Hayden-Wing, L.D., Kreeger, T.J. & Dzialak, M.R. (2008). Field Sedation of Coyotes, Red Foxes, and Racoons with Medetomidine and Atipamezole. *Journal of Wildlife Management*, 72(5), 1267-1271.

Ball, S., Hawkey, C.M., Hime, J.M., Keymer, I.F. & Brambell, M.R. (1976). Red Cell Sickling in Genets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 54 A, 49-54.

Balmori, A. & Carbonell, R. (2012). Expansion and distribution of the Egyptian mongoose (*Herpestes ichneumon*) in the Iberian Peninsula. *Galemys*, 24, 83-85.

Barabino, G.A., Platt, M.O. & Kaul, D.K. (2010). Sickle Cell Biomechanics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12, 345-367.

Barros, T.S.Q. (2009). *Estatuto e distribuição do sacarrabos (Herpestes ichneumon) em Portugal*. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Biodiversidade e Gestão de Ecossistemas. Aveiro: Departamento de Biologia – Universidade de Aveiro.

Bartsch, R.C., McConnell, E.E., Imes, G.D. & Schmidt, J.M. (1977). A review of exertional rhabdomyolysis in wild and domestic animals and man. *Veterinary Pathology*, 14, 314-324.

Bergeron, R., Scott, S.L., Émond, J., Mercier, F., Cook, N.J. & Schaefer, A.L. (2002). Physiology and behavior of dogs during air transport. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 66, 211-216.

Biró, Z., Lanszki, J., Szemethy, L., Heltai, M. & Randi, E. (2005). Feeding habits of feral domestic cats (*Felis catus*), wild cats (*Felis silvestris*) and their hybrids: trophic niche overlap among cat groups in Hungary. *Journal of Zoology*, 266, 187-196.

Bishop, C.R., Athens, J.W., Boggs, D.R., Warner, H.R., Cartwright, G.E. & Wintrobe, M.M. (1968). XIII. A non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 47(2), 249-260.

Borrvalho, R., Rego, F., Palomares, F. & Hora, A. (1996). The distribution of the Egyptian Mongoose *Herpestes ichneumon* (L.) in Portugal. *Mammal Review*, 26(1), 1-8.

Cabral, M.J. (coord.), Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand de Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, A.I., Rogado, L. & Santos-reis, M. (eds.) (2006). *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. (2ª ed). Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza/Assírio & Alvim.

Carvalho, J.C. & Gomes, P. (2004). Feeding resource partitioning among four sympatric carnivores in the Peneda-Gerês National Park (Portugal). *Journal of Zoology*, 263, 275-283.

Castro, L.R. (2012). Gato-bravo (*Felis silvestris*): o Gato que Prefere o Bosque à Quinta. In F. Loureiro, N.M. Pedroso, M.J. Santos & L.M. Rosalino (eds.), *Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses*. (pp. 193-202). Lisboa: CARNIVORA.

Cattet, M., Boulanger, J., Stenhouse, G., Powell, R.A. & Reynolds-Hogland, M.J. (2008). An evaluation of long-term capture effects in ursids: implications for wildlife welfare and research. *Journal of Mammalogy*, 89(4), 973-990.

Caulkett, N.A. & Arnemo, J.M. (2007). Chemical Immobilization of Free-Ranging Terrestrial Mammals. In W.J. Tranquilli, J.C. Thurmon, K.A. Grimm (Eds.), *Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia* (4th Ed.). (pp. 807-831). Iowa: Blackwell Publishing.

Conceição-Silva, F.M., Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D. & Janz, J.G. (1988). Hepatozoonosis in Foxes from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*, 24(2), 344-347.

Constable, P., Hinchcliff, K., Demma, N., Callahan, M., Dale, B., Fox, K., Adams, L., Wack, R. & Kramer, L. (1998). Serum Biochemistry of Captive and Free-Ranging Gray Wolves (*Canis lupus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29(4), 435-440.

Cowell, R.L., Tyler, R.D., Meinkoth, J.H. (1999). *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*. (2nd ed.). St. Louis: Mosby, Inc.

Davis, A.K., Maney, D.L. & Maerz, J.C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22, 760-772.

Delibes, M., Rodríguez, A. & Ferreras, P. (2000). Action Plan for the conservation of the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) in Europe.

Despacho nº 12697/2008 de 6 de maio. Diário da República, nº 87 – II série. Ministérios do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S. & Spencer, R.L. (1996). Stress-Induced Changes in Blood Leukocyte Distribution. *The Journal of Immunology*, 157(4), 1638-1644.

Dhabhar, F.S. & McEwen, B.S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behaviour and Immunity*, 11, 286-306.

Dhabhar, F.S. (2002). A Hassle a Day May Keep the Doctor Away: Stress and the Augmentation of Immune Function. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 556-564.

Duncan, J. (2005). Laboratory evaluation of lipid disorders. In E. Villiers & L. Blackwood (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (2nd ed.). (pp. 241-247). Gloucester: BSAVA.

Eichner, E.R. (1985). Runner's Macrocytosis: A Clue to Footstrike Hemolysis. Runner's Anemia as a Benefit versus Runner's Hemolysis as a Detriment. *The American Journal of Medicine*, 78, 321-325.

Electron Microscopy Sciences (2013). *Technical Data Sheets. Double Neubauer Ruled Metallized Counting Chamber*. Acedido em Junho 12, 2013, disponível em: <http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63510.aspx>

Erceg-Hurn, D.M. & Mirosevich, V.M. (2008). Modern Robust Statistical Methods. An Easy Way to Maximize the Accuracy and Power of Your Research. *American Psychologist*, 63(7), 591-601.

Eizirik, E. & Murphy, W.J. (2009). Carnivores (Carnivora) in S.B. Hedges & S. Kumar (Eds.), *The Timetree of Life*. (pp. 504-507). New York: Oxford University Press.

Fishman, Z., Gonen, L., Harrus, S., Strauss-Ayali, D., King, R. & Baneth, G. (2004). A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. *Veterinary Parasitology*, 119(1), 21-26. Acedido em 8 de Outubro de 2013.

Fowler, M.E. (1995). *Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals*. (2nd ed.). Iowa: Iowa State University Press.

Fuller, T.K., Kerr, K.D. & Karns, P.D. (1985). Hematology and serum chemistry of bobcats in Northcentral Minnesota. *Journal of Wildlife Diseases*, 21(1), 29-32.

Gabrielli, S., Kumlien, S., Calderini, P., Brozzi, A., Iori, A. & Cancrini, G. (2010). The First Report of *Hepatozoon canis* Identified in *Vulpes vulpes* and Ticks from Italy. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 10(9), 855-859.

García, I., Napp, S., Zorrilla, I., Vargas, A., Pastor, J., Muñoz, A. & Martínez, F. (2008). Determination of serum biochemical reference intervals for the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *The Veterinary Journal*, 183, 201-204.

Gaubert, P., Machordom, A., Morales, A., López-Bao, J.V., Veron, G., Amin, M., Barros, T., Basuony, M., Djagoun, C.A.M.S., San, E.D.L., Fonseca, C., Geffen, E., Orkurt, S.O., Craud, C., Couloux, A. & Palomares, F. (2011). Comparative phylogeography of two African carnivores presumably introduced into Europe: disentangling natural versus human-mediated dispersal across the Strait of Gibraltar. *Journal of Biogeography*, 38, 341-358.

Geffré, A., Concordet, D., Braun, J. & Trumel, C. (2011). Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Veterinary Clinical Pathology*, 40, 107-112.

Gregory, N.G. (2004). *Physiology and behavior of animal suffering*. Oxford: Blackwell Publishing.

Grilo, C., Bissonette, J.A. & Santos-Reis, M. (2009). Spatial-temporal patterns in Mediterranean carnivore road casualties: Consequences for mitigation. *Biological Conservation*, 142, 301-313.

Hall, E.J. & German, A.J. (2005). Laboratory evaluation of hepatic disease. In E. Villiers & L. Blackwood (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (2nd ed.). (pp. 184-206). Gloucester: BSAVA.

Harris, S., Soulsbury, C. & Iossa, G. (2006). A scientific review on proposed humane trapping standards in Europe. The ISO standards and the European Commission proposal for a proposed Directive on humane trapping standards.

Hein, J., Spreyer, F., Sauter-Louis, C. & Hartmann, K. (2012). Reference ranges for laboratory parameters in ferrets. *Veterinary Record*, 171(9).

Iossa, G., Soulsbury, C.D. & Harris, S. (2007). Mammal trapping: a review of animal welfare standards of killing and restraining traps. *Animal welfare*, 16, 335-352

Jain, N.C. (1993). *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger.

Jalanka, H.H. & Roeken, B.O. (1990). The use of Medetomidine, Medetomidine-Ketamine Combinations, and Atipamezole in Nondomestic Animals: A Review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 21 (3), 259-282.

Kästner, S.B.R. (2007). Intravenous anaesthetics. In C. Seymour & T. Duke-Novakovski. (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Anaesthesia and Analgesia*. (2nd ed.). (pp. 133-149). Gloucester: BSAVA.

Klein, L.V. & Klide, A.M. (1989). Central α_2 Adrenergic and Benzodiazepine Agonists and their Antagonists. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 20(2), 138-153.

Knottenbelt, C. (2005). Laboratory evaluation of hyperglycaemia and hypoglycaemia. In E. Villiers & L. Blackwood (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (2nd ed.). (pp.248-259). Gloucester: BSAVA.

Kreeger, T.J., Seal, U.S., Tester, J.R., Callahan, M. & Beckel, M. (1990a). Physiological Responses of Red Foxes (*Vulpes vulpes*) to Surgery. *Journal of Wildlife Diseases*, 26(2), 219-224.

Kreeger, T.J., White, P.J., Seal, U.S. & Tester, J.R. (1990b). Pathological Responses of Red Foxes to Foothold Traps. *The Journal of Wildlife Management*, 54(1), 147-160.

Lappin, M.R. (2003). Infectious diseases. In R.W. Nelson & C.G. Couto, *Small Animal Internal Medicine* (3rd ed.). (pp. 1229-1321). St. Louis, Missouri: Mosby.

Latimer, K.S., (2011). *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology*. (5th ed.). West Sussex: Wiley-Blackwell.

Lema, O.E., Carter, J.Y., Arube, P.A., Munafu, C.G., Wangai, M.W. & Rees, P.H. (1994). Evaluation of the alkaline haematin D-575 method for haemoglobin estimation in east Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 72(6), 937-941.

Lemke, K.A. (2007). Anticholinergics and Sedatives. In W.J. Tranquilli, J.C. Thurmon, K.A. Grimm (Eds.), *Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia* (4th Ed.). Iowa: Blackwell Publishing.

Liga para a Proteção da Natureza (2013). Programa Lince. Acedido em Junho 1, 2013, disponível em:

<http://www.lpn.pt/Homepage/O-que-fazemos/Programas/Programa-Lince/Content.aspx?tabid=2454&code=pt#onde>

Lodé, T. (1997). Trophic status and feeding habits of the European Polecat *Mustela putorius* L. 1758. *Mammal Review*, 27(4), 177-184.

López-Martín, J.M. (2006). Comparison of feeding behavior between stone marten and common genet: living in coexistence. In M. Santos-Reis, J.D.S. Birks, E.C. O'Doherty &

G. Proulx (eds.) *Martes in carnivores communities*. (pp. 137-155). Alberta: Alpha Wildlife Publications.

Loureiro, F. (2012). Raposa (*Vulpes vulpes*): a Matreira das Fábulas. In F. Loureiro, N.M. Pedroso, M.J. Santos & L.M. Rosalino (eds.), *Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses*. (pp. 167-179). Lisboa: CARNIVORA.

Loureiro, F., Pedroso, N.M., Santos, M.J. & Rosalino, L.M. (eds.) (2012). *Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses*. Lisboa: CARNIVORA.

Majláthová, V., Hurníková, Z., Majláth, I. & Peiko, B. (2007). *Hepatozoon canis* Infection in Slovakia: Imported or Autochthonous?. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), 199-202.

Marks, C.A. (2010). Haematological and biochemical responses of red foxes (*Vulpes vulpes*) to different capture methods and shooting. *Animal welfare*, 19, 223-234.

Marco, I., Martinez, F., Pastor, J. & Lavin, S. (2000). Hematologic and Serum Chemistry values of the Captive European Wildcat. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(6), 445-449.

Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Parra, M.D. & Cerón, J.J. (2001). Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *Anales de Veterinaria*, 17, 97-114.

McCue, P.M. & O'Farrell, T.P. (1987). Hematologic values of the Endangered San Joaquin Kit Fox, *Vulpes macrotis mutica*. *Journal of Wildlife Diseases*, 23(1), 144-151.

McGrotty, Y. & Tennant, K. (2005). Disorders of plasma proteins. In E. Villiers & L. Blackwood (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (2nd ed.). (pp. 99-112). Gloucester: BSAVA.

McLaren, G.W., Thornton, P.D., Newman, C., Buesching, C.D., Baker, S.E., Mathews, F. & MacDonald, D.W. (2005). High rectal temperature indicates an increased risk of unexpected recovery in anaesthetized badgers. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 32, 48-52.

Mercer, S.H., Jones, L.P., Rappole, J.H., Twedt, D., Laack, L.L. & Craig, T.M. (1988). *Hepatozoon* sp. in Wild Carnivores in Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, 24 (3), 574-576.

Messick, J.B. (2004). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), 2-13.

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 Principles and Implications for Animal Welfare*. (pp. 1-22). Oxon: CABI Publishing.

Moen, R., Rasmussen, J.M., Burdett, C.L. & Pelican, K.M. (2010). Hematology, serum chemistry, and body mass of free-ranging and captive Canada Lynx in Minnesota. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(1), 13-22.

Montes, I., McLaren, G.W., MacDonald, D.W. & Mian, R. (2004). The effect of transport stress on neutrophil activation in wild badgers (*Meles meles*). *Animal Welfare*, 13(3), 355-359.

Morgan, K.N. & Tromborg, C.T. (2007). Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, 102, 262-302.

Mullineaux, E., Best, D. & Cooper, J.E. (eds.) (2003). *BSAVA Manual of Wildlife Casualties*. Gloucester: BSAVA.

Muñoz-Igualada, J., Shivik, J.A., Domínguez, F.G., Lara, J. & González, L.M. (2008). Evaluation of cage-traps and cable restraint devices to captures red foxes in Spain. *The Journal of Wildlife Management*, 72(3), 830-836.

Murrell, J.C. (2007). Premedication and sedation. In C. Seymour & T. Duke-Novakovski. (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Anaesthesia and Analgesia*. (2nd ed.). (pp. 120-132). Gloucester: BSAVA.

Novacco, M., Meli, M.L., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M.G., Lombardo, G., Lloret, A., Santos, L., Carrapiço, T., Willi, B., Wolf, G., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2010). Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Veterinary Microbiology*, 142(3-4), 276-284. Acedido em 8 de Outubro de 2013.

Olby, N. (2005). Laboratory evaluation of muscle disorders. In E. Villiers & L. Blackwood (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (2nd ed.). (pp. 364-372). Gloucester: BSAVA.

Oliveira, R., Godinho, R., Randi, E. & Alves, P.C. (2008a). Hibridization versus conservation: are domestic cats threatening the genetic integrity of wildcats (*Felis silvestris silvestris*) in Iberian Peninsula?. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 363, 2953-2961.

Oliveira, R., Godinho, R., Randi, E., Ferrand, N. & Alves, P.C. (2008b). Molecular analysis of hibridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conservation Genetics*, 9, 1-11.

One Health initiative (2013). *Mission statement*. Acedido em Dez. 2, 2013, disponível em:

<http://www.onehealthinitiative.com/mission.php>

Palomares, F., Delibes, M. & Recio, F. (1992). Hematology and Serum Biochemistry of the Egyptian Mongoose, *Herpestes ichneumon*. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(4), 659-661.

Pedroso, N.M. & Loureiro, F. (2012). Lince-ibérico (*Lynx pardinus*): o esquivo felino. In F. Loureiro, N.M. Pedroso, M.J. Santos & L.M. Rosalino (eds.), *Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses*. (pp. 203-218). Lisboa: CARNIVORA.

Pertoldi, C., Breyne, P., Cabria, M.T., Halfmaerten, D., Jansman, H.A.H., Berge, K.V.D., Madsen, A.B. & Loeschcke, V. (2006). Genetic structure of the European polecat (*Mustela putorius*) and its implication for conservation strategies. *Journal of Zoology*, 270, 102-115.

Pierpaoli, M., Birò, Z.S., Herrmann, M., Hupe, K., Fernandes, M., Ragni, B., Szemethy, L. & Randi, E. (2003). Genetic distinction of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Europe, and hybridization with domestic cats in Hungary. *Molecular Ecology*, 12, 2585-2598.

Pires, J.P.E. (2001). *Ecologia alimentar da raposa [Vulpes vulpes (Linnaeus 1758)] no Parque Natural da Serra da Estrela*. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada. Porto: Faculdade de Ciências – Universidade do Porto.

Potvin, C. & Roff, D.A. (1993). Distribution-Free and Robust Statistical Methods: Viable Alternatives to Parametric Statistics. *Ecology*, 74(6), 1617-1628.

Powel, R.A. & Proulx, G. (2003). Trapping and Marking Terrestrial Mammals for Research: Integrating Ethics, Performance Criteria, Techniques, and Common Sense. *Ilar Journal*, 44(4), 259-276.

Projecto LIFE Habitat Lince Abutre (2013). *O projecto. Resumo*. Acedido em Março 1, 2013, disponível em:

<http://habitatlinceabutre.lpn.pt/Homepage/O-Projecto/Resumo/List.aspx?tabid=2392&code=pt>

Robinson, Y., Cristancho, E. & Boning, D. (2006). Intravascular Hemolysis and Mean Red Blood Cell Age in Athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 38(3), 480-483.

Rosalino, L.M. & Chambel, I. (2012). Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*): o Emigrante Africano. In F. Loureiro, N.M. Pedroso, M.J. Santos & L.M. Rosalino (eds.), *Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses*. (pp. 181-191). Lisboa: CARNIVORA.

Rovira, S., Munoz, A. & Benito, M. (2008). Effect of exercise on physiological, blood and endocrine parameters in search and rescue-trained dogs. *Veterinarni Medicina*, 53 (6), 333-346.

Saha, J.K., Xia, J., Grondin, J.M., Engle, S.K. & Jakubowski, J.A. (2005). Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. *Experimental Biology and Medicine*, 230, 777 - 784

Santos, M.J., Pinto, B.M. & Santos-Reis, M. (2007). Trophic niche partitioning between two native and two exotic carnivores in SW Portugal. *Web Ecology*, 7, 53-62.

Santos, M.J. (2012). Toirão ou Furão (*Mustela putorius*): Eis a Questão. In F. Loureiro, N.M. Pedroso, M.J. Santos & L.M. Rosalino (eds.), *Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses*. (pp. 193-202). Lisboa: CARNIVORA.

Santos, M.J. & Matos, H.M. (2012). Fuinha (*Martes foina*): a Nossa Vizinha. In F. Loureiro, N.M. Pedroso, M.J. Santos & L.M. Rosalino (eds.), *Um Olhar sobre os Carnívoros Portugueses*. (pp. 109-119). Lisboa: CARNIVORA.

Santos-Silva, A., Rebelo, M.I., Castro, E.M.B., Belo, L., Guerra, A., Rego, C. & Quintanilha, A. (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clinica Chimica Acta*, 306, 119-126.

Sarmento, P. (1996). Feeding ecology of the European wildcat *Felis silvestris* in Portugal. *Acta Theriologica*, 41(4), 409-414.

Seal, U.S., Verme, L.J., Ozoga, J.J. & Erickson, A.W. (1972). Nutricional Effects on Thyroid Activity and Blood of White-Tailed Deer. *The Journal of Wildlife Management*, 36(4), 1041-1052.

- Seiffge, D. (1983). Haemorheological Studies of the Sickle Cell Phenomenon in European Red Deer (*Cervus elaphus*). *Blut*, 47, 85-92.
- Shah, V.B., Shah, B.S. & Puranik, G.V. (2011). Evaluation of non cyanide methods for hemoglobin estimation. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 54(4), 764-768.
- Simpson, C.F. & Taylor, W.J. (1974). Ultrastructure of Sickled Deer Erythrocytes. *Blood*, 43(6), 899-906.
- Shivik, J.A., Martin, D.J., Pipas, M.J., Turnan, J. & DeLiberto, T.J. (2005). Initial comparison: jaws, cables, and cage-traps to capture coyotes. *Wildlife Society Bulletin*, 33(4), 1375-1383
- Skelly, B. & Mellanby, R. (2005). Electrolyte imbalances. In E. Villiers & L. Blackwood (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (2nd ed.). (pp. 113-134). Gloucester: BSAVA.
- Smith, G.J. & Rongstad, O.J. (1980). Serologic and hematologic values of wild coyotes in Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases*, 16(4), 491-497.
- Squires, R.A. (2005). Laboratory evaluation of renal disorders. In E. Villiers & L. Blackwood (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (2nd ed.). (pp. 169-183). Gloucester: BSAVA.
- Stockham, S.L. & Scott, M.A. (2008). *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. (2nd ed.). Iowa: Balckwell Publishing.
- Taylor, W.J. & Easley, C.W. (1974). Sickling Phenomena of Deer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 241, 594-604.
- The Merck Veterinary Manual (2013a). *Blood Parasits of Dogs: Hepatozoonosis*. Acedido em Set. 8, 2013, disponível em:
http://www.merckmanuals.com/pethealth/dog_disorders_and_diseases/blood_disorders_of_dogs/blood_parasites_of_dogs.html
- The Merck Veterinary Manual (2013b). *Hemotropic Mycoplasmas (Hemoplasmas)*. Acedido em Set. 8, 2013, disponível em:
http://www.merckmanuals.com/vet/circulatory_system/blood_parasites/hemotropic_mycoplasmas.html#v3257737
- Torrance, A. (2000). Overview of Haematological Diagnostic Techniques. In M.J. Day, A. Mackin & J.D. Littlewood (eds.). *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. (pp. 4-17). Gloucester: BSAVA.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M. & Jennings, F.W. (1996). *Veterinary Parasitology*. (2nd ed). UK: Blackwell Publishing.
- Villiers, E. (2005). Introduction to haematology. In E. Villiers & L. Blackwood (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*. (2nd ed.). (pp. 23-32). Gloucester: BSAVA.
- Virgós, E., Llorente, M. & Cortés, Y. (1999). Geographical variation in genet (*Genetta genetta* L.) diet: a literature review. *Mammal Review*, 29(2), 117-126.

Voigt, G.L. (2000). *Hematology techniques and concepts for veterinary technicians*. Iowa: Blackwell Publishing.

White, P.J., Kreeger, T.J., Seal, U.S. & Tester, J.R. (1991). Pathological Responses of Red Foxes to Capture in Box Traps. *The Journal of Wildlife Management*, 55(1), 75-80.

Whithear, K. (2001) Diseases due do Micoplasmas. In S. Williams & I.K. Barker (eds.). *Infectious Diseases of Wild Mammals*. (3rd ed.) London: Manson Publishing.

Willi, B., Filoni, C., Catão-Dias, J.L., Cattori, V., Meli, M.L., Vargas, A., Martínez, F., Roelke, M.E., Ryser-Degiorgis, M., Leutenegger, C.M., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R. (2007). Worldwide Occurrence of Feline Hemoplasma Infections in Wild Felid Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1159-1166.

Wikelski, M. & Cooke, S.J. (2006). Conservation physiology. *Trends in Ecology and Evolution*, 21(2), 38-46.

Zahorec, R. (2001). Ratio of neutrophil to lymphocyte counts – rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratislavské Lekárske Listy*, 102(1), 5-14.