



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

O USO DE MÉTODOS CONTRACEPTIVOS EM ESPÉCIES CRITICAMENTE
AMEAÇADAS: O CASO DO LINCE-IBÉRICO

Joana Redondo Bolacha

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

ORIENTADOR

Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

VOGAIS:

Doutor Luís Lavadinho Telo da Gama

Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

CO-ORIENTADOR

Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa

2015

LISBOA



Leibniz Institute for Zoo
and Wildlife Research

IN THE FORSCHUNGSVERBUND BERLIN E.V.





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

O USO DE MÉTODOS CONTRACEPTIVOS EM ESPÉCIES CRITICAMENTE
AMEAÇADAS: O CASO DO LINCE-IBÉRICO

Joana Redondo Bolacha

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

ORIENTADOR

Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

VOGAIS:

Doutor Luís Lavadinho Telo da Gama

Mestre Rodrigo Calado da Cunha Serra

CO-ORIENTADOR

Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa

2015

LISBOA

*Aos que me apoiaram e me ajudaram a alcançar o meu sonho,
de um dia, ser Veterinária.*

Agradecimentos

Ao ICNF, ao Programa de conservação ex-situ do lince ibérico e ao Dr. Rodrigo Serra por me darem a oportunidade de efectuar o estágio no CNRLI e por me cederem os dados para a realização deste trabalho. Em especial, ao meu orientador, Dr. Rodrigo Serra, desde que me aceitou como estagiária até a este dia. Pelo seu ensinamento sobre os lince e também sobre a vida. A toda a equipa do CNRLI (Rodrigo Serra, Lara Ferreira, Nuno Gonçalves, Alexandre Azevedo, Andreia Grancho, Verónica Madeira, Joana Pechém, Nereida Sanchez, Jan Valkenburg, Vanessa Requeijão, Tiago Costa e Miguel Moreira) por tudo o que me ajudaram, me ensinaram e comigo viveram neste processo todo. À Lara por todo o carinho. À Joana por toda a amizade. À Vanessa pela ajuda na escrita e imagens fotográficas. Ao Tiago e ao Miguel, pela amizade e pelo vosso amor pelos bichos que me contagiou. Ao Nuno e ao Alexandre por toda a paciência nas mil e uma perguntas que vos fiz e na enorme ajuda que me deram ao longo de todo o processo de estágio e de escrita da dissertação. Aos voluntários e videovigilantes do CNRLI (Beatriz Alves, Mickael Fjaere, Andreia, Verónica, Maike Demski, Alexandra Branco, Thomas Smith, Ricardo Grave, Claudia Gomez e Cátia Ramos) pelo seu tempo no seguimento do “meu” Gamma. À Bia, a minha companheira de casa e de vida para sempre. À Maike e à Xana pelos bons momentos, pelo carinho e pela amizade. Aos lince pela sua beldade e pelo que me ensinaram a simplesmente serem.

À equipa do IZW pela disponibilidade na realização da quantificação de testosterona sanguínea do estudo. E em especial à Johanna Painer, pela sua disponibilidade. À equipa do MNCN, pela disponibilidade na realização da electroejaculação do animal de estudo e na cedência dos dados para realizar este trabalho. Em especial, ao Dr. Eduardo Roldan pela sua simpatia e pelo seu ensinamento e disponibilidade ao longo do trabalho.

Aos professores da FMV-UL por tudo o que me ensinaram ao longo destes anos. Em especial, à minha co-orientadora, Doutora Ilda Rosa, por me ter apresentado ao comportamento animal, pela sua ajuda essencial nesta última fase, pelos constantes incentivos e telefonemas de apoio e reconforto. Ao Professor Néstor Chagas, pela sua amizade e apoio, por todo o ensinamento e paciência, por ser um excelente professor. Ao Professor Telmo, por ser uma ajuda preciosa num período de desespero. À Professora Graça Dias, pela sua enorme simpatia. Ao Professor George Stilwell, por ser um ótimo professor e pelo seu livro, Veterinários e outros animais, que me fez ter certeza de querer ser Médica Veterinária. À Professora Luísa Mateus e ao Professor Luís Costa por me obrigarem a saber reprodução e pela sua disponibilidade. À

Professora Maria Gabriela Veloso, pelo apoio que me deu. Ao Professor Nuno Félix, por ter um dom de ensinar, dando às aulas outra magia. À Professora Rodeia, pela disponibilidade.

Ao Jardim Zoológico de Lisboa, onde fiz voluntariado, ficando mais certa que junto dos animais é que sou feliz e, onde “conheci” o lince-ibérico. Ao Dr. Rui Bernardino, Médico Veterinário dessa instituição, pelo que me ensinou e pela oportunidade que me deu, que me abriu portas a um mundo novo e a muitos contactos na área.

Ao Dr. Fowler e à Dra. Jan Rammer, grandes Médicos Veterinários. Pelas suas palavras de apoio relativamente a tentar trabalhar com animais selvagens: “não desistas!”

Aos amigos que fiz na faculdade, em especial às trifolianas, Ana Filipe, Joana Tabanez e Marta Elias pelo vosso apoio, amizade e por todos os momentos. À turma B, Carolina Merino, Alexandra Castela, Daniela Matias, Diogo Guerra, Ana Afonso e Diogo Santos por tudo. À VETuna. Aos doutores e auxiliares do hospital escolar da FMV-UL, por tudo o que me ensinaram, especialmente ao Dr. Gonçalo Vicente. Aos restantes amigos da faculdade, em especial, Ana Margarida Alho, Joana Meneses e Rui Seixas.

Às minhas mosqueteiras, Patrícia Espada, Flávia Morgado e Ema Torrado, por me ajudarem a crescer e a fazer de mim parte da mulher que sou.

À minha família.

À minha mãe, ao meu irmão e à Lurdes pela paciência de não reproduzirem um som sequer, enquanto eu estudava. À minha mãe porque sem ela nada disto seria possível, pela força e amor que todos os dias me dá, por nunca me deixar desistir e pela pessoa que me fez ser. Pelo amor que me deu aos bichos com todas as visitas a locais prováveis de os encontrar e pelo que sempre me encorajou a continuar a amá-los. Ao meu irmão, o meu companheiro desde meninice. Pelo que me ensinou desde pequena, a como estudar, a como pensar por mim própria e pelo amor de irmão. Ao meu pai que me ensinou a acreditar em mim e na mulher que sou, pelo amor que sempre me anima. Aos meus avós, Diná e José Bolacha e à minha Tia Edite, que me ensinaram a gostar de ler. Por todos os anos de paciência, amor e dedicação e por estarem sempre disponíveis para me levar a qualquer lado. Aos meus avós, Maria do Carmo e Carlos Redondo, por todo o amor e por tudo o que me ensinaram a ser. À minha Tia Ana Mafalda pela amizade. À Lurdes, por tudo, conversas, amor e por estar sempre comigo. Ao Gordo, a minha fiel companhia.

Ao João, o rapaz que entrou na minha vida para ficar. Por tudo o que me fizeste ser, por teres acreditado em mim quando eu não acreditei, por todos os momentos de desespero que suportaste comigo e pela força que me deste em todos eles. Por tudo o que me ensinaste e

fizeste por mim. Por fazeres que eu queira todos os dias ser uma pessoa melhor e pelo teu amor.

Resumo

O uso de métodos contraceptivos em espécies criticamente ameaçadas: O caso do lince-ibérico

O lince-ibérico, *Lynx pardinus*, espécie “criticamente em perigo”, foi alvo de vários projectos de conservação, em Portugal e em Espanha. Nestes dois países, foram construídos centros de reprodução (incluindo o CNRLI - Silves), locais onde os animais permanecem em cativeiro e, onde facilmente, pode ocorrer uma sobrepopulação. O controlo das populações pode ser alcançado utilizando métodos contraceptivos, como os análogos de GnRH, que se mostraram eficazes em várias espécies de carnívoros selvagens e domésticos. Com o intuito de perceber se o análogo de GnRH, Deslorelina em implante (Suprelorin® 4,7 mg) era eficaz no lince-ibérico e de saber as alterações que nele provocava, foi aplicado num macho desta espécie. Foram avaliados o seu apetite, o seu comportamento (continuamente, oportunisticamente e por *scan*) e a sua reprodução (exame físico geral e dos genitais externos, análise de sémen e quantificação de testosterona sanguínea). A actividade física do animal diminuiu, a realização de marcações manteve-se, as espículas penianas e o volume (e peso) testicular diminuíram. A redução das espículas é um bom indicador da eficácia do tratamento, reflectindo a inibição na produção de testosterona. Relativamente às restantes alterações, não se pode dizer que foram resultantes unicamente da acção do contraceptivo e portanto não foi possível retirar conclusões definitivas do presente trabalho. Para além disso, o estudo incidiu apenas num indivíduo e foi a primeira vez que foi utilizado um contraceptivo nesta espécie, não havendo, por isso, termo de comparação. São necessários mais estudos sobre este método de contracepção na espécie referida, para se poder concluir sobre a sua eficácia.

Palavras-chave: Lince-ibérico, contraceptivos, GnRH, Deslorelina, comportamento, reprodução.

Abstract

The usage of contraceptive methods in critically endangered species: The Iberian-lynx

The critically endangered species Iberian lynx, *Lynx pardinus*, has been the target of several conservation programs in Portugal and Spain. Both countries had reproduction centers built (CNRLI – Silves included) where animals remain in captivity and where overpopulation can easily occur. Population control can be achieved through contraceptive methods, for example through the usage of GnRH analogs that have shown great effectiveness on several wild and domestic carnivore species. To understand if the GnRH analogue Deslorelin on an implant (Suprelorin® 4,7 mg) was in fact effective, it was tested on an Iberian Lynx male in order to find out what type of alteration it would produce.

The following characteristics were assessed: appetite; behavior (continuously, opportunistically and through scan); and reproduction (general physical exam and of external genitals, semen analysis and blood testosterone quantification) of said animal. The animals' physical activity diminished, markings maintained, the penile spikes; testicular weight and volume also decreased. The spikes reduction is a good indicator of treatment efficiency because it expresses the inhibition of testosterone production. It cannot be accurately determined if the remaining variations were due solely to the contraceptives' action, therefore no definite conclusions could be attained. Furthermore, this study focused only on one individual and it was the first time a contraceptive was used in this species, so there's no grounds on which to compare.

Further studies on this method of contraception in this species are needed, in order to accurately draw conclusions on its effectiveness.

Keywords: Iberian lynx, contraceptives, GnRH, Deslorelin, behavior, reproduction.

Índice

I. Relatório de actividades de estágio	1
1. Introdução	1
2. Funções na equipa de etologia	1
2.1 Vigilância e detecção de alterações de bem-estar	1
2.2 Vigilância e detecção precoce de riscos	1
2.3 Monitorização e registo de dados comportamentais	1
2.4 Apoio ao maneio	4
3. Acompanhamento da equipa veterinária	4
3.1 Segurança alimentar e HACCP (<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i> - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)	4
3.2 Exames reprodutivos	4
3.3 Acompanhamento das crias	5
3.4 Casos clínicos	6
II. Estudo piloto de contraceção reversível em machos de lince-ibérico	8
1. Introdução	8
1.1 O lince-ibérico	8
1.2 Endocrinologia reprodutiva	16
1.3 Controlo de populações	17
1.4 Contraceção	19
1.5 Comportamento	35
2. Objectivos	36
2.1 Objectivo do estudo	36
2.2 Razões para a aplicação de um contraceptivo num lince-ibérico	36
2.3 Razões para a aplicação num macho	37
3. Material e Métodos	38
3.1 Sujeito em estudo	38
3.2 Método contraceptivo	39
3.3 Procedimento para colocação do contraceptivo	40

3.4 Procedimento para re-avaliação do animal depois da colocação do contraceptivo	41
3.5 Métodos de avaliação dos efeitos do contraceptivo	42
3.6 Análise estatística	49
4. Resultados	49
4.1 Ingestão de comida e apetite do sujeito em estudo	49
4.2 Comportamento	50
4.3 Reprodução	59
5. Discussão	62
5.1 Ingestão de comida e apetite do sujeito em estudo	62
5.2 Comportamento	62
5.3 Reprodução	66
6. Conclusões e estudos futuros	68
7. Bibliografia	70
8. Anexos	77
Anexo I. Informações e historial clínico do sujeito em estudo	77
Anexo II. Resumo das características do medicamento	78
Anexo III. Informações acerca dos cercados do CNRLI	80
Anexo IV. Definições do etograma	83
Anexo V. Ficha de interações	88
Anexo VI. Escala de classificação da condição corporal (CC) do lince-ibérico	89
Anexo VII. Dados recolhidos nas sessões de observação contínua do sujeito em estudo	91
Anexo VIII. Dados recolhidos da ficha de interações do casal de estudo	97

Índice de figuras

Figura 1 - Exemplar de lince-ibérico nas instalações do CNRLI.	9
Figura 2 - Sujeito em estudo (Gamma) nas instalações do CNRLI.	39
Figura 3 - Cronograma do estudo	39
Figura 4 – Preparação para colocação do implante: (1) realização de tricotomia, (2) realização de desinfecção, (3) zona preparada para colocação do implante.	40
Figura 5 – (1) Implante de Suprelorin®, (2) colocação do implante.	41
Figura 6 – Após a colocação do implante: (1) zona onde foi colocado o implante, (2) realização de desinfecção, (3) aplicação de cola de tecidos moles.	41
Figura 7 – Anestesia de 2012 - Realização de medições testiculares: (1) com craveira, (2) com ecógrafo; (3) Avaliação da aparência das espículas penianas.	46
Figura 8 – Anestesia de 2013 - Realização de medições testiculares: (1) com craveira, (2) com ecógrafo; (3) Avaliação da aparência das espículas penianas.	47
Figura 9 – Electroejaculação: (1) material utilizado, (2) recolha de sémen	47
Figura 10 - Esquema da planta dos cercados do CNRLI.	81
Figura 11 - Esquema da área de um cercado.	82
Figura 12 - Esquema representativo dos postes dos telheiros, de manejo grande e manejo pequeno, enumerando-os.	82
Figura 13 – Exemplo de ficha de interações entre indivíduos	88
Figura 14 – Classificação 1 na escala de CC - Caquexia	90
Figura 15 – Classificação 2 na escala de CC – Delgado	90
Figura 16 – Classificação 3 na escala de CC – Ideal	90
Figura 17 – Classificação 4 na escala de CC – Sobrepeso	91
Figura 18 – Classificação 5 na escala de CC - Obeso	91

Índice de tabelas

Tabela 1 – Duração total, em minutos, do tempo observado para o animal no estado activo, inactivo e fora de vista, por mês de estudo.....	51
Tabela 2 - Frequência relativa, em percentagem, da actividade do sujeito e dos outros machos por mês de estudo.	56

Tabela 3 - Frequência relativa, em percentagem, de inactividade, fora de vista, sem câmara e soma de fora de vista (fv), sem câmara (sc) e não identificado (ni) (fv + sc+ ni), do sujeito e dos outros machos por mês do estudo.	57
Tabela 4 – Número de marcações realizadas pelo sujeito e pelos outros machos por mês de estudo.....	57
Tabela 5 – Número de marcações com urina realizadas pelo sujeito e pelos outros machos por mês de estudo.	58
Tabela 6 - Número de episódios de interacção expressos pelo animal que a inicia e pelo tipo de contacto. Número total de episódios de interacção iniciados por cada indivíduo e pelo tipo de contacto.....	58
Tabela 7 - Medições testiculares do sujeito, no ano de 2012 e no ano de 2013.....	60
Tabela 8 - Volume e peso testiculares do sujeito, no ano de 2012 e no ano de 2013.	60
Tabela 9 – Duração em minutos, total e média, dos estados de actividade (activo, inactivo e fora de vista) do sujeito em estudo por sessão/dia de observação.....	91
Tabela 10 – Número de marcações (com urina, com patas, com corpo e total) realizadas pelo sujeito em estudo e respectivo número de sessões em que o comportamento foi observado...	93
Tabela 11 – Número de marcações (com urina, com patas, com corpo e total) realizadas pelo sujeito em estudo e a sessão/dia de observação respectiva/o.	93
Tabela 12 - Duração do tempo despendido, pelo sujeito em estudo, na realização de marcações (com urina, com patas, com corpo e total), por cada sessão/dia de observação, em que foi observado o comportamento.	94
Tabela 13 - Número de marcações com urina realizadas pelo sujeito, por local do cercado e localização específica/elemento de enriquecimento ambiental.	95
Tabela 14 - Número de marcações com patas realizadas pelo sujeito, por local do cercado e localização específica/elemento de enriquecimento ambiental.	96
Tabela 15 – Número do cercado onde o animal permaneceu e localizações disponíveis, por dias de observação.....	96
Tabela 16 – Localizações disponíveis e respectivo número de sessões realizadas.	96
Tabela 17 - Número de interacções (positivas, neutras, negativas e total) por dia de observação.....	97

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Frequência relativa, em percentagem, dos diferentes comportamentos de actividade realizados pelo sujeito em estudo.....	50
Gráfico 2 – Duração total, em minutos, do tempo observado do animal em actividade por sessão/dia de observação.	52
Gráfico 3 - Duração total do tempo, em segundos, despendido pelo sujeito em estudo na realização do comportamento de marcação, por sessão/dia de observação.	53
Gráfico 4 - Duração total, em segundos, do tempo despendido pelo sujeito em estudo na realização de marcação com urina e com patas, por sessão/dia de observação.....	53
Gráfico 5 - Duração total, em segundos, do tempo despendido pelo sujeito em estudo na realização do comportamento de marcação por mês de estudo.....	55
Gráfico 6 - Duração total, em segundos, do tempo despendido pelo sujeito em estudo na realização do comportamento de marcação com urina, por mês de estudo.....	55
Gráfico 7 – Número de interações do casal em estudo.	59

Lista de abreviaturas e símbolos

°	grau
° C	grau Celsius
%	percentagem
π	pi
μg	micrograma
ABP	proteína transportadora de androgénios
AZA	<i>Association of Zoos and Aquariums</i>
C	Campeio
CC	condição corporal
CCLI	<i>Centro de Cría de Lince Ibérico "La Olivilla"</i>
ci	corredor de intercomunicação
cm	centímetro
cm^3	centímetro cúbico

CNRLI	Centro Nacional de Reprodução do Lince-Ibérico
MNCN	<i>Museo Nacional de Ciencias Naturales</i>
ep	edifício parideira
FSH	Hormona folículo-estimulante
fv	fora de vista
GnRH	Gonadoliberina
ha	hectare
HACCP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
ICNF	Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas
ICSH	Hormona estimulante das células intersticiais
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
IZW	<i>Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research</i>
kg	quilograma
km ²	quilómetro quadrado
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona libertadora da hormona luteinizante
m	metro
m ²	metro quadrado
MA	Acetato de megestrol
MDP	Acetato de medroxiprogesterona
mg	miligrama
Mg	Manejo grande
MGA	Acetato de melengestrol
mL	mililitro
mm	milímetro
Mp	Manejo pequeno
nº	número
ni	não identificado
OT	Observatório
p	plataforma
pmg	plataforma de manejo grande
pmp	plataforma de manejo pequeno
p.ex.	por exemplo
sc	sem câmara

SSC

Species Survival Commission

I. Relatório de actividades de estágio

1. Introdução

O estágio curricular da aluna foi realizado no Centro Nacional de Reprodução do Lince-ibérico (CNRLI) em Silves, na área de comportamento, reprodução e clínica num período de 10 meses (de 1 de Setembro de 2012 a 30 de Junho de 2013). Durante este tempo, a aluna fez rotação entre os 3 turnos de 8 horas de videovigilância na equipa de etologia (das 07:00 às 15:00, das 15:00 às 23:00 e das 23:00 às 07:00). Com uma média de 5 turnos por semana, fez aproximadamente 1600 horas no total.

Quando foram iniciadas actividades, as 17 crias de 2012 (J) tinham entre 5 a 6 meses de idade, e quando deu por terminado o estágio as 17 crias de 2013 (K) tinham cerca de 3 meses, tendo presenciado, aproximadamente, um ciclo anual no centro.

2. Funções na equipa de etologia

As funções dos elementos da equipa de etologia incluem a garantia da segurança e bem-estar dos animais, recolher dados para estudos etológicos, observar e documentar os vários momentos do ciclo reprodutivo dos lince e apoiar os tratadores no manuseio diário dos animais. As secções seguintes descrevem, sucintamente, as funções desempenhadas.

2.1 Vigilância e detecção de alterações de bem-estar

Enquanto membro da equipa de etologia adquiriu a capacidade para detectar alterações comportamentais e físicas dos animais, sendo fundamental, para a salvaguarda da sua segurança e do seu bem-estar, a comunicação atempada destas alterações a um responsável.

2.2 Vigilância e detecção precoce de riscos

A vigilância e detecção precoce de riscos implicou a atenção sobre factores externos (tais como: incêndios e invasão de outros animais no perímetro) e também, internos (p.ex.: fugas de animais dos seus cercados). Para a detecção destes problemas é essencial um acompanhamento contínuo dos animais e também do ambiente que os rodeia.

2.3 Monitorização e registo de dados comportamentais

2.3.1 Scan

No CNRLI a actividade dos animais é monitorizada e registada através de observação descontínua pelo método de varrimento, o *scan*. Através de um varrimento por hora, 24 horas

por dia e 365 dias por ano, é registada a actividade de cada indivíduo, de acordo com um etograma. A partir destes dados, pode calcular-se mensalmente, a proporção de actividade de cada indivíduo e o seu ritmo circadiano mensal médio, de forma a detectar, precocemente, alterações subtis no seu comportamento. Com o mesmo método são ainda recolhidos outros dados relativos ao comportamento dos lince, bem como a sua localização e a utilização de elementos de enriquecimento ambiental, assim como, as condições metereológicas e a presença de agentes externos (ruídos, obras, tratadores). Para realizar estas tarefas é necessário o conhecimento do etograma da espécie, desenhado pelo Programa de Conservação *Ex Situ* do lince-ibérico.

2.3.2 Monitorização de interacções

As interacções entre animais são registadas de forma oportunística, ou seja, baseando-se apenas nas observações detectadas pelo operador. Esta monitorização é especialmente importante para calcular a compatibilidade de indivíduos para a formação de casais. Assim, para cada par reprodutor potencial é preenchida uma ficha de interacções que é avaliada diariamente. Estas podem ser positivas, neutras ou negativas, e podem ocorrer através da rede ou directamente. A aluna registou interacções entre os 7 casais formados na época reprodutiva e, ainda, entre o casal de estudo (Gamma e Janes), unido depois da época de cio. Observou ainda que, perto da época de cio (entre final de Dezembro e princípio de Janeiro), os contactos positivos entre casais tornaram-se mais frequentes, sendo mais evidentes por parte da fêmea.

2.3.3 Monitorização de uniões

Durante a união de casais, a equipa de etologia é responsável por observar continuamente os dois membros de cada par, registando as suas interacções e comunicando o sucedido à equipa de tratadores, especialmente, a ocorrência de acções negativas. A observação contínua dos animais deve ser mantida, pelo menos, durante duas horas depois da união. A aluna analisou a união dos 5 casais. Em todos os casos foi o macho que teve acesso ao cercado da fêmea.

2.3.4 Monitorização de cópulas

No período de cópulas é necessária a observação contínua dos casais para a visualização dos acontecimentos. É preenchida, para cada casal, uma ficha de cópulas que é avaliada posteriormente. O período de cio da fêmea e, portanto, o período de cópulas dura aproximadamente 72 horas (3 dias), sendo que no ano de 2012, a maioria dos casais (4 em 7) cessou este comportamento até 96 horas após a primeira. Nesse mesmo ano, o número total de

cópulas por casal foi, em média de, 23, tendo sido mais frequentes nas primeiras 48 horas após a primeira. O tempo entre cópulas é aproximadamente duas horas, aumentando de seguida. A aluna verificou que, a duração média de cada cópula, nesta espécie, é de cerca de 1 minuto.

2.3.5 Monitorização de fêmeas gestantes

Para cada fêmea que tenha copulado é elaborado um mapa de gestação indicando os períodos críticos de cada fase, as alterações das respectivas rotinas de manejo (fim do jejum semanal, início de alimentação *ad libitum*, separação do macho), o calendário de recolha de amostras para diagnóstico de gestação e, a data prevista de parto. O tempo de gestação da espécie é, aproximadamente, de 64 a 66 dias.

2.3.6 Monitorização de partos

Durante esta fase é necessário registar a hora e ocorrência de certos eventos como, o início do parto (1ª contracção expulsiva), a expulsão de cada cria e os comportamentos da fêmea (ingestão de placenta, lambe da cria, abandono ou canibalismo). A aluna presenciou 4 dos 5 partos ocorridos no ano de 2013, entre o 5 de Março e 2 de Abril. A duração do parto variou entre 1 hora e 49 minutos e 4 horas e 17 minutos, tendo oscilado o intervalo entre a expulsão de duas crias de 10 a 185 minutos.

2.3.7 Monitorização do desenvolvimento neonatal

Nas primeiras horas de vida é essencial monitorizar a actividade de cada cria e o tempo que as crias demoram a alimentar-se (lactâncias). É também necessário registar os cuidados maternos com as crias (*alogrooming*) e os tempos das crias sem mãe, isto é, o tempo que a fêmea passa fora do ninho. A monitorização do desenvolvimento neonatal inclui ainda a avaliação diária do desenvolvimento físico, locomotor e social das crias.

2.3.8 Monitorização do desenvolvimento das crias

As lactâncias foram observadas pela equipa de etologia até aos 60 dias de idade de cada ninhada, que é o período inicial de desmame. A apresentação do coelho morto às crias foi realizada entre os 30 e os 40 dias e, aproximadamente, aos 95 dias de idade todas as crias já realizavam todo o processo de caça, sem o auxílio da mãe. Entre os 35 e os 55 dias de idade, as crias manifestaram comportamentos agressivos entre si, lutas que, normalmente, ocorrem

nesta espécie. Em cada episódio de luta deve registar-se a sua duração, se ocorreu intervenção da mãe, os intervenientes e se houve alterações corporais visíveis.

2.3.9 Monitorização do treino para reintrodução

Para avaliar se os animais estão aptos a serem reintroduzidos no estado natural procede-se a um treino de reintrodução. A equipa de etologia observa e regista em ficha apropriada, os comportamentos de cada cria perante a aproximação do tratador (no episódio de susto e na colocação de coelhos no cercado) e durante a caça. Os “episódios de sustos”, nos quais o tratador de serviço entra no cercado de forma ruidosa correndo para junto dos animais, são realizados a fim de diminuir a tolerância e a habituação das crias aos humanos.

2.4 Apoio ao maneio

O apoio aos tratadores enquanto executam o maneio diário é uma função importante dos membros da equipa de etologia, dado que a visão sobre os animais na sala de videovigilância, complementa a visão local dos tratadores. Este apoio é, especialmente, importante na movimentação de animais, na observação da sua localização e também, na identificação de certos locais mais utilizados pelos indivíduos, por exemplo, os seus locais de defecação (recolha de amostras).

3. Acompanhamento da equipa veterinária

3.1 Segurança alimentar e HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo*)

A alimentação dos lince no CNRLI é composta quase exclusivamente de coelho. Através da participação activa nas rigorosas rotinas de transporte, armazenamento e vigilância sanitária, a aluna reteve a necessidade de garantir a qualidade dos coelhos, em todos esses processos.

3.2 Exames reprodutivos

No final de Novembro e princípio de Dezembro, procedeu-se à captura de 7 adultos, 4 fêmeas (Flora, Era, Fresa e Fruta) e 3 machos (Fado, Fauno e Gamma). A aluna integrou a equipa de trabalho veterinário em todos os rastreios mencionados, excepto no da Era.

3.2.1 Captura

Os animais são capturados com o auxílio de uma jaula de captura colocada no cercado, sendo depois transportados para a clínica ainda dentro da mesma.

3.2.2 Anestesia

A indução anestésica é realizada com uma combinação de quetamina (2.5 mg/Kg), dexmedetomidina (15 µg/Kg) e Midazolam® (0.4 mg/Kg), administrada por via intramuscular ao animal, ainda na jaula de captura. A manutenção é realizada com isoflurano, se necessária. Durante a anestesia, é preenchida a ficha respectiva, onde se anotam os fármacos utilizados, a dose, a via de administração, o tempo em que foram administrados, o tempo de efeito inicial e o tempo em que o animal se colocou em decúbito. Registam-se ainda nessa ficha, todos os procedimentos realizados durante a anestesia e os sinais vitais do animal, a cada 5 minutos. A reversão anestésica, se necessária, é realizada com Antisedan® (125 µg/Kg), sendo depois o animal colocado numa jaula de transporte, até a recuperação completa. É necessário que um membro da equipa de trabalho veterinário observe o animal enquanto este recupera e, anote os tempos de recuperação e a hora a que o animal é novamente libertado no seu cercado. Após a libertação no cercado, é essencial o seu acompanhamento por parte da equipa de etologia.

3.2.3 Exame Clínico

No exame clínico, são realizados um exame físico completo aos animais, alguns exames complementares de diagnóstico, como ecografia e radiografia (com especial destaque na detecção de sinais de doença renal crónica), e, são ainda recolhidas algumas amostras fisiológicas (nasais/orais, de sangue e de pêlos).

3.2.4 Procedimentos específicos

Nos animais de ambos os sexos, o exame ao aparelho reprodutor é realizado por ecografia. O exame dos machos incluiu também a palpação e medição dos testículos (com craveira e ecograficamente) e a observação directa do pénis e das espículas penianas.

3.3 Acompanhamento das crias

Os exames das crias são normalmente realizados às 4, 8 e 12 semanas de vida destas e depois aos 6 e 8 meses de idade. No entanto, as datas, assim como o número de exames, podem variar. A aluna assistiu a um exame, no cercado, de uma das ninhadas de 2013 e a 15 exames, na clínica, das várias ninhadas desse ano. Em todos eles, integrou a equipa de trabalho veterinário.

3.3.1 Captura

Nos exames realizados no cercado (os primeiros 3), as crias são capturadas manualmente pelos tratadores, sendo avaliadas pela equipa médico-veterinária dentro do próprio cercado. Nos exames realizados na clínica (os 2 seguintes), as crias são capturadas com o auxílio da jaula de captura, sendo nesta transportadas para o local de exame.

3.3.2 Anestesia

Nos exames realizados nos cercados, normalmente, não é realizada sedação ou anestesia. Nos exames realizados na clínica é feita anestesia com recurso ao protocolo usado nos animais adultos.

3.3.3 Exame Clínico

É realizado um exame físico, que inclui sexagem (primeiro exame), medição de peso, avaliação da condição corporal e cor das mucosas, morfometria e auscultação torácica e cardíaca.

3.3.4 Outros procedimentos específicos

Normalmente, no segundo e terceiro exame (8 e 12 semanas) é realizada a vacinação (Purevax® FeLV + Fevaxyn® i-CHP), bem como, no exame de pré-solta, caso os animais sejam reintroduzidos no meio natural. No quarto exame é colocado um implante de *microchip* e são colhidas biópsias de pele, para determinar o perfil genético do animal. Em todos os exames é realizada uma desparasitação (Milbemax® nos 3 primeiros e Stronghold® nos outros 2) e recolha de amostras (sangue e zaragatoas da orofaringe, conjuntiva e recto). Em nenhum destes exames foi detectada qualquer alteração digna de registo.

3.4 Casos clínicos

3.4.1 Era

A Era é uma fêmea nascida no meio natural em 2008. No dia 7 de Dezembro do mesmo ano, ingressou no programa, tendo sido transferida a 4 de Novembro de 2011 para o CNRLI. Este animal sempre teve índices de manejabilidade mais baixos que os restantes, comportamentos evasivos mais frequentes e maior nervosismo perante a presença humana. Foi unida ao Fauno na época reprodutiva de 2011/2012 mas sem sucesso reprodutivo, demonstrando comportamentos de agressividade para com o macho. A 19 de Novembro de 2012, foi

capturada e transportada para a clínica onde se realizou uma anestesia para exame clínico e exames complementares de diagnóstico, com particular atenção na detecção de sinais de doença renal crónica e exame reprodutivo. Ao exame ecográfico, os seus ovários mostraram-se imaturos e inactivos, situação anormal numa fêmea de 3 anos, e depois de duas épocas reprodutivas. Planeou-se uma terapia comportamental na tentativa de melhorar a interacção da fêmea relativamente ao macho e, de aumentar a sua eficácia reprodutiva. A medicação com Fluoxetina (10 mg/dia) foi iniciada em Dezembro de 2012. A aluna acompanhou a realização do exame clínico e dos exames complementares de diagnóstico, tendo também seguido a época reprodutiva de 2012/2013 da fêmea. Registou-se uma diminuição dos comportamentos agressivos e evasivos para com o macho mas, apesar disso, e de um número razoável de cópulas do casal, a fêmea não ficou gestante.

3.4.2 Azahar

A Azahar é uma fêmea que ingressou no projecto de Conservação *ex situ* do lince-ibérico em 2006, tendo sido a fêmea fundadora do projecto de Silves, em 2009. Com recorrentes problemas ao parto era já considerada imprópria para tal acto. Não tendo descendência viva e com o intuito de preservar a sua linha genética, foi submetida a uma ovariectomia com recolha de embriões. Anteriormente, e para esse efeito, foi colocada com o macho Foco no dia 3 de Janeiro de 2013, tendo as cópulas ocorrido de 25 a 31 do mesmo mês. No dia 1 de Fevereiro de 2013 foi realizada a cirurgia e recolha de 3 embriões que estão conservados no Banco de Recursos Biológicos do *Museo Nacional de Ciencias Naturales* de Madrid (MNCN). No futuro, se assim se desejar, estes embriões poderão ser implantados numa fêmea receptora, dando origem a crias com a linhagem genética da fêmea Azahar. Todo este processo envolveu a equipa do CNRLI, a equipa de especialistas da *Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research* (IZW) de Berlim, a equipa do MNCN e ainda a participação do Veterinário Dr. Rui Bernardino do Jardim Zoológico de Lisboa. A aluna fez parte integrante da equipa de trabalho veterinário (equipa de anestesia), tendo sido responsável por grande parte do período de recobro do animal (6 horas).

3.4.3 Gamma

O macho Gamma foi um dos casos clínicos que a aluna seguiu. Após anestesiar o animal procedeu-se à colocação de um implante subcutâneo contraceptivo (Deslorelina) na zona da omoplata direita. Nos 15 dias seguintes, a aluna observou atentamente o animal, registando que não houve edema, nem hemorragias na zona de aplicação do implante. Durante 3 meses, a

aluna e a restante equipa de videovigilância seguiram o animal por intervalos contínuos de 2 horas diárias. Pretendeu-se com isso, com o etograma geral e ainda com o registo das suas interações, avaliar o efeito do contraceptivo a nível comportamental.

Foi, nomeadamente, o animal alvo do seu estudo. Será referido descritivamente, no material e métodos.

II. Estudo piloto de contracepção reversível em machos de lince-ibérico

1. Introdução

1.1 O lince-ibérico

1.1.1 Características gerais

O lince-ibérico, *Lynx pardinus* (Temminck, 1827), pertence à família Felidae, que engloba cerca de 36 espécies, e ao género Lynx, que inclui 4 espécies. Do género Lynx apenas duas espécies ocorrem na Europa, o lince-euroasiático (*Lynx lynx*) e o lince-ibérico (*Lynx pardinus*). Crê-se que este último seja descendente directo de uma população de lince-das-cavernas (*L. pardinus spelaeus*) que ficou isolada no sudoeste da Europa há cerca de 1 milhão de anos atrás (Palomares, 2009). A sua distribuição permaneceu quase sempre limitada à Península Ibérica dadas as suas necessidades ecológicas e, muito provavelmente também, devido à competição com o lince-euroasiático na Europa central (Simón et al., 2012).

Trata-se de um felino de porte médio que, normalmente, mede até 1 metro de comprimento e pesa até 10,5 kg (fêmeas) ou 14,5 kg (machos). Apresenta membros posteriores longos, que lhe permitem saltar a vários metros de altura, e membros anteriores mais curtos, fundamentais para caçar as suas presas. As suas patas, relativamente grandes para o tamanho do corpo, têm em cada uma delas 4 garras retrácteis. As características físicas que o destacam dos outros lince são a cauda bastante curta com a extremidade preta, os pêlos rígidos e escuros em forma de pincel na extremidade das orelhas (pincéis) e os longos pêlos a rodear toda a zona da face (barbas) (Figura 1). A posição em que as barbas se apresentam reflectem o estado do animal. Quando o animal está calmo e relaxado, as suas barbas estão distendidas, não se notando quase a sua existência. O animal eriça/abre as barbas quando se sente ameaçado, podendo ser um sinal de agressividade, ou então, quando se pretende exibir. Quando está atento ou alerta as barbas estão retraídas. A pelagem do lince-ibérico é muito característica, tendo cada indivíduo um padrão de manchas próprio, o que permite a sua identificação individual (Simón et al., 2012).

Figura 1 - Exemplar de lince-ibérico nas instalações do CNRLI.



(Foto gentilmente cedida por Vanessa Requeijão)

A presa maioritária do lince-ibérico é o coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*), estimando-se que os requisitos energéticos necessários de um animal adulto equivalem a um coelho adulto por dia (Aldama, Beltran & Delibes, 1991; Palomares, 2009). Estas duas espécies estão muito associadas em termos históricos uma vez que, o Lince-ibérico, que evoluiu nesta terra abundante de coelhos (Hispania), tornou-se um predador especialista nesta presa e muito dependente da sua disponibilidade (Beltran & Delibes, 1991; Simón et al., 2012). Quando não há coelhos em número suficiente, o lince caça outras presas como perdizes, lebres e ratos (Palomares, Ferreras, Fedriani & Delibes, 1996; Palomares, 2009). A abundância de coelho, a disponibilidade de refúgios e a presença de água são os factores mais importantes para a sustentabilidade do lince-ibérico. Normalmente, a espécie evita zonas descobertas, escolhendo normalmente a floresta mediterrânica como seu *habitat* preferencial (Palomares, 2009; Simón et al., 2012).

O lince é considerado um animal solitário, estabelecendo relações entre indivíduos maioritariamente na época reprodutiva (Ferreras, Beltrán, Aldama & Delibes, 1997).

Normalmente, os machos não ajudam a educar as crias, sendo estas dependentes da progenitora até aos 8 meses de idade, aproximadamente. Por volta dos 2 anos de idade, as crias dispersam-se, estabelecendo o seu próprio território. O território de um lince adulto pode variar entre 4 a 30 km² (Ferrerias et al., 1997; Palomares, 2009). Os machos têm territórios maiores do que as fêmeas e quanto maior for a disponibilidade de coelhos numa zona, menor será o território necessário a um lince. Uma vez estabelecido o seu território, os lincos eliminam dessa área os restantes médios e pequenos predadores, tais como raposas (*Vulpes vulpes*) e ginetas (*Genetta genetta*), o que conduz a um aumento da população de coelhos (Palomares et al., 1996). Dentro do território de um lince existem diversas áreas, representando as mais utilizadas, cerca de 40% desse espaço. Nestas zonas, os animais permanecem, normalmente, mais de 50% do seu tempo diário (Simón et al., 2012). Os lincos para defender o seu território, sendo animais que evitam, habitualmente, o confronto directo, patrulham essa área e nela realizam marcações odoríferas. As mais usuais são com urina e com fezes (Ferrerias et al., 1997; Simón et al., 2012).

O lince-ibérico é um animal maioritariamente crepuscular e nocturno. A sua actividade varia com factores endógenos como o sexo, a idade e o indivíduo e, com factores exógenos, como as estações do ano, o tempo e o comportamento dos coelhos. No Inverno, a sua actividade diária aumenta, decrescendo no Verão (temperaturas altas) e nos dias de chuva (Beltran & Delibes, 1994; Simón et al., 2012). A sua actividade também aumenta com o avanço da fase lunar, provavelmente, devido ao aumento de luminosidade nocturna (Beltran & Delibes, 1994).

Relativamente à sua distribuição geográfica, no século XIX o lince habitava a totalidade da Península Ibérica. Porém, no século XX, a distribuição desta espécie e também o número de indivíduos diminuiu acentuadamente (Castro & Palma, 1996). Em Portugal, entre os anos 30 e os anos 40, do século passado, ocorreram campanhas de transformação de florestas em vastos campos de trigo, destruindo o *habitat* ideal do lince (Castro & Palma, 1996). A partir dos anos 50, a doença da mixomatose e a doença hemorrágica viral (anos 80) dizimaram um grande número de coelhos que, conjuntamente com as reflorestações realizadas de pinheiros e eucaliptos (para indústria da celulose) provocaram uma grande diminuição no número de lincos e a fragmentação das populações existentes (Castro & Palma, 1996). De referir que, ao longo dos séculos XIX e XX, os lincos foram também alvo de caça, principalmente para comércio das suas peles (Simón et al., 2012). Em 1995, estimou-se que não existiriam mais de 50 lincos em Portugal, não existindo, no entanto, evidência directa da sua existência no país desde 1992 (Castro & Palma, 1996; Sarmiento et al., 2008). Em 2002, o lince-ibérico tornou-

se então a primeira espécie de felino selvagem a ser listada como “criticamente em perigo” na Lista Vermelha de espécies ameaçadas da IUCN/SSC (*International Union for Conservation of Nature/Species Survival Commission*). O Despacho nº 12697/2008 (p. 20176) resume de forma clara a situação crítica da espécie, referindo que:

O lince-ibérico é a espécie de felídeo mais ameaçada do Mundo, estando numa situação crítica a nível mundial. Em território nacional, a espécie encontra-se numa situação de pré-extinção, classificada como “criticamente em perigo” (CR) pelo Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (2005), de acordo com os critérios adoptados pela IUCN (2001, 2003): “a espécie teve uma redução do tamanho da população que pode ter atingido 80% nos últimos 15 a 27 anos, de acordo com a avaliação do declínio da sua área de ocupação, extensão de ocorrência e qualidade do habitat por causas que podem não ter cessado, não ser compreendidas ou não ser reversíveis, e que se supõe persistir e prolongar-se no futuro.”.

1.1.2 Conservação do lince-ibérico

Primeiramente é necessário referir que o objectivo da conservação da vida selvagem é manter ou, se possível, aumentar a biodiversidade. Tal pode ser alcançado de diversas formas sendo as melhores estratégias as locais, *in situ*, pois permitem a preservação dos animais no seu *habitat* natural. Quando estas por si só não têm sucesso, são necessárias estratégias *ex situ*, ou seja, fora do *habitat* natural dos animais. A reprodução em cativeiro surge como uma estratégia *ex situ* eficaz para muitas espécies (Léon-Quinto et al., 2005).

Relativamente à conservação do lince-ibérico, inicialmente foram realizadas apenas medidas *in situ*, que por serem insuficientes, foram posteriormente colmatadas com medidas *ex situ*.

1.1.2.1 Conservação in-situ

Desde 1980, que foram publicados diversos planos na Península Ibérica, com o intuito de conservar esta espécie (Palomares, Rodríguez, Revilla, López-Bao & Calzada, 2011). Em 1987, foi implementado em Portugal um plano de manejo de *habitat* e proteção de zonas com abrigos, na Reserva Natural da Serra da Malcata, local de distribuição do lince (Castro & Palma, 1996). Em 1991, surgiu o Programa Liberne que tinha como principais propósitos recolher informações sobre o número de indivíduos existentes e as suas áreas e *habitat* de ocorrência, estudar a ecologia das populações existentes nos locais, realizar o manejo do *habitat* e implementar acções educativas (Castro & Palma, 1996). Em 2001, o Instituto de

Conservação da Natureza (ICN), estabeleceu novas medidas de emergência que tinham como objectivo, de novo, obter dados sobre o número de lince e a sua distribuição, assim como, definir áreas para potencial captura de indivíduos (fundadores, para dar início a um programa de reprodução em cativeiro) (Sarmiento et al., 2008). Os diversos estudos realizados não detectaram a presença deste animal em território português (Sarmiento et al., 2008). Em 2004, o Projecto Lince pretendia conservar o *habitat* do lince-ibérico, envolvendo a recuperação das populações de coelho-bravo, a promoção da Rede Natura 2000 e a vertente educativa e de sensibilização da comunidade (Loureiro et al., 2011).

1.1.2.2 Conservação *ex-situ*

No ano de 2005, existindo apenas duas populações observadas em Espanha (Doñana, com 37 indivíduos e Andujar, com 100 indivíduos) e sem números existentes em Portugal, concluiu-se que, a única solução seria realizar, também em Portugal, um programa de conservação *ex situ*, programa de reprodução em cativeiro. Em 2007, foi então assinado um Acordo entre Portugal e Espanha para a Criação em Cativeiro do lince-ibérico, no qual Espanha cederia exemplares a Portugal para reproduzirem no Centro Nacional de Reprodução do lince-ibérico (CNRLI), em Silves (Despacho nº 12697/2008). Este programa, que já existia em Espanha, ocorreria no nosso país em conjunto com medidas de conservação *in situ* nas áreas históricas de distribuição do lince em Portugal (futuras áreas para reintrodução) (Sarmiento et al., 2005; Serra, Sarmiento, Baeta, Simão, & Abreu, 2005). Os objectivos gerais definidos para o Programa Ibérico de Conservação *ex-situ* eram conservar 85% da variabilidade genética existente na natureza, durante 30 anos, e criar exemplares de lince-ibérico, destinados a fundar novas populações em áreas de distribuição histórica ou reforçar as já existentes. Para esse efeito, foi então criado o CNRLI e um Banco de Recursos Biológicos (Despacho nº 12697/2008). Em 22 de Maio de 2009 foi inaugurado o CNRLI, recebendo o primeiro lince, a fêmea Azahar, no dia 26 de Outubro, do mesmo ano. Com o sucesso do Programa de Conservação *ex-situ*, que atingiu as metas demográficas propostas, foi possível iniciar o reforço das populações existentes e criar novas populações. As reintroduções começaram a ser realizadas no final de 2009, em Espanha, e a primeira em Portugal foi realizada no dia 16 de Dezembro de 2014, em Mértola. Desde 2009 até à data do presente trabalho, já foram reintroduzidos 100 animais, dos quais 10 em Portugal. O CNRLI produziu até à data 71 crias de lince-ibérico.

O Plano de Acção para a Conservação do lince-ibérico em Portugal mencionou também áreas de investigação necessárias para apoiar a recuperação da espécie (Despacho nº 12697/2008, p. 20179):

No contexto da área da investigação, fundamental para uma correcta aplicação da estratégia de conservação, identificam-se algumas temáticas de investigação cujo aprofundamento do conhecimento científico suportaria as acções de conservação a nível populacional e nacional:

a) Fisiologia da reprodução, etologia, genética e sanidade, entre outras disciplinas que enquadram o programa de reprodução em cativeiro e o trabalho de análise de viabilidade do habitat para futuras acções de reintrodução ou reforço populacional;

O presente trabalho integra-se na temática da fisiologia da reprodução e visa desenvolver ferramentas que permitam a melhoria da gestão da capacidade reprodutiva dos machos, sem prejuízo do seu bem-estar, e mantendo a sua viabilidade futura como reprodutores.

1.1.3 Fisiologia reprodutiva do lince-ibérico

1.1.3.1 Fêmea

Na vida selvagem e em cativeiro, a fêmea desta espécie desenvolve a sua actividade reprodutiva entre os 3 e os 9 anos de idade, atingindo o seu potencial reprodutivo máximo aos 3 anos (Palomares, 2005; Simón et al., 2012). As fêmeas são monoéstricas sazonais manifestando o estro entre Dezembro e Fevereiro (Palomares, 2009; Simón et al., 2012). Este período de receptividade sexual tem uma duração de 3 a 7 dias, e a ovulação pode ser induzida ou espontânea sem ocorrerem cópulas (Vargas et al., 2009; Simón et al., 2012). Quando a fêmea se apresenta em cio o macho segue-a por um período de 48 a 72 horas, ocorrendo as cópulas neste período. Cada cópula dura cerca de um minuto e, em média, cada casal copula 28 vezes, por época reprodutiva (Simón et al., 2012). A gestação dura entre 63 a 65 dias, ocorrendo os partos normalmente, entre Março e Abril (Palomares, Revilla, Calzada, Fernández & Delibes, 2005; Simón et al., 2012). O período de partos coincide com o período em que se verifica um aumento na população de coelhos disponíveis no *habitat* natural, o que facilita a alimentação das crias que, nos primeiros meses, é muito exigente para a progenitora (Palomares et al., 2005). O número de crias ao parto pode variar de 1 a 5, mas, no meio natural, usualmente, apenas duas sobrevivem até à idade de dispersão (Palomares et al., 2005; Palomares, 2009). A mortalidade juvenil pode ocorrer por vários factores, podendo um deles ser as lutas entre crias. Entre a 6^a e a 7^a semana de idade, estas tornam-se agressivas umas

para com as outras, podendo resultar na sua morte. Isto foi observado apenas em populações em cativeiro (Vargas et al., 2009).

Relativamente às concentrações hormonais, na maioria dos felinos, os comportamentos de cio estão associados a uma elevação significativa de estrogénios. No entanto, esse aumento não é tão significativo nos lince (ibérico, euroasiático, do Canadá e pardo), não reflectindo a actividade folicular associada à ovulação (Jewgenow, Göritz, Vargas & Dehnhard 2009b; Dehnhard et al., 2010). Como nas outras espécies de lince, os níveis de estrogénio aumentam durante a gestação, tendo as medições urinárias revelado que a sua concentração está aumentada após as cópulas e no final da gestação (Jewgenow et al., 2009b). Também durante a gestação, os esteróides fecais não têm o mesmo padrão de secreção do que os outros felídeos, aumentando ligeiramente e mantendo-se elevados após o parto (Dehnhard et al., 2005; Dehnhard et al., 2010). A sua monitorização, nas fêmeas de lince-ibérico, revelou uma elevação da concentração de estrogénios de Janeiro a Junho, diminuindo nos meses seguintes para valores basais (Pelican et al., 2005). De referir que, a recolha de amostras, exclusivamente de fêmeas, é muito difícil nesta espécie, dado que elas co-habitam com os machos, o que por si só também dificulta a correcta monitorização destas hormonas (Jewgenow et al., 2009b).

Relativamente à progesterona, a monitorização convencional para diagnóstico de gestação em felídeos, é inútil nesta espécie, dado que o corpo lúteo é persistente (em fêmeas gestantes ou não). O corpo lúteo produz progesterona, e conseqüentemente, o tempo de secreção desta hormona é prolongado (Dehnhard et al., 2005; Pelican et al., 2005). O aumento da concentração da hormona relaxina, quantificada no sangue ou na urina, é um bom indicador de gestação nesta espécie, como nas dos restantes felinos, pois esta hormona é, maioritariamente, produzida pela placenta. Para fêmeas gestantes de lince-ibérico, o teste *Witness® Relaxin*, é positivo à relaxina dos 34 aos 50 dias pós-cópula, para o plasma sanguíneo, e dos 37 aos 46 dias pós-cópula para amostras de urina (Jewgenow et al., 2009a). Nesta espécie, como já referido, o corpo lúteo persiste após a gestação, ou a suposta fase lútea, no caso de pseudo-gestação, até à época reprodutiva seguinte e, portanto, as fêmeas só podem revelar o cio, uma única vez por época reprodutiva. Esta estrutura produz progesterona continuamente, promovendo um *feedback* negativo no desenvolvimento dos folículos (Göritz et al., 2009a). O mecanismo de persistência dos corpos lúteos tem sido alvo de vários estudos, não só nesta espécie, mas também nos outros lince, mais acessíveis em termos de número de indivíduos. Actualmente, os corpos lúteos das fêmeas de lince-euroasiático são considerados como os de maior longevidade entre os mamíferos. Com um tempo de vida de, pelo menos,

dois anos, diminuem progressivamente de tamanho mas mantêm a sua vascularização e a produção de progesterona. Nestes linceas, as fêmeas observadas não apresentaram anestro durante os seus anos férteis (Painer et al., 2014).

1.1.3.2 Macho

O macho de lince-ibérico é, em termos reprodutivos considerado juvenil até aos 2 anos de idade, subadulto dos 2 aos 4 anos, e adulto (ou sexualmente maduro) a partir dos 4 anos, idade em que atinge o seu potencial reprodutivo máximo. Normalmente, podem reproduzir até aos 10 anos de idade (Gañán et al., 2010; Simón et al., 2012).

Durante a época reprodutiva, o comportamento dos machos é menos conhecido do que o das fêmeas. No entanto, sabe-se que, para assegurar a sua descendência, o macho segue a fêmea e tenta afastar os restantes machos que a possam procurar durante o período de cópulas. Depois desse período, e já durante o desenvolvimento das crias, protege a fêmea e as suas crias dos outros machos que as queiram expulsar do território ou mesmo eliminá-las (Simón et al., 2012). Nesta espécie, normalmente monogâmica, pode ocorrer poligamia se o número de indivíduos de cada sexo não for proporcional. Este comportamento é, mais frequentemente, realizado pelos machos (Ferrerías et al., 1997).

Relativamente às características morfológicas, os machos apresentam um pénis com espículas, estruturas córneas (ou queratinizadas) androgénio-dependentes, normalmente responsáveis pelo estímulo mecânico (neuro-endócrino) realizado durante a cópula e necessário para induzir a ovulação, quando esta não é espontânea (Vargas et al., 2009; Asa, 2010; Simón et al., 2012). Estas estruturas também ocorrem noutras espécies de felinos selvagens como as chitas (Bertschinger, Trigg, Jöchle, & Human, 2002). As características testiculares do macho de lince-ibérico, como tamanho e peso, são inferiores comparadas com as de outras espécies de felinos, sendo mesmo inferiores aos de massa corporal inferior à sua (p.ex. gato-maracajá). No entanto, são muito semelhantes às do lince-euroasiático e do lince-pardo (Görítz et al., 2009b). O tamanho dos testículos pode ser influenciado directamente pela competição com outros machos, baixos níveis de competição reflectem-se em testículos menores e, possivelmente, também por uma baixa variabilidade genética, existente nesta espécie e documentada como das mais baixas entre os felinos (Gañán et al., 2010). As características do esperma (p.ex. número total de espermatozóides, percentagem de motilidade dos espermatozóides, espermatozóides com acrossoma intacto) são também inferiores às reportadas em outras espécies felíneas. No entanto, são superiores às do lince-euroasiático (*Lynx lynx*) e às do lince-pardo (*Lynx rufus*). Como na maioria dos felinos, no macho de lince-

ibérico também ocorre teratospermia, havendo uma produção de apenas 19 a 37% de espermatozóides morfológicamente normais (Gañán et al., 2009; Roldan & Gomendio, 2009; Gañán et al., 2010). No estudo realizado por Gañán et al. (2009), o primeiro a descrever as características seminais do lince-ibérico, registou-se uma percentagem de apenas 37% a 47% de espermatozóides com o acrossoma intacto. Provavelmente, a pequena variabilidade genética será parcialmente responsável pela inferior qualidade das características do esperma destes machos (Gañán et al., 2010).

Como já foi referido, a fêmea desta espécie é sazonal, no entanto, esta característica ainda não está totalmente comprovada no macho (Pelican et al., 2005; Gañán et al., 2010). Sabe-se que, as suas características reprodutivas sofrem alterações ao longo do ano, mas ainda não estão convenientemente estudadas. Um estudo realizado por Gañán et al. (2010) não encontrou diferenças nas características seminais dos mesmos machos, antes e logo após a época reprodutiva. Porém, em testículos obtidos de animais que pereceram, atropelados nos meses de Verão (Espanha), não foram observados espermatozóides (Roldan, comunicação pessoal, Março 23, 2015). Relativamente à concentração de hormonas, monitorizações fecais de testosterona mostraram que, os machos de lince-ibérico mantêm a sua produção durante todo o ano (Pelican et al., 2005). Esses níveis elevam-se antes do início da época reprodutiva, atingindo então o pico (Janeiro a Maio) e, no Verão, diminuem para níveis basais, onde se mantêm até ao início de nova época (Jewgenow, Naidenko, Göritz, Vargas, & Dehnhard, 2006b).

1.2 Endocrinologia reprodutiva

O controlo endócrino da reprodução é realizado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, sendo a gonadoliberina (GnRH) a principal hormona responsável por este mecanismo, em ambos os sexos. Esta hormona é produzida por células neurosecretoras no hipotálamo e estimula a hipófise anterior a produzir as gonadotrofinas, hormona folículo-estimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH) ou hormona estimulante das células intersticiais (ICSH), respectivamente, nas fêmeas e nos machos (Bertschinger, 2010).

Nos machos, a FSH actua nas células de Sertoli, células dos túbulos seminíferos que suportam os espermatozóides. Ela é necessária para que se inicie a espermatogénese, na puberdade e no início de cada época reprodutiva (nas espécies que não produzem esperma continuamente) mas também, para que todo o processo continue a ocorrer regularmente (Asa & Porton, 2010; Spindler & Wildt, 2010). No entanto, alguns autores afirmam que a espermatogénese é iniciada pela FSH mas que, pode ser mantida apenas pela testosterona (Asa, 2010). Outros

referem ainda que, dependendo da espécie, a FSH é necessária, juntamente com a testosterona, para manter a espermatogênese (Garner & Hafez, 2004). Assim sendo, descrevem que, a FSH é responsável pela espermatogênese até ao estágio de espermatócitos secundários, actuando a testosterona, apenas nas fases finais deste processo (Hafez, Jainudeen & Rosnina, 2004). A FSH interage com os receptores das células de Sertoli para a produção da proteína transportadora de androgénios (ABP), para a conversão da testosterona em dihidrotestosterona e estrogénio, para a estimulação da espermatogênese, para complementar a libertação de espermatozóides (espermiacção) e ainda, para a secreção da inibina. Esta última, quando libertada na corrente sanguínea promove um efeito de feedback negativo sobre a secreção de FSH, inibindo a sua secreção mas não sobre a ICSH (Garner & Hafez, 2004).

A ICSH actua ao nível das células de Leydig, células intersticiais, estimulando a produção e libertação de androgénios. A testosterona é o principal androgénio libertado pelos testículos de um macho adulto. Os androgénios actuam nas glândulas anexas ao aparelho genital masculino e nas glândulas sebáceas, mas também nos testículos, nas fases de maturação e de diferenciação da espermatogênese. São ainda responsáveis pelo comportamento sexual (lívido, agressividade para com outros machos, marcações, monta e cópula) e pelas características sexuais secundárias (Asa, 2010; Bertschinger, 2010). Quando há libertação de ICSH esta é imediata e pulsátil, dando origem a uma libertação também pulsátil de testosterona, facto que deve ser levado em consideração, quando se mede a concentração de uma destas hormonas em circulação (Asa, 2010). Os androgénios cíclicos regulam a FSH e a ICSH por *feedback* negativo, pois influenciam a libertação da GnRH e a sensibilidade da adenohipófise a esta hormona (Bertschinger, 2010; Spindler & Wildt, 2010). Assim, quando as concentrações de androgénios são baixas, consequência de uma actividade testicular diminuta, por *feedback* negativo aumenta a libertação de GnRH, FSH e ICSH e, consequentemente, a produção de androgénios. Se houver administração de androgénios, ocorre o contrário, sendo também alterada a produção de esperma (Bertschinger, 2010).

Na maioria dos mamíferos, o processo do início até ao final da espermatogênese, demora cerca de 6 a 8 semanas (Asa & Porton, 2010).

1.3 Controlo de populações

1.3.1. Necessidade de controlo de populações em animais selvagens

Segundo Bertschinger (2010):

O controlo de populações de animais selvagens não era um assunto preocupante há 50 anos atrás, antes pelo contrário muitas espécies foram levadas à pré-

extinção ou mesmo à extinção devido à caça indiscriminada e à perda progressiva do seu *habitat*.

Actualmente, o controlo dessas populações é motivo de preocupação e extremamente necessário, dado que grande parte destes animais reside em espaços fechados (jardins zoológicos, programas de conservação), onde o espaço físico e os recursos são limitados (Asa & Porton, 2010).

Antigamente, a reprodução de animais em cativeiro era considerada um sinal de bem-estar, sendo que, em muitos destes locais, os animais só existiam para o propósito da reprodução e, portanto, a sua prevenção era maioritariamente refutada (Asa & Porton, 2010). Actualmente, dado que em muitos destes locais (jardins zoológicos e programas de reprodução/conservação), existe uma sobrepopulação de animais, a prevenção da reprodução é necessária, mesmo parecendo incongruente com o facto de tantas destas espécies estarem em declínio no seu *habitat* natural. A verdade é que, os animais em cativeiro estão protegidos das suas maiores causas de morte natural, como a predação e as doenças e, portanto, uma sobrepopulação é fácil de ocorrer (Carter & Kagan, 2010). É necessário referir ainda que, a evolução das técnicas de maneo, de nutrição e de medicina conduziu a um incremento na reprodução, a uma diminuição da mortalidade juvenil e adulta e a um aumento da longevidade dos animais naqueles locais, o que, conseqüentemente, promoveu também a existência de um maior número de indivíduos destas populações (Asa, 1993; Asa & Porton, 2005; Jewgenow, Dehnhard, Hildebrandt, & Göritz, 2006a). O sucesso destes indivíduos em cativeiro continua a ser benéfico, na medida em que não é necessária a importação de animais do *habitat* natural para manter as populações. No entanto, tem de existir um controlo devido à possível falta de recursos e espaço físico e, também, ao inevitável perigo de consanguinidade (Asa, 1993; Bertschinger, 2010). De referir que, naqueles locais, também se pretende que as populações existentes sejam geneticamente diversificadas e, que estejam reunidas em grupos sociais apropriados a cada espécie (Asa & Porton, 2010).

1.3.2 Métodos de controlo em animais selvagens

Segundo Asa e Porton (2005), os métodos de controlo utilizados em animais selvagens podem ser divididos em métodos letais e não letais. Os métodos não letais incluem técnicas de maneo, como a separação de animais por sexos em períodos apropriados do ciclo reprodutivo (p.ex. em períodos de receptividade sexual). Esta separação, normalmente, não é desejada por motivos de comportamento social (Seal et al., 1976; Asa, 1993). Para além das técnicas de maneo, existem outras técnicas não letais como a translocação de animais, entre jardins

zoológicos e programas de reprodução, e por fim, as técnicas de contracepção (Seal et al., 1976; Asa & Porton, 2005; Bertschinger, 2010; Carter & Kagan, 2010).

1.4 Contracepção

1.4.1 Definições

A contracepção (contra + concepção) é a prevenção deliberada de concepção ou fecundação. Segundo Asa & Boutelle (2012), refere-se apenas aos métodos desenhados para serem reversíveis, de modo a que os animais possam novamente reproduzirem-se se tal for o pretendido. Em contraste, utilizam o termo esterilização para os métodos que são considerados permanentes. Bertschinger (2010) alega que, um contraceptivo ideal tem de ser reversível mas considera também como contraceptivos métodos cirúrgicos permanentes, como a gonadectomia.

De uma forma geral, um método contraceptivo é eficaz se não ocorrer concepção nem nascimento de crias, enquanto o tratamento ocorre e, é reversível se ocorrer concepção e nascimento de crias quando este cessa (vivas, nados-mortos ou abortos) (Asa & Porton, 2005; Asa e Porton 2010).

1.4.2 Programa de contracepção em animais de jardim zoológico

Em animais de jardim zoológico, o programa de contracepção teve início em meados dos anos 70, com testes efectuados em leões e tigres pelo Dr. Ulysses Seal, tendo seleccionado estas espécies devido ao seu elevado grau de reprodução em cativeiro (Asa & Porton, 2005). Seal concluiu que, o acetato de melengestrol (MGA) impregnando implantes de silicone, era mais eficiente que o de acetato de medroxiprogesterona (MDP) (Asa, 1993), começando então aquele método a ser utilizado em jardins zoológicos, em felídeos e outros mamíferos (Asa & Porton, 2005). Actualmente, a contracepção é uma parte integrante do maneio reprodutivo dos animais na maioria dos jardins zoológicos e aquários, podendo inclusive, ser necessária em programas de conservação (Asa & Boutelle, 2012).

“Devido à importância da contracepção no maneio animal, em 1989 a *Association of Zoos and Aquariums* (AZA) criou um grupo de aconselhamento de contracepção” (Asa, 1993, p. 235).

Posteriormente, foi criado um centro de contracepção do AZA Wildlife, que disponibiliza contraceptivos à comunidade de jardins zoológicos e aos programas de conservação e, partilha informações e recomendações sobre o seu uso. Disponível em <http://www.stlzoo.org/contraception> (Asa & Porton, 2010).

De referir que, os contraceptivos aplicados em animais selvagens mantidos em cativeiro, também podem ser utilizados para tratamento de condições médicas e para diminuir

comportamentos indesejados, como por exemplo a agressividade. De notar, que machos que habitam próximo uns dos outros tendem a ser bastante agressivos (Spindler & Wildt, 2010).

1.4.3. Métodos contraceptivos

A redução selectiva da reprodução pode ser alcançada por técnicas cirúrgicas irreversíveis, como deferentectomia ou gonadectomia ou, recorrendo a químicos, hormonas ou imun contraceptivos, normalmente reversíveis (Seal et al., 1976; Bertschinger, 2010). As técnicas irreversíveis, embora eficazes, retiram o animal do fundo genético sendo, portanto a contracepção reversível, muitas vezes, a mais vantajosa. Principalmente em espécies sociais, os contraceptivos reversíveis permitem que o grupo possa ficar unido durante o cio, não sendo necessária remoção de indivíduos (macho ou fêmea), permitindo uma melhor utilização dos espaços (as ninhadas podem permanecer com a mãe até mais tarde sem risco de cópulas indesejadas devido à consanguinidade), e são considerados por muitos como a solução mais responsável para a prevenção de sobrepopulações em animais cativos (Asa & Porton, 2005). Estes contraceptivos são, normalmente, os mais utilizados em animais valiosos em cativeiro, enquanto os irreversíveis são mais apropriados para animais nos quais não se pretende a reprodução futuramente (Jewgenow et al., 2006a).

1.4.3.1 Métodos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos sendo irreversíveis removem o animal do fundo genético. Além disso, estes métodos provocam uma atenuação das características sexuais secundárias nos machos o que pode alterar o ciclo sazonal ou mesmo levar à sua inexistência (Seal et al., 1976). Estes procedimentos podem ainda ser relativamente caros, devido ao uso de medicamentos, pessoal especializado e instalações, e têm sempre o risco de complicações anestésicas ou secundárias à cirurgia (Howe, 2006; Bowen, 2008; Massei & Miller, 2013). Os métodos cirúrgicos normalmente utilizados em machos são a gonadectomia e a deferentectomia.

Gonadectomia

A gonadectomia, remoção dos testículos ou ovários, foi durante muito tempo o único procedimento utilizado em animais para controlo de reprodução (Massei & Miller, 2013). Em animais selvagens, visto esta técnica ser irreversível, muitas vezes não é a escolhida, quando se trata de animais valiosos e se pretende a sua futura reprodução. No entanto, pode ser um recurso no controlo de populações de animais com índices prolíficos elevados, nomeadamente

leões. Em leões africanos (*Panthera leo*) esta técnica já foi utilizada, no entanto, não é recomendada por provocar a perda da juba. Esta é, nesta espécie, um indicador da condição reprodutiva do macho e, conseqüentemente, do seu estatuto no grupo. A sua perda provoca a da dominância e promove alterações hierárquicas, normalmente indesejadas (Hillermann, 2009; Miller et al., 2013).

A gonadectomia pode ainda, provocar outras alterações comportamentais, como a diminuição não desejada da actividade física. Esta alteração, comprovada no gato, deve-se à redução do estradiol (fêmeas) ou da testosterona (machos), responsável pela estimulação da actividade física e do comportamento de vaguear (Nguyen et al., 2004; Belsito, Vester, Keel, Graves, & Swanson, 2009). Esta cirurgia promove alterações na taxa metabólica dos animais e nos seus padrões de alimentação, tornando os seus requisitos energéticos, substancialmente inferiores aos de animais inteiros (Nguyen et al., 2004). Por isso, normalmente, provoca também alterações no peso dos animais, promovendo a obesidade, o que também não é desejável (Bertschinger, 2010).

Para além destes efeitos secundários indesejados, a gonadectomia muitas vezes não é realizada em animais selvagens por tornar-se impraticável, quer pela necessidade de recursos, estruturas e material, quer pelos custos envolvidos (De Nys et al., 2010).

Deferentectomia

A deferentectomia envolve a remoção bilateral ou oclusão de uma porção do ducto deferente (vaso que transporta o esperma a partir dos testículos) prevenindo que haja ejaculação durante a cópula (Howe, 2006). Machos vasectomizados devem ser considerados potencialmente férteis durante 6 a 8 semanas após a cirurgia, uma vez que os espermatozoides podem sobreviver no tracto reprodutivo masculino durante várias semanas (Asa & Porton, 2010). Esta abordagem requiere cirurgia de alto nível e por isso, normalmente, é uma técnica ainda mais dispendiosa que uma gonadectomia (Asa & Porton, 2010; Bertschinger, 2010). Convencionalmente, requiere ainda uma anestesia de longa duração e um tempo de internamento prolongado, o que em algumas espécies, como o Sambar (*Cervus unicolor*), pode causar taxas elevadas de *stress*, morbidade e mortalidade (William et al., 2014).

A deferentectomia realiza-se quando se pretende manter a função testicular e as características sexuais secundárias, pois como não há interrupção da produção de androgénios elas não são afectadas (Bowen, 2008). De referir ainda que, esta técnica, pode ser reversível, o que em certos casos ainda é mais vantajoso (Asa & Porton, 2010; Bertschinger, 2010). Em espécies em que as fêmeas têm ovulação induzida, a deferentectomia tem de ser utilizada com

precaução devido aos riscos de saúde consequentes para as fêmeas co-habitantes com esses machos (Asa & Porton, 2005). Nestes casos, as cópulas ocorrem de igual forma mas, dado que os machos são inférteis e não há gestação, as fêmeas entram repetidamente em cio. Períodos repetidos de progesterona elevada podem resultar em falsas gestações e num aumento do risco de patologias uterinas e mamárias (Asa & Boutelle, 2012). Com as repetidas interações entre macho e fêmea, a agressividade entre estes, normalmente, aumenta (Bertschinger, 2010).

Em animais selvagens, a deferentectomia é realizada principalmente em grandes predadores, como leões e tigres, sendo utilizada em leões desde 1970. Esta técnica é relativamente fácil de realizar nestes animais devido ao seu porte e, consequente, tamanho das suas estruturas fisiológicas. No entanto, pode ser falível, existindo casos em que os machos mantêm a fertilidade. Principalmente em leões, como não perdem as características sexuais secundárias como a juba, esta técnica pode ser vantajosa relativamente à gonadectomia. Porém, mesmo sem a perda das características referidas, podem ocorrer alterações na dinâmica social dos grupos, uma vez mais indesejadas. As fêmeas que co-habitam com os machos vasectomizados podem começar a procurar apenas os machos que o não são, se disponíveis, alterando-se a hierarquia do grupo. Para além das alterações hierárquicas, esta situação pode promover ainda um aumento da taxa de consanguinidade, uma vez que os pares sexuais se repetem mais frequentemente (Miller et al., 2013). Para além disso, como os leões são uma espécie em que as fêmeas têm ovulação induzida, esta técnica tem de ser cuidadosamente utilizada devido aos riscos consequentes para as fêmeas (Miller et al., 2013).

1.4.3.2 Métodos não-cirúrgicos

Quando se pretende controlar a reprodução em animais com bom potencial reprodutor e em animais com risco anestésico acrescido, os métodos irreversíveis e cirúrgicos não são aconselhados, surgindo, portanto, a necessidade de outro tipo de contraceção (Bertschinger, 2010). Existem quatro tipos de contraceptivos reversíveis: contraceptivos hormonais, vacinas imun contraceptivas, mecanismos contraceptivos e contraceptivos químicos.

1.4.3.2.1 Contraceptivos hormonais

Uma forma de promover a contraceção é através da regulação directa das hormonas envolvidas nos processos de reprodução. Tal pode ser alcançado com a administração de hormonas exógenas, como por exemplo esteróides, progestagénios, androgénios e análogos da

GnRH (Kutzler & Wood, 2006; Bowen, 2008; Alliance for contraception in cats & dogs [ACC&D], 2013).

Progestagénios

Nos anos 60, surgiram na Europa os primeiros contraceptivos orais para animais, os progestagénios, substâncias com actividade semelhante à progesterona. Em 1963, surgiu o acetato de medroxiprogesterona (MDP). Em 1970, o acetato de megestrol (MA) e depois, outros como o acetato de clormadinona, o acetato de delmadinona e a poligestona (Purswell & Jöchle, 2010). Estes compostos, utilizados inicialmente com o principal objectivo de controlo do estro em cadelas, provocaram resultados muito diversificados, assim como diferentes opiniões entre proprietários e médicos veterinários. Ao longo dos anos, a diminuição da dose e o ajuste do momento de administração, melhoraram os resultados destes medicamentos e a visão dos médicos veterinários sobre os mesmos, começando então a ser mais populares (Asa e Porton, 2005; Purswell & Jöchle, 2010).

A administração de progestagénios pretende maioritariamente a inibição da secreção das gonadotrofinas (FSH e ICSH ou LH) pela adenohipófise. Nas fêmeas, há pois, inibição da ovulação por *feedback* negativo sobre a LH e pode também ocorrer espessamento do muco cervical, impedindo a passagem de esperma, interrompendo o transporte deste último e do óvulo e/ou interferindo com a implantação (Jewgenow et al., 2006a; Asa & Porton, 2010). Dependendo da dose aplicada os progestagénios sintéticos podem provocar variados efeitos, sendo esses semelhantes aos da progesterona na gestação. No entanto, tem de se considerar que nos casos em que são utilizados não há gestação e, portanto, nem todos os efeitos são benéficos. Nos machos, esperava-se que os progestagénios inibissem a espermatogénese (regulada pelas gonadotrofinas). Porém, a sua acção ainda não é bem conhecida. Na maioria das espécies, os progestagénios não são, usualmente, utilizados em machos, dado que os resultados não são os aguardados, mas quando o são, é essencialmente para tratamento de comportamento indesejado (Goericke-Pesch, 2010). Estudos realizados em cães machos comprovaram que estes medicamentos não têm qualquer efeito na qualidade do esperma, mas que foram capazes de reduzir comportamentos sexuais, como monta, cópula, marcação e agressividade (Kutzler & Wood, 2006; Goericke-Pesch, 2010). Em felídeos, de ambos os sexos, normalmente não são recomendados pois provocam efeitos secundários nocivos (diabetes *mellitus*, fibroadenomatose, hiperplasia mamária e tumores mamários), efeitos esses que também podem ocorrer em animais de outras famílias (p.ex.: Canídeos) (Asa & Porton, 2005; Goericke-Pesch, Georgiev, Antonov, Albouy & Wehrend, 2011; Novotny et al., 2012).

Em animais de jardim zoológico (primatas e ungulados), o MGA na forma de implante subcutâneo é o progestagénio mais utilizado com uma taxa de sucesso de 99% (contraceção aproximada durante 2 anos) (Asa, 1993; Jewgenow et al., 2006a). É muito utilizado nestes animais, não sendo no entanto aconselhado como contraceptivo a longo prazo. Estudos comprovaram que, o seu uso prolongado aumentava o risco de doenças mamárias e uterinas e que provocava efeitos secundários nas funções hormonais e reprodutivas, ocasionalmente irreversíveis (Asa & Porton, 2005; Chuei, Asa, Hall-woods & Ballou, 2007; Massei & Miller, 2013). Assim, o uso deste contraceptivo é recomendado por não mais do que 4 anos de vida do animal e, apenas, por 2 anos consecutivos, após os quais deve ocorrer uma gestação (Chuei et al., 2007). Tal facto é importante pois está comprovado que a regressão do endométrio e a sua remodelação é mais completa depois de um parto do que após uma fase lútea (Asa, Boutelle & Bauman, 2012).

Androgénios

Como os progestagénios, também alguns androgénios como a testosterona e a miboleronona são utilizados como contraceptivos (Purswell & Jöchle, 2010; ACC&D, 2013). Em animais selvagens em cativeiro, o uso de miboleronona foi testado em fêmeas de diversas espécies, como leopardo (*Panthera pardus*) e lobo-cinzento (*Canis lupus*) para inibição do estro. No entanto, este medicamento provocou efeitos indesejáveis como agressividade e masculinização. O uso de Miboleronona é, desaconselhado em animais selvagens em cativeiro, uma vez que, potencialmente, provoca um aumento de agressividade dos animais (Asa & Porton, 2005).

Análogos da GnRH

A GnRH, gonadoliberina ou hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH), é um decapeptido hipotalâmico. É libertada de forma pulsátil no organismo e tem um tempo de semi-vida de 2 a 5 minutos, devido à rápida degradação que sofre por acção de proteases. Actua nos receptores específicos da adenohipófise e como o nome indica, estimula a produção e libertação de gonadotrofinas, a FSH e a LH. Estas duas últimas actuam nas gónadas regulando a produção de esteróides, a espermatogénese, o desenvolvimento folicular e a ovulação (Gobello, 2007).

Em 1971, com o isolamento e a caracterização química da hormona GnRH, surgiram os seus análogos, agonistas e antagonistas, produzidos por substituição de aminoácidos na molécula original. Estas substituições promoveram um aumento no tempo de semi-vida dos análogos, relativamente à molécula original e um aumento da sua afinidade para os receptores da

GnRH. De referir que, os antagonistas diferem em mais aminoácidos da hormona original que os agonistas (Gobello, 2007; Aboulgar & Rizk, 2011). Também por substituição de aminoácidos na molécula foram inventados os chamados superagonistas, moléculas 200 vezes mais potentes que a hormona natural (Nestor, 1984).

Inicialmente, os análogos da GnRH por serem susceptíveis à degradação gastrointestinal (peptidases), não eram eficazes por via oral, e sendo frequentemente administrados por via parentérica, tinham uma utilização clínica muito reduzida (Gobello, 2007; Purswell & Jöchle, 2010). No entanto, o seu uso viu-se ampliado com o desenvolvimento de produtos de libertação lenta, administrados facilmente por injeção intramuscular ou por implante subcutâneo (Weckermann & Harzmann, 2004). De referir que, desde de 1971 até aos nossos dias, já foram desenvolvidos mais de 3000 análogos da GnRH, tanto agonistas como antagonistas da hormona (Gobello, 2007).

1. Agonistas da GnRH:

Os agonistas da GnRH são substâncias que actuam nos receptores gonadotróficos da GnRH de modo semelhante ao da hormona endógena. Estes análogos, inicialmente e por um curto período, estimulam o sistema reprodutivo (eixo hipófise-gonadal) provocando um “pico” inicial de libertação de gonadotrofinas. Quando administrados prolongadamente superam a acção pulsátil da GnRH endógena e inibem a reprodução. Ocorre um *feedback* negativo nos receptores da adenohipófise, que provoca uma dessensibilização dos mesmos e por, consequência, uma regulação negativa cíclica e uma diminuição do número destes receptores. Estes acontecimentos provocam uma diminuição da produção de FSH e de LH, nas fêmeas, ou ICSH, nos machos, e, portanto, uma diminuição na actividade gonadal (Novotny et al., 2012).

Em geral, os agonistas da GnRH são uma excelente alternativa à gonadectomia, sendo recomendados em animais domésticos (cães e gatos) e em animais selvagens mantidos em cativeiro, para uma supressão reversível a longo prazo, cerca de 6 a 24 meses (Jewgenow et al., 2006a; Munson, 2006; Novotny et al., 2012). A sua baixa toxicidade permite tratamentos repetidos, podendo ser iniciados mesmo quando o efeito do último ainda não expirou (Purswell & Jöchle, 2010).

É importante mencionar que, quando os machos são submetidos a tratamento com estes análogos e continuam a copular, fêmeas que com eles co-habitem podem desenvolver doenças associadas a uma exposição prolongada à progesterona endógena, como já referido para a deferentectomia (Munson, 2006). Os efeitos secundários destes análogos são

fundamentalmente semelhantes aos de uma gonadectomia, já referidos, sendo no entanto reversíveis, quando o tratamento cessa (Massei & Miller, 2013).

Nos anos 1990, o agonista Leuprolide (Lupron Depot®) foi comercializado e utilizado com sucesso em diversas espécies. No entanto, como o produto foi aprovado para o tratamento de cancro da próstata no homem, o seu custo tornou-se muito elevado e, por isso, inalcançável ao uso veterinário (Purswell & Jöchle, 2010; Asa & Boutelle, 2012). No segundo milénio, surgiu a Deslorelina, contraceptivo para animais, menos dispendioso e ao alcance dos médicos veterinários (Gobello, 2007).

Deslorelina

A Deslorelina é um análogo e agonista, ou super-agonista, da GnRH. Os seus implantes, com o nome de Suprelorin®, foram aprovados para venda na União Europeia, em 2007 (Purswell & Jöchle, 2010). Aqueles promoveriam uma libertação lenta do produto, superior a 1 µg/dia, por um período aproximado de 1 ano, e por isso, seriam considerados de acção prolongada (Trigg et al., 2001; Herbert et al., 2004; Bertschinger, 2010). De referir que, a fim de serem utilizados em diferentes espécies, foram formulados com diferentes quantidades e dimensões (5 mg com 12,5 mm de comprimento e 2,3 mm de diâmetro, 6 mg com 2 cm de comprimento e 2,3 mm de diâmetro) (Trigg et al., 2001; Herbert et al., 2004).

Na maioria das espécies, a administração de Deslorelina provoca uma estimulação inicial sobre a adenohipófise, promovendo a produção e secreção de FSH e de LH ou ICSH, e, conseqüentemente, a ovulação nas fêmeas e, nos machos, um aumento pontual, de alguns dias, da concentração da testosterona plasmática e da produção de sémen. Este pico inicial de testosterona observado quando são realizadas medições desta hormona, pode provocar um aumento fugaz da agressividade do animal (Melville, Brien, Crichton, Theilemann & Mckinnon, 2012). Quando administrado por um período de tempo longo, o agonista da GnRH exógeno supera a GnRH endógena, ocorrendo uma dessensibilização dos receptores da GnRH das células gonadotróficas da adenohipófise e, conseqüentemente, ocorrendo uma diminuição da secreção daquelas hormonas (Novotny et al., 2012). Os baixos níveis hormonais promovem uma diminuição na actividade ovárica ou testicular. Nas fêmeas, ocorre uma diminuição da função ovárica e inibição do estro. Nos machos, regista-se uma redução de produção de testosterona e, conseqüentemente, da espermatogénese (Bertschinger, 2010; Melville et al., 2012). Como referido, a espermatogénese, prolonga-se por 6 a 8 semanas, na maioria dos mamíferos, e por isso, enquanto houver produção sustentável de testosterona, há espermatogénese (Asa & Porton, 2010). Quando a libertação desta hormona cessa, a

infertilidade não é imediatamente alcançada. Há ainda um período adicional de fertilidade enquanto ocorrer maturação e libertação dos espermatozóides previamente produzidos (Goericke-Pesch et al., 2011).

Deslorelina nos carnívoros domésticos:

Em gatos machos tratados com Suprelorin® (4,7 mg de Deslorelina), há um aumento inicial na concentração de testosterona plasmática que depois decresce para valores não detectáveis, o que só acontece por volta da semana 11 (Goericke-Pesch et al., 2011). O sémen recolhido e examinado, 1 mês após a colocação do implante, revela um aumento no número total de espermatozóides, número que diminui posteriormente, ao longo dos meses de tratamento. O tamanho dos testículos diminui e as espículas penianas tornam-se invisíveis aproximadamente às 9 semanas (Goericke-Pesch et al., 2011; Novotny et al., 2012). Considerando o ciclo da espermatogénese e a sua duração, de cerca de 46,8 dias no gato, presume-se que a fertilidade se mantenha por 2 a 3 meses, após a colocação do implante (Novotny et al., 2012). Relativamente ao comportamento sexual (lívido, monta e cópula), num estudo realizado por (Goericke-Pesch et al., 2011), este intensificou-se inicialmente (até próximo do dia 16) e depois decresceu, não revelando a maioria dos machos, qualquer interesse pelas fêmeas em cio. Foi realizada uma pontuação do comportamento sexual dos gatos na presença de fêmeas no cio ou noutra estádio, avaliando-se a lívido, as tentativas de cópula e as cópulas. Quatro semanas após o início do tratamento perderam o odor característico de gato inteiro e até à 11ª semana cessaram as marcações com urina, acontecimento que ocorre também em animais esterilizados. De realçar que, durante o tratamento, não houve aumento do peso corporal. No entanto, os agonistas podem provocar aumento de apetite e consequente ganho de peso e, portanto, a dieta deve ser controlada se este for um efeito indesejado (AZA contraception advisory group, 2003; Goericke-Pesch et al., 2011).

O efeito reversível da Deslorelina foi também comprovado em gatos, tendo-se avaliado diversos parâmetros depois da remoção do implante (4 meses depois da sua colocação). As concentrações de testosterona plasmática aumentaram gradualmente, demonstrando a reversibilidade do contraceptivo e, daí, a capacidade renovada das células de Leydig de produzirem testosterona. Os testículos aumentaram rapidamente de tamanho e a sua avaliação histológica, após um mês da remoção do implante, observou um rápido restabelecimento da espermatogénese (Novotny et al., 2012). Pode-se concluir que a Deslorelina numa dose de 4,7mg, é um contraceptivo eficaz e reversível em gatos (Goericke-Pesch et al., 2011; Novotny et al., 2012).

Em cães, a Deslorelina também provou ser eficaz. Em fêmeas, inibiu o estro por mais de 27 meses, não dependendo a duração da eficácia, do estágio do ciclo éstrico em que o animal se encontrava quando foi tratado (Massei & Miller, 2013). Em machos, os resultados foram semelhantes aos do gato, tendo diversos estudos comprovado que, naquela espécie, o implante tem uma duração mínima de 1 ano, sendo reversível e não provocando efeitos secundários indesejáveis (Junaidi, 2003; Trigg et al., 2001; Trigg, Doyle, Walsh & Swangchan-uthai, 2006). Foi registada uma variabilidade individual na resposta à Deslorelina, em diversas espécies, como no cão doméstico (*Canis lupus familiaris*), relativamente ao tempo que demora a iniciar o efeito e, também, à duração do mesmo. O peso corporal, o estado nutricional, a taxa metabólica, a quantidade de receptores da GnRH e o estatuto social do indivíduo podem ser factores que contribuem para essa variabilidade (Trigg et al., 2006; Melville et al., 2012).

Em cães machos a Deslorelina foi eficaz na supressão de agressividade (Purswell & Jöchle, 2010). No entanto, este comportamento, assim como a libido, podem persistir, uma vez que podem estar relacionados com a experiência anterior (como no caso de machos sexualmente experientes), sendo independentes das concentrações sanguíneas de testosterona (Asa & Boutelle, 2012).

Deslorelina nos carnívoros selvagens

A Deslorelina foi testada em algumas espécies de carnívoros selvagens tendo sido comprovado o seu efeito como contraceptivo em várias como em leões, fêmeas de leopardo e de chita e, nos machos desta última espécie e de mabecos. A duração do efeito parece ser maior nos machos do que nas fêmeas e o seu uso não é aconselhado em leões machos devido aos efeitos negativos prováveis, tanto no comportamento territorial, como nas características sexuais secundárias masculinas dependentes da testosterona (Bertschinger et al., 2002).

Em machos de chita (*Acinonyx jubatus*) aplicando um implante de 6 mg de Deslorelina verificou-se que após 6 semanas ainda existiam espermatozóides normais no ejaculado, sendo, no entanto, a concentração plasmática de testosterona já indetectável. Após 12 meses de tratamento procedeu-se à re-avaliação dos machos. À observação, os testículos apresentavam-se pequenos e duros ao toque e as espículas penianas eram praticamente invisíveis. Este último parâmetro é considerado um bom indicador da eficácia do tratamento, uma vez que reflecte o efeito supressivo na produção de testosterona. A concentração plasmática desta hormona apresentava valores mínimos. À electroejaculação não se detectaram

espermatozóides viáveis e o volume de ejaculado obtido foi, substancialmente, menor, do que o recuperado antes do tratamento (Bertschinger et al., 2002). Nesta espécie, um implante com 6 mg teve eficácia entre 1 e 2 anos, podendo ser utilizado repetidamente a cada 12 meses na mesma dose, sem revelar efeitos secundários (Bertschinger et al., 2002; Bertschinger, Jago, Nöthling, & Human, 2006). A hierarquia dentro dos grupos de machos tratados não foi afectada e o comportamento sexual foi, eficazmente, suprimido, não tendo sido observadas tentativas de cópula (Bertschinger et al., 2006).

Em machos de mabecos (*Lycaon pictus*) a Deslorelina também foi eficaz, tendo, no entanto, um implante com a mesma dose, uma menor duração, de apenas 12 a 16 meses, em comparação com as chitas. De realçar que, nesta espécie, foi observado, que a marcação com cheiro continuou. Este comportamento que se pensava dever-se à conversão no cérebro da testosterona em estradiol pode, no entanto, ser um comportamento padrão aprendido na vida fetal, ou durante a puberdade. Continuando a ocorrer mesmo quando as concentrações de testosterona diminuem (Bertschinger et al., 2002).

Em geral, em carnívoros selvagens, o resultado em machos parece ser mais fidedigno se estes não forem expostos a fêmeas em cio, nas primeiras 6 semanas de tratamento (Bertschinger et al., 2002). Estudos anteriores revelaram que, poderá ocorrer uma perda de peso devido à perda da massa muscular, se esta não for substituída por tecido adiposo e em espécies com dimorfismo sexual: os machos podem ficar com um tamanho (peso) semelhante ao das fêmeas (AZA wildlife contraception center, 2003).

Recentemente, descobriu-se que, em fêmeas de 7 espécies de carnívoros selvagens, incluindo o lobo-vermelho (*Canis rufus*), mabecos (*Lycaon pictus*) e raposas-do-deserto (*Vulpes zerda*), tratadas com Suprelorin®, ocorreu um maior número de casos de hiperplasia do endométrio e piómetra, do que com qualquer outro método contraceptivo, incluindo o implante de MGA (Asa et al., 2012). O agonista da GnRH, provoca um pico inicial de estrogénios que, seguido de dois meses de concentrações elevadas de progesterona, tem um efeito sobre o útero, maior do que, o estrogénio ou a progesterona, por si sós, e portanto, maior do que um tratamento prolongado com progestagénios (Asa et al., 2013). Se o tratamento com Suprelorin® for realizado juntamente com a administração oral de MA (p.ex.: Ovaban®), previne-se a fase de estimulação inicial e o número de casos com complicações uterinas diminui. Assim, para fêmeas de carnívoros selvagens, actualmente só se recomenda o uso deste contraceptivo se puder ser administrado MA nos 7 dias anteriores e nos 7 dias posteriores à colocação do implante (Asa et al., 2012; Asa et al., 2013).

Presentemente admite-se que, a duração do efeito de Suprelorin® em canídeos e felídeos selvagens seja, aproximadamente, o dobro do mínimo apresentado pelo produtor, como foi reportado para cães domésticos (Junaidi, 2009). Isto é, um implante de 4,7 mg com uma duração mínima de 6 meses é, normalmente, eficaz por um período de 1 ano e, um implante de 9,4 mg, com um mínimo de 1 ano de eficácia, dura 2 anos aproximadamente (Asa et al., 2012).

Deslorelina noutras espécies

Em algumas outras espécies, o uso de Deslorelina não parece ter efeito contraceptivo. Na espécie de cangurus *Macropus eugenii* pensa-se que, o mecanismo que regula a secreção da testosterona, seja diferente, ocorrendo de igual forma a dessensibilização da hipófise à GnRH, mantendo-se porém, níveis de ICSH (LH) capazes de sustentar a actividade testicular (Herbert et al., 2004). Nos touros, os de níveis de ICSH (LH) também se mantiveram ou aumentaram ligeiramente, provocando as respectivas alterações na concentração de testosterona. Nesta espécie, supõe-se ser a hipófise insensível à GnRH endógena e exógena, não sendo o mecanismo responsável por isso ainda totalmente conhecido (D'Occhio & Aspden, 1996).

2. Antagonistas

Os antagonistas da GnRH são substâncias que se ligam aos receptores gonadotróficos da hormona mas que não os activam, impedindo que as moléculas endógenas da GnRH se liguem e actuem. Quando estas substâncias são administradas há uma interrupção, imediata, da libertação de gonadotrofinas, não ocorrendo o pico inicial como sucede com os agonistas. Consequentemente, a inibição gonadal é mais rápida, assim como, a reversibilidade do efeito, pois uma vez terminando o tratamento, a hipófise continua sensível à administração da GnRH exógena e seus agonistas (Gobello, 2007). O grau e a duração do efeito dependem da quantidade de antagonista administrada, facto que não se verifica com os agonistas. Com aqueles, o efeito resulta da ocupação dos receptores, enquanto que com os agonistas, há uma regulação negativa nesses mesmos receptores (D'Occhio & Aspden, 1996). Se o tratamento com estes for prolongado, pode também ocorrer regulação negativa (Gobello, 2007).

Os antagonistas, que foram desenvolvidos com o intuito de evitar o estímulo inicial que ocorre com os agonistas, não têm sido muito comercializados devido à dificuldade em criar formulações de libertação prolongada. Para que o seu uso seja recomendado com segurança, precisam de ser realizados mais estudos (Gobello, 2012).

Em geral, as principais vantagens dos análogos da GnRH são a sua eficácia contraceptiva em machos e fêmeas de diferentes espécies e a sua reversibilidade (Munson, 2006). Consequentemente é um tipo de contraceptivo cada vez mais requisitado por médicos veterinários. As principais desvantagens são o seu custo, a estimulação inicial do sistema reprodutivo, (agonistas) e portanto, o atraso na inibição gonadal (cerca de 7 a 14 dias), e ainda, a elevada variabilidade individual na duração da contracepção (Gobello, 2007; Purswell & Jöchle, 2010). Relativamente à duração do efeito, ela pode ser muito variável, podendo o desconhecimento do período de eficácia conduzir a conclusões erradas relativamente à reversibilidade. Tem-se em consideração o período mínimo em que o implante é eficaz, podendo no entanto o mesmo prolongar a sua actividade para além desse período (Asa & Porton, 2010).

1.4.3.2.2 Vacinas imunocontraceptivas

Outros exemplos de contraceptivos são as vacinas imunocontraceptivas. Os imunocontraceptivos baseiam-se na promoção de uma resposta auto-imune que bloqueie a fertilidade, neutralizando as proteínas que estão envolvidas em processos críticos da reprodução (Bertschinger, 2010). Diversos são os antígenos já utilizados nas vacinas imunocontraceptivas, tais como, os de superfície do esperma, do oócito (zona pelúcida), a hormona GnRH e as gonadotrofinas (FSH e LH) e os seus receptores (Jewgenow et al., 2006a). As vacinas mais utilizadas em animais domésticos e selvagens são as da zona pelúcida e as da GnRH (Massei & Miller, 2013).

Estas últimas consistem em péptidos modificados da hormona, conjugados com proteínas “estranhas” ao organismo (p.ex.: hemocianina de *Megathura crenulata*) o que aumenta a sua antigenicidade. No animal alvo, estimulam a produção de anticorpos neutralizantes da GnRH e, se o título de anticorpos anti-GnRH for suficiente, neutralizam a GnRH hipotalâmica (endógena), bloqueando a capacidade desta hormona em estimular a secreção de gonadotrofinas pela adenohipófise. Inibem a reprodução em ambos os sexos (Bertschinger, 2010). No entanto, nos machos a sua principal utilização é para a supressão da secreção de testosterona, responsável pelas características sexuais secundárias (Asa, 1993; Massei & Miller, 2013). Estas vacinas, em teoria reversíveis e fáceis de administrar à distância, poderão ser utilizadas no controlo da agressividade dos machos selvagens e em cativeiro (Bertschinger, 2010; Asa & Boutelle, 2012). Porém, como existe uma grande disparidade de

resposta imunitária para cada espécie, será necessário adaptar protocolos vacinais específicos, o que se pode tornar desvantajoso (Jewgenow et al., 2006a).

1.4.3.2.3 Mecanismos contraceptivos:

Os mecanismos contraceptivos, como o nome indica, promovem uma contracepção mecânica. Actuam como barreiras físicas, evitando que o esperma ou o óvulo atinjam certas zonas do aparelho genital (Barfield, Nieschlag & Cooper, 2006).

Os mecanismos mais comuns na contracepção animal são os chamados *vas plugs* (tampões de vaso). Desenvolvidos por Zaneveld em 1988, os *vas plugs* surgiam como uma tentativa de contracepção reversível. O silicone era injectado no ducto deferente que se tornava rígido, formando uma barreira à passagem do esperma (Asa, 1993). Estes contraceptivos eram eficazes na interrupção da passagem do esperma. Porém, devido à reacção inflamatória local daí resultante, não eram reversíveis (Asa & Porton, 2005; Barfield et al., 2006; Munson, 2006). Para além disso, a necessidade de uma microcirurgia complexa para os colocar tornava impraticável recorrer a estes mecanismos (Asa & Porton, 2005; Barfield et al., 2006; Munson, 2006). É de referir que, os *vas plugs* foram testados em diversos animais selvagens, incluindo felídeos, marsupiais, primatas e ungulados (Asa, 1993). A título de curiosidade, Zaneveld experimentou ainda colocar *plugs* pré-formados nos animais. Contudo, esse procedimento revelou ser inadequado dado as diferenças morfológicas individuais relativamente aos ductos (Asa, 1993).

1.4.3.2.4 Contraceptivos químicos:

Muito estudados nas últimas décadas, os injectáveis intratesticulares, são contraceptivos químicos injectados nos testículos, epidídimo ou ductos deferentes. Os produtos mais comercializados têm como base zinco (gluconato de zinco) ou cálcio (cloreto de cálcio), eletrólitos constituintes do plasma seminal e dos tecidos do órgão reprodutor dos machos (de Souza, Lopes & Bicudo, 1999). Os injectáveis intratesticulares actuam por destruição irreversível das células germinativas e das células produtoras de hormonas, provocando esclerose testicular e, conseqüentemente, azoospermia (ausência de espermatozóides no ejaculado) ou aspermia (ausência de esperma) e infertilidade (Purswell & Jöchle, 2010; Massei & Miller, 2013). Causam inflamação na zona testicular, que pode persistir por algum tempo e, para além disso, e do desconforto durante a injeção, têm como desvantagens demorarem cerca de 4 a 6 semanas a fazerem o efeito desejado e de requererem um desenho específico para cada espécie (ACC&D, 2013). Como não envolvem a remoção dos testículos,

a testosterona não é totalmente inibida e, portanto, as características sexuais secundárias podem continuar a ser expressas (Massei & Miller, 2013). As vantagens mais significativas destes injectáveis são o seu baixo custo e a sua fácil administração. O seu uso foi testado em cães e gatos, não sendo, no entanto, aprovado na Europa. São utilizados no resto do mundo, principalmente, em campanhas de esterilização em grande escala, destes animais (ACC&D, 2013; Massei & Miller, 2013).

Para além dos injectáveis intratesticulares, existem contraceptivos químicos orais, sendo o melhor exemplo, o bisdiamine. Este é um contraceptivo amebicida cujo alvo é o epitélio germinativo masculino (Munson, 2006). Actua apenas na espermatogénese e não na produção de testosterona, sendo eficaz, seguro e reversível. O primeiro teste em animais selvagens foi realizado em lobos em cativeiro, tendo sido administrado diariamente, com a comida. Promoveu supressão da espermatogénese, sem alterações do comportamento e o efeito foi reversível (Asa, 1993). Em animais domésticos, foi testado em gatos, tendo sido satisfatórios os resultados e análogos aos obtidos com lobos. Embora seguros e eficazes nos gatos machos, a sua administração deve ser cuidadosa tendo atenção que só o macho o ingere, uma vez que nas fêmeas gestantes podem ter efeitos teratogénicos (Munson, 2006). Apesar da sua eficácia e reversibilidade nos machos, este medicamento não é utilizado como contraceptivo pelos médicos veterinários devido ao seu elevado custo (Munson, 2006).

1.4.3.3 Considerações relativas aos diferentes métodos

Para felídeos e canídeos selvagens, o grupo de aconselhamento de contracepção da AZA recomenda como métodos contraceptivos, a esterilização cirúrgica e o uso de agonistas da GnRH, nomeadamente o Suprelorin® (implantes de Deslorelina) ou o Lupron® (acetato de leuprolida injectável) sendo em seu entender, os mais eficazes e seguros (AZA wildlife contraception center, 2003).

Relativamente à agressividade, a esterilização é o método mais eficaz para reduzir o teor de androgénios. No entanto, ela nem sempre está relacionada com estas hormonas e, portanto, o efeito da esterilização pode ser variável. Os progestagénios provaram ser eficazes na redução da agressividade entre cães, mas nem sempre modificam esse comportamento em relação aos proprietários. Os análogos da GnRH (agonistas e antagonistas) são seguros e eficazes no controlo da agressividade, uma vez que inibem a produção de testosterona (Asa, 1993; Asa & Porton, 2005).

1.4.4 Aplicações da contracepção em programas de conservação *ex-situ*

Nos programas de conservação *ex situ*, onde se encontram animais selvagens mantidos em cativeiro, pode tornar-se necessário controlar a reprodução para gestão populacional, genética e do bem-estar dos animais. O contraceptivo ideal para animais selvagens deve ser eficaz, duradouro, possível de administrar à distância, ou numa só aplicação sob anestesia, e reversível. Deve ter nenhum ou pouco efeito no comportamento social ou na organização hierárquica; não ter efeitos secundários indesejáveis a curto e a longo prazo e ter custos de produção e aplicação acessíveis (Junaidi, 2003; Bertschinger, 2010).

1.4.4.1 Gestão populacional

Apesar de ser comum pensar que quanto maior o número de animais melhor, os programas de conservação, em cativeiro, têm sempre limitações de espaço. As instalações quando criadas são calculadas para um número máximo específico de indivíduos e, normalmente, não podem ser ampliadas (Vargas et al., 2009). Para além disso, qualquer que seja o estatuto de conservação dos animais em questão, podem sempre tornarem-se excedentes, ou seja, desnecessários para os objectivos do programa (Carter & Kagan, 2010). De referir que, uma espécie em cativeiro tende a crescer como população mais rapidamente do que no *habitat* natural, uma vez que, no primeiro caso, normalmente, a taxa de mortalidade é menor e o sucesso reprodutivo da fêmea é maior (Leus & Lacy, 2009). No caso específico do programa de conservação *ex situ* do lince-ibérico, o sucesso reprodutivo pode ser maior do que o esperado, obtendo-se um número de indivíduos aptos à reintrodução superior ao estimado a reintroduzir na natureza, nesse ano. Esses animais serão, então, excedentários, tendo provavelmente de ser mantidos nas instalações que não têm espaço suficiente para os albergar (Godoy, Casas & Fernández, 2009). A contracepção pode, nesse caso, ser utilizada para o manejo responsável da população, para a redução substancial do número de indivíduos desnecessários ao programa (Carter & Kagan, 2010).

1.4.4.2 Gestão genética

Em termos genéticos, para que se mantenha uma população saudável (em cativeiro e a de futura reintrodução), com o mínimo de defeitos e/ou de doenças hereditárias e com o máximo de variabilidade genética, é necessário gerir essa população. Em programas com animais criticamente ameaçados, como é o caso do lince-ibérico, os pares reprodutores têm de ser escolhidos considerando o seu valor genético (com base na genealogia dos animais). Os mais valiosos, deste ponto de vista, devem-se reproduzir mais, em detrimento dos menos valiosos

(sobrerepresentados ou geneticamente deficientes), que se pretende que se reproduzam menos (Godoy, et al., 2009; Asa & Porton, 2010; Asa et al., 2012). Para este efeito, pode utilizar-se a contracepção nos animais menos valiosos.

1.4.4.3 Gestão do bem-estar

As questões de comportamento e bem-estar também são importantes quando se elabora um plano reprodutivo nestes programas. Pretende-se que, os animais em cativeiro mantenham os seus comportamentos naturais, dado que a sua alteração pode pôr em causa os objectivos do programa. Alterações de comportamento podem ser pontuais, mas também prolongadas e aprendidas por toda a população, podendo mesmo ser transmitidas aos descendentes. Situações de *stress*, normalmente, provocam alterações do comportamento dos animais e, por isso, devem ser evitadas. A sobrepopulação de animais na mesma instalação, ou em instalações próximas, pode ser uma das razões deste tipo de situações. Portanto, também neste caso para evitar o excesso de animais e para que os existentes tenham boas condições de vida, devem ser utilizados métodos contraceptivos (Godoy, et al., 2009; McPhee & Carlsteaad, 2010).

1.5 Comportamento

1.5.1 Avaliação comportamental

Existem vários métodos para se avaliar o comportamento de animais em cativeiro, tais como, o método de observação contínua (total ou por intervalos de tempo), o método de varrimento (*scan*) e o método pontual (oportunístico) (Lehner, 1996).

1.5.1.1 Método focal de observação contínua

O método focal de observação contínua baseia-se no seguimento de um indivíduo, ou de um grupo específico de indivíduos, que é seguido em todo o espaço físico possível durante um determinado período de tempo (sessão) (Altman, 1974). Uma vez que, todas as acções do animal são registadas durante a sessão, esta forma de amostragem permite registar estados e eventos, obtendo-se dados completos e precisos, relativamente à frequência e duração dos comportamentos. Refira-se que, um estado é um comportamento em que é fácil para o observador perceber quando começa e quando acaba (comportamento com uma duração significativa) e, um evento é uma alteração entre estados, aproximando-se de uma ocorrência instantânea que acontece tão rapidamente que o observador só a regista como tendo ocorrido (comportamento momentâneo) (Lehner, 1996).

1.5.1.2 Método de varrimento (*Scan*)

Segundo Lehner (1996), a recolha de dados por *scan* é um método de amostragem instantâneo pelo qual os indivíduos são observados em períodos pré-determinados e o seu comportamento é registado. Este método permite que o observador registre dados comportamentais relativamente precisos para um número relativamente elevado de animais, e é muito útil para estimar a percentagem de tempo que um indivíduo gasta nas diversas actividades. É muito eficiente para avaliar estados de comportamento mas não é recomendado para eventos, dado que os eventos comportamentais são instantâneos assim como os pontos de recolha de amostragem e logo a probabilidade de acontecerem os 2 simultaneamente, é muito remota (Lehner, 1996).

1.5.1.3 Método pontual (oportunistico)

O método pontual ou oportunistico baseia-se na recolha de todos os dados de um determinado comportamento, ou de vários comportamentos específicos (p.ex.: comportamentos de interacção), em todos os indivíduos e sempre que estes comportamentos são observados (Altman, 1974).

2. Objectivos

2.1 Objectivo do estudo

O principal objectivo do estudo foi o de avaliar a ocorrência de alterações provocadas por implante de Deslorelina aplicado num macho de lince-ibérico: alterações comportamentais, fisiológicas e clínicas. Assim, como tentar avaliar se o contraceptivo foi eficaz nesta espécie.

2.2 Razões para a aplicação de um contraceptivo num lince-ibérico

Como já referido, os animais em cativeiro estão protegidos das suas maiores causas de morte natural, como sejam a predação e as doenças e assim, a sobrepopulação é mais fácil de ocorrer (Carter & Kagan, 2010). Sendo o lince-ibérico uma espécie criticamente ameaçada o uso de um contraceptivo nesta parece incongruente. No entanto, o número de indivíduos está a aumentar, podendo futuramente ocorrer nos centros, uma sobrepopulação. De referir que, alguns exemplares já se encontram em jardins zoológicos (p. ex.: o sujeito do estudo (Gamma) que se encontra no Jardim Zoológico de Lisboa desde Dezembro de 2014), locais onde, por vezes, por questões de bem-estar e de espaço, não se pretende a reprodução. O uso de um contraceptivo nestes sítios pode permitir também a co-habitação de animais que, em situação normal, não poderiam partilhar o mesmo espaço (p. ex.: macho e fêmea não

escolhidos para reprodução). Alguns lince pelo seu perfil genético (sobrerrepresentados no programa ou portadores de doenças potencialmente genéticas) não são bons exemplares para reproduzir ou reintroduzir. Porém, um exemplar que não é ideal para reprodução num momento pode sê-lo noutra, dependendo da futura evolução da composição genética e demográfica do programa. As flutuações de populações e mesmo o desaparecimento de uma população pode tornar um exemplar que, inicialmente, não tinha muito valor reprodutor, num animal ideal para reprodução. Tendo em conta estes factores, o controlo da população de lince, futuramente, pode ser necessário, sendo o ideal recorrer a um contraceptivo reversível. Com o intuito de testar a eficácia, tempo de duração e ocorrência de efeitos secundários de um contraceptivo reversível, este foi colocado num lince-ibérico macho.

2.3 Razões para a aplicação num macho

Normalmente, a contracepção é dirigida às fêmeas dado que os acontecimentos que levam à oogénese, ovulação, transporte de gâmetas e implantação demoram vários dias, mas são mais fáceis de interromper do que a espermatogénese e a maturação do esperma no epididimo, que é um processo contínuo (Jewgenow et al., 2006a; Munson, 2006; Asa & Porton, 2010). No CNRLI, o objectivo principal é a reprodução e, portanto, como todas as fêmeas eram saudáveis e aptas a reproduzir, foi escolhido um macho como sujeito em estudo.

3. Material e Métodos

3.1 Sujeito em estudo

Quando o presente estudo teve início, o CNRLI albergava 16 lincez adultos: 7 fêmeas (Azahar, Biznaga, Castañuela, Era, Flora, Fresa e Fruta) e 9 machos (Calabacín, Drago, Enebro, Éon, Fresco, Fado, Fauno, Foco e Gamma). A escolha do animal para colocação do implante foi feita tendo em conta os objectivos principais do centro, como já referido. De entre os vários machos, o Gamma foi o escolhido (Figura 2). Este animal é um macho adulto nascido em 2010, que de acordo com o Grupo de Aspectos Genéticos e Demográficos do Comité de Cria em Cativeiro do lince-ibérico, não deve ser reproduzido porque, potencialmente, é portador de uma doença de carácter genético (epilepsia juvenil idiopática) (Anexo I). Para além disso, actualmente, a sua linha genética está sobrerrepresentada no programa e, por isso, o seu valor genético é baixo, não interessando reproduzir. É importante referir que, sendo a primeira vez que se utiliza este contraceptivo nesta espécie, não existia qualquer informação prévia sobre o potencial impacto do contraceptivo no futuro dos reprodutores. Devido aos factores já referidos, o risco da utilização do contraceptivo neste animal foi considerado aceitável. Dado não se poder prever se futuramente a sua linha genética poderá ser necessária, optou-se por um mecanismo reversível de contracepção.

Figura 2 - Sujeito em estudo (Gamma) nas instalações do CNRLI.



(Foto gentilmente cedida por Vanessa Requeijão)

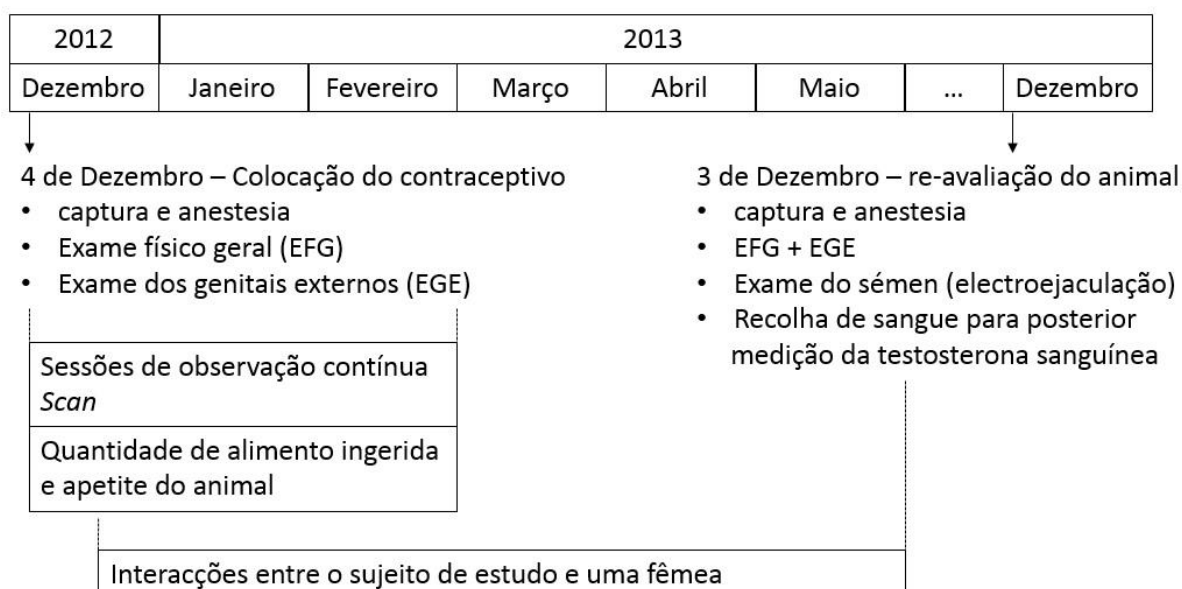
3.2 Método contraceptivo

O método contraceptivo reversível escolhido foi a Deslorelina, análogo e agonista da GnRH. Os procedimentos irreversíveis (gonadectomia, mecanismos contraceptivos e injectáveis intratesticulares) ou aqueles cuja reversibilidade não é segura (vacinas imunocontraceptivas), não foram uma opção, uma vez que não se pretendia a exclusão do animal do fundo genético. Dos contraceptivos hormonais, os progestagénios revelaram efeitos nocivos em felídeos e a sua acção sobre a espermatogénese não é clara. Os androgénios, normalmente, não são aconselhados em animais selvagens, pois podem provocar um aumento na agressividade e têm efeitos diferenciados nos machos. Os análogos da GnRH, nomeadamente a Deslorelina, são referidos pelo grupo de aconselhamento de contracepção da AZA como o método reversível mais eficaz e seguro para felídeos selvagens, sendo recomendados para uma contracepção a longo prazo. Os seus efeitos secundários, em machos, são normalmente inofensivos e cessam com o final do tratamento. A Deslorelina como implante, já foi utilizada em machos de chitas e leões, e a sua eficácia e reversibilidade foi comprovada.

Das diversas formas de administração de contraceptivos, a escolhida foi por colocação de um implante, uma vez que o tempo de duração é prolongado e por se tratar da forma mais utilizada para a administração de Deslorelina a animais selvagens.

Antes de se referirem os procedimentos (para colocação do contraceptivo e para re-avaliação do animal) e os métodos de avaliação dos efeitos do contraceptivo, sumarizam-se os acontecimentos por ordem cronológica (Figura 3).

Figura 3 - Cronograma do estudo



3.3 Procedimento para colocação do contraceptivo

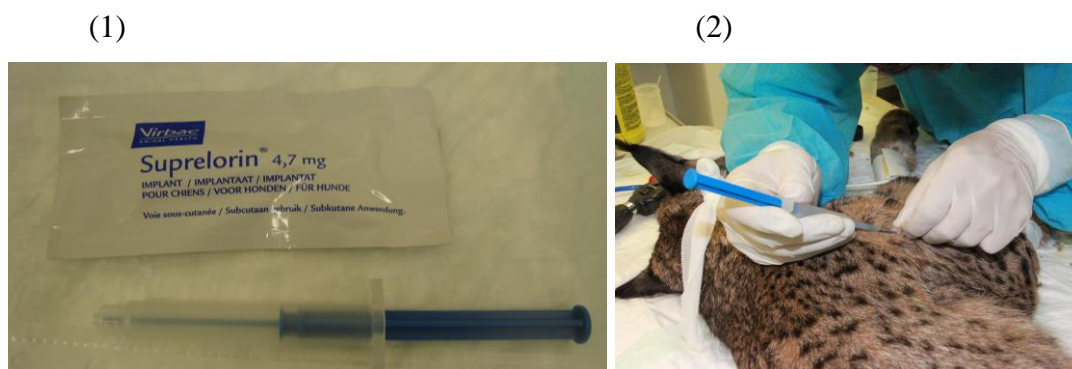
Para se proceder à colocação do contraceptivo, no dia 4 de Dezembro de 2012 (Figura 3) o sujeito em estudo foi capturado com jaula de captura no campo do seu cercado e transposto para a clínica do CNRLI. A indução anestésica foi realizada com uma combinação de dexmedetomidina (Dexdomitor®, 0,56 ml, 20 µg/kg) e Midazolam (1,12 ml, 0,4 mg/kg), administrada por via intra-muscular ao animal, ainda na jaula de captura. De referir que se usou um protocolo de anestesia sem quetamina e com administração precoce de isoflurano, por se tratar de um animal com historial de epilepsia e para prevenir convulsões secundárias à administração daquele fármaco. Antes de ser colocado o implante, realizou-se uma tricotomia com tesoura e máquina, na zona da omoplata direita do animal. Limpou-se a zona dos pêlos ainda presentes e procedeu-se à desinfeção (primeiro com álcool, depois com Betadine® e novamente com álcool) (Figura 4). Em seguida, procedeu-se à inserção do implante (Suprelorin®, 4,7 mg), como referido no resumo das características do medicamento em anexo (Anexo II) e então, uma vez mais, foi feita a limpeza e desinfeção da área (apenas com álcool). Por fim, aplicou-se na zona cola de tecidos moles Histoacryl® (Figura 5 e Figura 6).

Figura 4 – Preparação para colocação do implante: (1) realização de tricotomia, (2) realização de desinfeção, (3) zona preparada para colocação do implante.



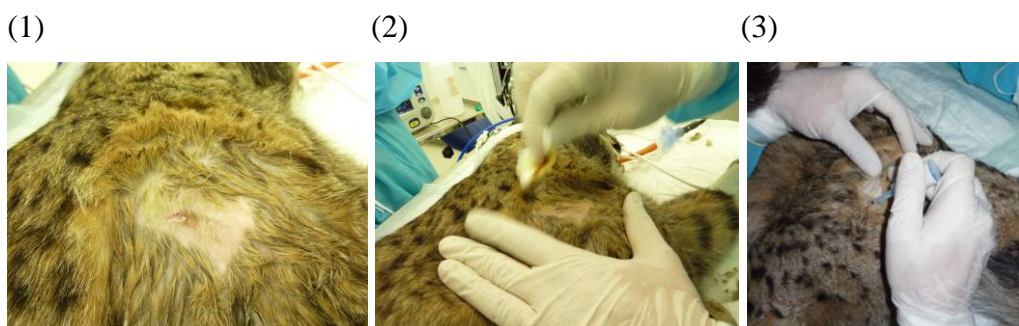
(Fotos originais)

Figura 5 – (1) Implante de Suprelorin®, (2) colocação do implante.



(Fotos originais)

Figura 6 – Após a colocação do implante: (1) zona onde foi colocado o implante, (2) realização de desinfecção, (3) aplicação de cola de tecidos moles.



(Fotos originais)

3.4 Procedimento para re-avaliação do animal depois da colocação do contraceptivo

Para se proceder a uma re-avaliação do sujeito em estudo, o animal foi capturado no dia 3 de Dezembro de 2013 (Figura 3). O procedimento para captura, anestesia e sedação foi semelhante ao referido para a anestesia de 2012. Como se pretendia realizar uma colheita de

sémen, o animal foi anestesiado com dexmedetomidina (Dexdomitor®, 0,7 mL, 25 µg/kg), Butorfanol (0,07 mL, 0,1 µg/kg) e quetamina (Imalgene® 1000, 0,49 mL, 3,5 mg/kg) por via intra muscular, através da jaula de captura. Neste caso, usou-se um protocolo de anestesia diferenciado, sem Midazolan, para evitar o risco de contaminação das amostras de sémen com urina. Por se tratar de um animal com historial de epilepsia, optou-se pela administração preventiva deste fármaco, Midazolan, no final do procedimento.

3.5 Métodos de avaliação dos efeitos do contraceptivo

Para se estimar os efeitos do método contraceptivo aplicado, foram avaliados vários parâmetros que a seguir se analisam. De referir que, o tempo de estudo, foi de 3 meses, com início em Dezembro de 2012, com a colocação do implante e final, em Fevereiro de 2013 (Figura 3). A anestesia de re-avaliação e a união com a fêmea ocorreram posteriormente, e as interações observadas para o casal em estudo ocorreram neste período e posteriormente. O macho permaneceu no mesmo cercado (cercado 9), de 5 a 13 de Dezembro de 2012, tendo acesso alternado a todo a sua área ou apenas a parte dela. No dia 13 de Dezembro de 2012 foi transferido para o cercado 8 e no dia 27 de Fevereiro de 2013 foi para o cercado 7, tendo igualmente, acesso ao corredor de intercomunicação (ci) do cercado 7 para o cercado 8 (Anexo III: Descrição dos cercados, Figura 10 e Figura 11).

A anestesia de re-avaliação ocorreu no dia 3 de Dezembro de 2013, a união do macho com a fêmea, no dia 9 de Maio de 2012, sendo que as interações para o casal foram observadas desde dia 16 de Dezembro de 2012 até ao dia 31 de Maio de 2013 (Figura 3).

3.5.1 Ingestão de comida e apetite do sujeito em estudo

Para se avaliar a ocorrência de alterações na ingestão de comida provocadas pelo contraceptivo, foram analisados o apetite do sujeito e o volume ingerido de alimento. O animal foi alimentado pelos tratadores durante o maneio com o regime normal. A avaliação do apetite foi realizada pela equipa de tratadores segundo a escala: muito apetite - animal come de uma só vez, logo que o alimento lhe é disponibilizado, apetite médio - come em 24 horas todo o alimento disponibilizado e pouco apetite - não come todo o alimento disponibilizado em 24 horas, deixando restos.

Nota: É importante referir que, para controlo da epilepsia, o sujeito do estudo ingeriu uma vez por dia uma dose de 7,5 mg de Fenobarbital, que não sofreu qualquer alteração ao longo do estudo. O medicamento foi incorporado em parte do alimento, aproximadamente 50g de coelho morto, e foi-lhe oferecido diariamente pelos tratadores, mesmo nos dias de jejum.

3.5.2 Comportamento

Para avaliação do comportamento do animal foi utilizado o sistema de videovigilância. Diversas câmaras presentes nos cercados permitiram a monitorização não condicionada dos animais, 24 horas por dia, a partir da sala de coordenação.

Neste trabalho, o comportamento do macho foi avaliado recorrendo-se aos 3 tipos de métodos mencionados na revisão teórica (focal de observação contínua, de varrimento – *Scan*, pontual - oportunístico). Foram recolhidos pela aluna os dados das sessões de observação contínua do macho, do *scan* realizado diariamente por toda a equipa de etologia e ainda das fichas de interacção realizadas para o casal do estudo. A avaliação do comportamento foi realizada de Dezembro a Fevereiro, para não afectar o trabalho da equipa de etologia/videovigilância na época de partos, com início em Março. As interacções entre o sujeito e a fêmea escolhida, foram especialmente avaliadas, posteriormente, a este período com o mesmo intuito de, não afectar a normalidade dos trabalhos do CNRLI. No presente trabalho, tentou avaliar-se os padrões de actividade e inactividade do animal, a frequência das suas marcações e as suas interacções com uma fêmea.

3.5.2.1 Sessões de observação contínua

Para se estudar o comportamento do animal em questão, utilizou-se um método de amostragem focal contínuo. As sessões de observação contínua foram efectuadas pela aluna e pela restante equipa de videovigilância, tendo-se determinado que as sessões teriam uma duração de duas horas. O início de cada sessão foi escolhida ao acaso, excluindo-se as horas de maneio e de possível intervenção de tratadores e médicos veterinários nos cercados (das 08:00 às 12:00 e das 16:00 às 18:00) a fim de não afectar o trabalho do videovigilante nas suas tarefas diárias. No entanto, mesmo respeitando esses períodos, foram realizadas parcialmente 4 sessões e 17 não foram sequer realizadas por incapacidade do videovigilante monitorizar as suas tarefas em conjunto com as gravações das sessões. Não foram realizadas as sessões dos dias 6, 7, 8, 9, 10 e 11 de Dezembro, 2, 15 e 16 de Janeiro e 3, 13, 15, 20, 23, 26, 27 e 28 de Fevereiro.

As gravações foram realizadas recorrendo-se a uma câmara do cercado 9 (campeio) e a 4 câmaras do cercado 8 (maneio-campeio, parideira do maneio grande, superior e inferior do edifício parideira).

As gravações das sessões foram visualizadas posteriormente pela aluna, que registou todos os comportamentos revelados pelo animal naquele período, obtendo a ocorrência, duração e

sequência de estados e eventos. Para registo dos comportamentos foi utilizado o etograma da espécie empregue diariamente na videovigilância do CNRLI com algumas modificações realizadas pela aluna, orientador e co-orientador e restante equipa de etologia (Anexo IV). O etograma original da espécie foi redigido em Castelhana e, portanto, para facilitar o trabalho e nomeadamente a utilização das siglas no preenchimento do etograma, a aluna utilizou as siglas originais que aparecem entre parêntesis nas definições do etograma. Quando foi necessário e para melhor compreensão das siglas, surge na definição do comportamento a palavra em Castelhana, em itálico. Todas as categorias de actividade foram contabilizadas para posterior análise de dados, nomeadamente o tempo fora de vista (fv), uma vez que neste período não se podia inferir se o animal estava ou não activo.

3.5.2.2 *Scan*

Para comparação do comportamento do sujeito em estudo com os restantes machos adultos do CNRLI (Calabacin, Drago, Éon, Enebro, Fado, Fauno, Foco e Fresco), utilizaram-se os dados recolhidos pela equipa de videovigilância através do *scan* diário. No *scan* diário tenta-se registar o comportamento de cada animal a cada hora, devendo o tempo, entre recolha de dados para um mesmo indivíduo, ser de aproximadamente 60 minutos. É realizado um varrimento completo do campeio na procura de cada animal que, quando localizado, deve ser observado por 10 segundos (este período aumenta se o animal estiver em movimento) para que o comportamento seja interpretado correctamente. Se o lince demonstrar mais do que um comportamento, o registado deve ser o que o animal apresentou logo no início da observação. O *scan* está estruturado em 12 categorias de informação (data, hora, minuto, observador, clima, lince, actividade, comportamento, localização, factor externo, elemento de enriquecimento ambiental e observações) que devem ser completadas a cada intervalo horário, para cada exemplar. Este método de amostragem e registo é uniforme para todos os centros de reprodução sendo muito importante seguir exhaustivamente as instruções para manter a homogeneidade (Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico, 2013).

Com os dados recolhidos por este método, foi avaliada a frequência relativa das diversas categorias de actividade (actividade (a), inactividade (i), fora de vista (fv), sem câmara (sc), não identificado (ni), soma de fora de vista, sem câmara e não identificado (fv+sc+ni)) e a frequência absoluta de marcações realizadas para cada animal. Para a comparação dos valores do sujeito em estudo com os outros machos foi calculado para cada mês do estudo, um valor médio dos resultados obtidos para os restantes. Normalmente, na avaliação dos dados do *scan* no CNRLI, eles são excluídos quando a percentagem de fv (ou a soma da percentagem de

fv+sc+ni) é superior a 30%. Porém, neste estudo, por decisão da aluna, orientador e equipa de etologia, excluíram-se apenas os casos em que aquele valor foi superior a 80%, para que o sujeito em estudo nunca fosse excluído.

3.5.2.3 Ficha de interacções

Para se avaliar o comportamento do sujeito em estudo perante uma fêmea e o seu comportamento sexual, o macho foi unido a uma fêmea (Janes) e as suas interacções foram registadas na ficha respectiva (Anexo V). O método de amostragem foi oportunístico baseando-se na detecção de interacções sempre que observadas pelo operador. Este registo, principalmente, antes e durante o cio, permite uma avaliação do comportamento social dos lincs. No período anterior ao cio, inicia-se o processo de socialização dos pares que, inicialmente, consiste em manter o par em cercados contíguos, permitindo o acesso de um dos indivíduos ao passeio entre os cercados e depois permitindo o acesso de um animal ao campeio do outro, enquanto o último permanece fechado em maneios. Este processo é alternado, de forma a possibilitar a partilha de territórios e a troca de odores entre os animais, nomeadamente através da marcação. Todo o processo é seguido por câmaras, sendo as interacções registadas. No final de cada dia, realiza-se uma contagem das interacções positivas e negativas de forma a poderem ser avaliadas as possibilidades de união entre os exemplares. Depois dos pares estarem formados, o registo das interacções continua, a fim de se acompanhar a evolução do comportamento do casal desde a época de cio até às cópulas (Anexo IV).

A união do casal de estudo (Gamma e Janes) foi realizada fora da época reprodutiva, após 6 meses da colocação do implante. No entanto, o processo de socialização realizado foi semelhante ao referido anteriormente, tendo começado no dia 13 de Dezembro de 2012 e sendo permitida a primeira união no dia 9 de Maio. De referir que, para a observação desta união para além das câmaras já referidas, foi também utilizada a câmara de campeio do cercado 7.

3.5.3 Reprodução

A avaliação reprodutiva do sujeito foi realizada durante as anestésias já mencionadas. Foi realizado um exame físico geral, exame dos genitais externos, recolha e análise de sémen e ainda recolha de sangue, para posterior quantificação da testosterona sanguínea.

3.5.3.1 Exame físico geral e exame dos genitais externos

O exame físico geral e o exame dos genitais externos foram realizados durante a anestesia para colocação do implante e novamente na anestesia de re-avaliação.

O exame físico incluiu a medição do peso do animal, recorrendo a uma balança analógica presente na clínica, e a avaliação da condição corporal, por observação directa do sujeito em estudo tendo em conta a escala de condição corporal do lince-ibérico (Anexo VI).

O exame dos genitais, consistiu na observação directa do pénis e testículos, na realização de medições testiculares, na avaliação da aparência das espículas penianas e sua medição, e ainda numa ecografia testicular para observação do parênquima (Figura 7 e Figura 8). A medição dos testículos foi realizada com a ajuda de uma craveira (comprimento e largura) e também, com o auxílio do ecógrafo (comprimento, altura e largura). Com os valores obtidos com este último calculou-se o volume de cada testículo e depois o total, ou o peso testicular, segundo o método descrito por Harcourt et al. (1995) (Gañán et al., 2009). Para cada testículo, $\text{volume} = \frac{4}{3} \times \pi \times (\text{comprimento}/2) \times (\text{largura}/2) \times (\text{profundidade}/2)$. O volume total ou peso testicular (g) = (testículo esquerdo (cm³) + testículo direito (cm³)) × 1,1, sendo o 1,1 o factor de conversão para calcular o peso de um tecido corporal a partir do seu volume (Gañán et al., 2009). A avaliação da aparência das espículas penianas foi realizada subjectivamente de 1 a 3, escala referida por Bertschinger et al. (2006): 1- pouco desenvolvidas, 2- moderadamente desenvolvidas, 3 – proeminentes. A medição quantitativa das espículas penianas foi realizada com o auxílio de uma escala de papel quadriculada com quadrículas de 1 cm de lado e linhas de 1 mm de largura.

Na anestesia de re-avaliação, a de Dezembro de 2013, para além do que já se referiu, foi também realizado um exame de sémen (recolha por electroejaculação) e colheita de sangue, para posterior quantificação da testosterona sanguínea do animal. De referir que nesta anestesia, os valores testiculares foram medidos antes da electroejaculação.

Figura 7 – Anestesia de 2012 - Realização de medições testiculares: (1) com craveira, (2) com ecógrafo; (3) Avaliação da aparência das espículas penianas.



(Fotos originais)

Figura 8 – Anestesia de 2013 - Realização de medições testiculares: (1) com craveira, (2) com ecógrafo; (3) Avaliação da aparência das espículas penianas.



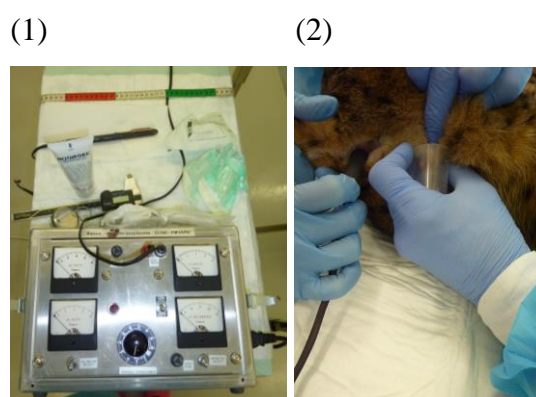
(Fotos originais)

3.5.3.2 Exame do sémen

Metodologia da recolha de sémen

Dos métodos utilizados em animais selvagens para recolha de sémen (electroejaculação, estimulação manual, vagina artificial ou recolha pós-morte) a electroejaculação é o método mais utilizado visto necessitar de pouco treino e, o animal estar anestesiado, enquanto se realiza o procedimento (Spindler & Wildt, 2010). No presente trabalho, a recolha de sémen foi realizada por este método pela equipa do Doutor Eduardo Roldan (Madrid) seguindo o procedimento descrito por Gañán et al (2010) (Figura 9). Neste caso, foram realizadas apenas duas séries de estímulos.

Figura 9 – Electroejaculação: (1) material utilizado, (2) recolha de sémen



(Fotos originais)

Metodologia de análise do sémen

A análise de sémen foi realizada pela equipa do Doutor Eduardo Roldan (Madrid) segundo o procedimento descrito por Gañán et al. (2010).

3.5.3.3 Avaliação do perfil hormonal

A análise hormonal é o método indirecto mais preciso para monitorizar o estado funcional do sistema reprodutivo, uma vez que as hormonas são os reguladores do sucesso deste sistema (Hodges, Brown & Heistermann, 2010; Spindler & Wildt, 2010). Estas estão presentes e podem ser medidas em várias matrizes biológicas, dependendo a escolha da matriz do tipo de informação pretendida, das técnicas de análise envolvidas, do metabolismo e via de excreção da hormona (diferente entre espécies) e da facilidade da sua recolha (Hodges et al., 2010). Os métodos não-invasivos de recolha de amostras são vantajosos no caso de animais em que o contacto deve ser evitado, como em jardins zoológicos e centros de reprodução. Porém, podem ser difíceis de recolher, sobretudo quando co-habitam com outros animais (Hodges et al., 2010).

A avaliação hormonal no decurso do estudo foi realizada unicamente por quantificação da testosterona sanguínea, aquando da anestesia de re-avaliação.

Testosterona no sangue

1. Metodologia da recolha de sangue, armazenamento e envio

O sangue para quantificação da testosterona, foi recolhido por punção da veia safena esquerda do animal (*butterfly* de 21 Gauge). A amostra pretendida foi recolhida para um tubo com gel para separação de soro e, em seguida, foi imediatamente refrigerada (4 a 8°C). Após, 20 minutos, aproximadamente, a amostra foi centrifugada (15 minutos, 3000 rpm a 21°C), tendo-se colocado, 1mL do soro obtido, num tubo *ependorf*. A amostra foi então congelada a -20°C. Para expedição, ainda congelada, foi colocada no interior de uma caixa de esferovite (própria para envio de amostras) com placas termoacumuladoras no seu interior e foi enviada para a IZW (Berlim).

2. Metodologia de medição da testosterona no sangue:

A medição da testosterone sanguínea foi realizada pela equipa da IZW (Berlim) segundo o procedimento referido por Göritz et al. (2009b).

3.6 Análise estatística

Os dados comportamentais do sujeito em estudo obtidos a partir do método focal foram registados directamente numa folha de cálculo do programa Microsoft Office Excel 2010. O seu tratamento e análise foram realizados recorrendo ao mesmo programa e ao *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 21. Foi realizada uma análise descritiva das diferentes categorias (actividade, inactividade e fora de vista) relativamente à duração das mesmas (total, média, por sessão e por mês de estudo) e à sua frequência relativa. Quanto à categoria de actividade, foi calculada a frequência relativa de cada comportamento realizado pelo animal. Foi ainda realizada uma análise descritiva específica do comportamento de marcação relativamente à duração do mesmo (total, média e por sessão) e à sua frequência absoluta (total no estudo, por sessão e por local do cercado).

Os dados recolhidos do *scan* diário, relativos ao macho em estudo e aos restantes machos, foram transferidos para uma folha de cálculo do programa Microsoft Office Excel 2010, através da qual, foram igualmente tratados e analisados. Foi feita a análise descritiva das diferentes categorias (actividade, inactividade, fora de vista, sem câmara, não identificado e a soma das três últimas categorias) relativamente à sua frequência relativa, por mês de estudo. Foi analisado também o comportamento de marcação para cada mês de estudo, relativamente à sua frequência relativa.

4. Resultados

4.1 Ingestão de comida e apetite do sujeito em estudo

O animal comeu em média 900g por dia (não *ad libitum*). Comummente comeu por semana, 3 dias coelho morto, 3 dias coelho vivo e fez um dia de jejum (Domingo). No período de estudo, comeu ainda frango 4 vezes, em média 800g por refeição. A quantidade de alimento oferecido não sofreu alteração com o início do tratamento nem durante o período de estudo e não foram observadas alterações na ingestão de comida. Pela escala de apetite, o animal foi avaliado como tendo muito apetite, comendo sempre prontamente e não deixando restos. O animal teve sempre água disponível (*ad libitum*).

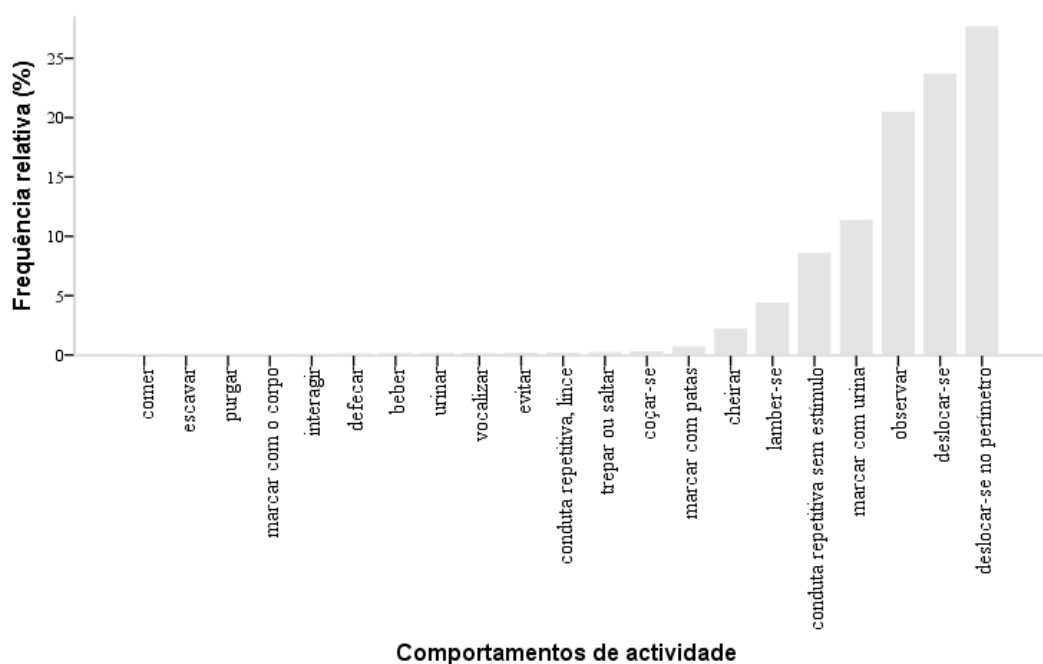
4.2 Comportamento

4.2.1 Sessões de observação contínua do animal em estudo

Parâmetros a avaliar: Actividade, inactividade e fora de vista

A recolha de dados ocorreu de 5 de Dezembro de 2012 a 25 de Fevereiro de 2013, num total de 69 sessões. Foram inseridas 5050 entradas de dados. No total desse período avaliou-se a actividade do animal pela descrição se o animal estava activo, inactivo ou fora de vista. Para o estado activo foi registada uma frequência relativa de entradas de dados de 77,1% e para o estado inactivo de 3,8%. A frequência relativa de entradas de dados de fora de vista foi de 19,1%. Quando activo, o comportamento mais frequente que o animal realizou foi o de se deslocar (51,2%), nomeadamente no perímetro (27,6%), seguido do comportamento de observar (20,4%) e de marcar com urina (11,3%) (Gráfico 1). Quando inactivo, o comportamento que obteve maior frequência foi o dormir (64,9%), seguido de descansar (35,1%). De referir que para inactividade só existem estas duas categorias.

Gráfico 1 - Frequência relativa, em percentagem, dos diferentes comportamentos de actividade realizados pelo sujeito em estudo.



Foram registadas e avaliadas 131 horas, 40 minutos e 6 segundos de comportamentos do animal, o que equivale a 7900,10 minutos. O indivíduo permaneceu a maior parte do tempo fora de vista 3526,14 minutos (58h46m8s). Seguiu-se o estado inactivo com 2619,43 minutos (43h39m26s) e por último, o activo 1754,53 minutos (29h14m32s) (Anexo VII: Tabela 9). Durante os 3 meses de observação (Dezembro a Fevereiro), o sujeito permaneceu mais tempo em actividade no mês de Dezembro (824,63minutos), seguido de Janeiro (632,97minutos) e por último Fevereiro (296,93minutos) (Tabela 1).

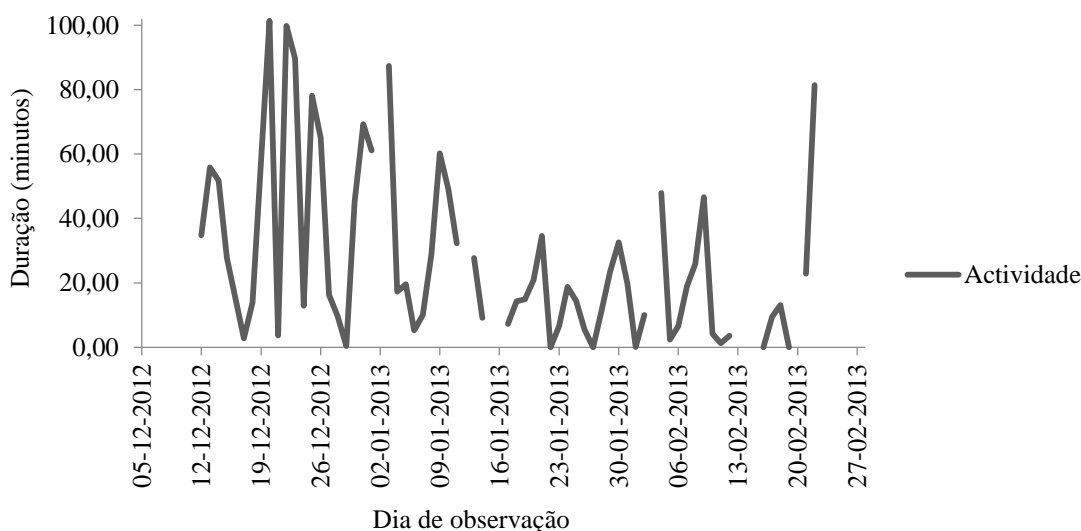
Tabela 1 – Duração total, em minutos, do tempo observado para o animal no estado activo, inactivo e fora de vista, por mês de estudo.

Mês de estudo	Nº de sessões	Duração (minutos)			
		Activo	Inactivo	Fora de vista	Soma
Dezembro	21	824,63	812,43	729,42	2366,48
Janeiro	28	632,97	1135,05	1454,55	3222,57
Fevereiro	20	296,93	671,95	1342,17	2311,05
Total	69	1754,53	2619,43	3526,14	7900,10

Relativamente à actividade diária ocorreram vários “picos”, aumentos de actividade seguidos de uma diminuição. Em 10 sessões, permaneceu em actividade por mais de 60 minutos, sendo que, em duas dessas sessões, esteve activo por mais de 90 minutos (20 e 22.12.2012) (Gráfico

2). A duração máxima contínua de actividade foi de 29,30 minutos (29m18s) no dia 31 de Dezembro, e a duração média de actividade por sessão foi de 25,43 minutos (25m26s) (Anexo VII: Tabela 9).

Gráfico 2 – Duração total, em minutos, do tempo observado do animal em actividade por sessão/dia de observação.



Relativamente à inactividade, em 21 sessões o animal permaneceu mais de 60 minutos inactivo, em 12 das quais, permaneceu mais de 90 minutos inactivo. A duração máxima contínua de inactividade foi de 103,57 minutos (1h43m34s) no dia 27 de Janeiro e a duração média de inactividade por sessão foi de 37,96 minutos (37m58s) (Anexo VII: Tabela 9).

Em 30 sessões, o animal permaneceu mais de 60 minutos fora de vista, sendo que em 19 delas, esteve mais de 90 minutos fora de vista. A duração máxima contínua do tempo de fora de vista foi de 120 minutos, sendo que em 7 sessões, o animal não foi mesmo observado (19.12;12 e 22.01; 14,16,19 e 25.02). A duração média do tempo de fora de vista por sessão foi de 51,10 minutos (51m6s) (Anexo VII: Tabela 9).

Marcação

Relativamente ao comportamento de marcar, o Gamma efectuou um total de 469 marcações, 442 com urina, 26 com as patas e uma com o corpo (Anexo VII: Tabela 10). O dia 22 de Fevereiro foi aquele em que mais se observou a realização de marcações, 63 no total, tendo sido igualmente o dia em que foi observado o maior número de marcações com urina, 62

marcações. No dia 23 de Dezembro foi quando se registou o maior número de marcações com patas, 4 marcações (Anexo VII: Tabela 11).

O dia em que foi registado o maior tempo total despendido pelo animal com o comportamento de marcação foi 4 de Fevereiro, em que ocorreu igualmente maior duração de realização do comportamento de marcação com patas. A 22 de Fevereiro registou-se a maior duração do comportamento de marcação com urina e, no mesmo dia para marcação com corpo. O tempo total despendido pelo animal no comportamento de marcação foi de 889 segundos (14m49s). A duração média de cada comportamento de marcação foi de 2 segundos (Gráfico 3 e Gráfico 4; Anexo VII: Tabela 12).

Gráfico 3 - Duração total do tempo, em segundos, despendido pelo sujeito em estudo na realização do comportamento de marcação, por sessão/dia de observação.

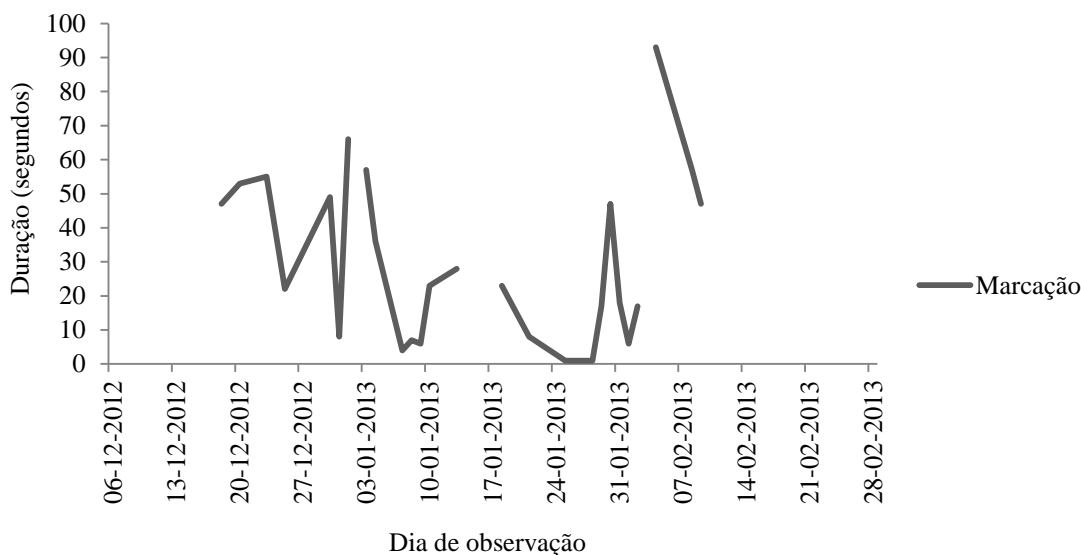
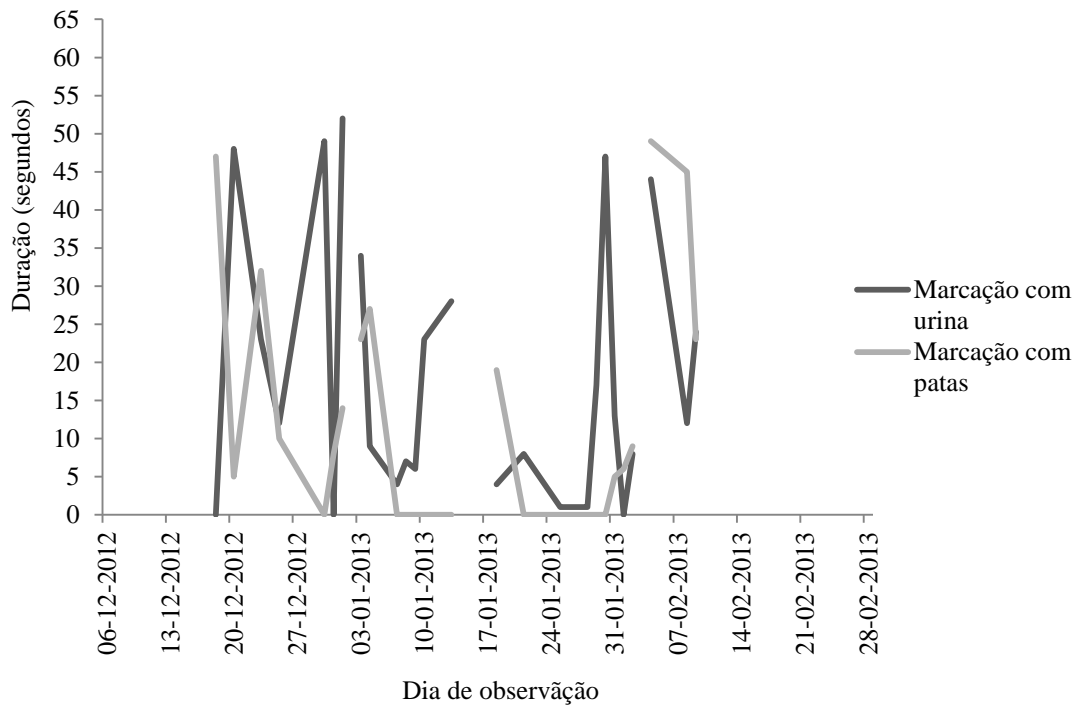


Gráfico 4 - Duração total, em segundos, do tempo despendido pelo sujeito em estudo na realização de marcação com urina e com patas, por sessão/dia de observação.



Mensalmente, no mês de Janeiro registou-se a maior frequência e duração do comportamento de marcar (frequência=218 e duração=342,0 segundos), seguiram-se Fevereiro (frequência=149 e duração=313,0 segundos) e Dezembro (frequência=101 e duração=234,0 segundos) (Gráfico 5). Esta variação também se observou de igual forma para o comportamento específico de marcação com urina, que revelou maior frequência e duração, no mês de Janeiro (frequência= 212 e duração=202,0 segundos), seguido de Fevereiro (frequência=137 e duração=155,0 segundos) e Dezembro (frequência=93 e duração=132,0 segundos) (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Duração total, em segundos, do tempo despendido pelo sujeito em estudo na realização do comportamento de marcação por mês de estudo.

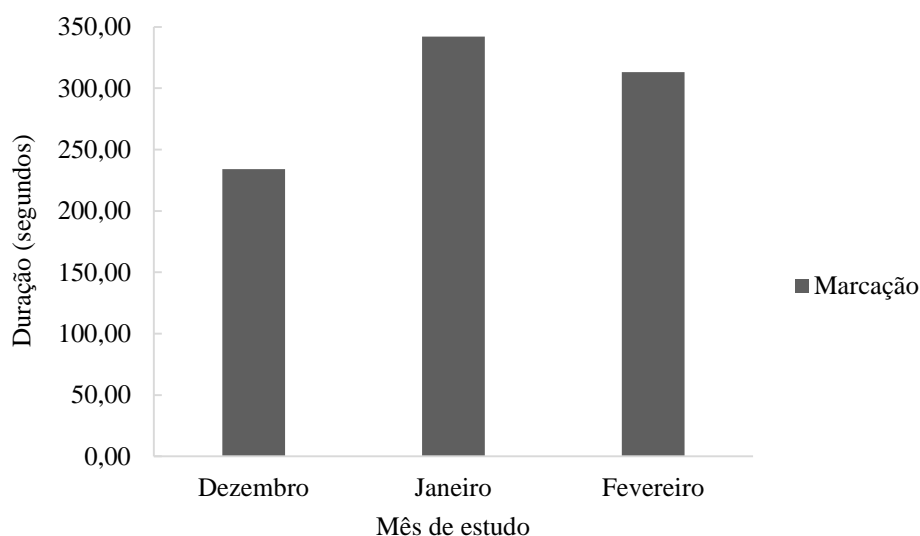
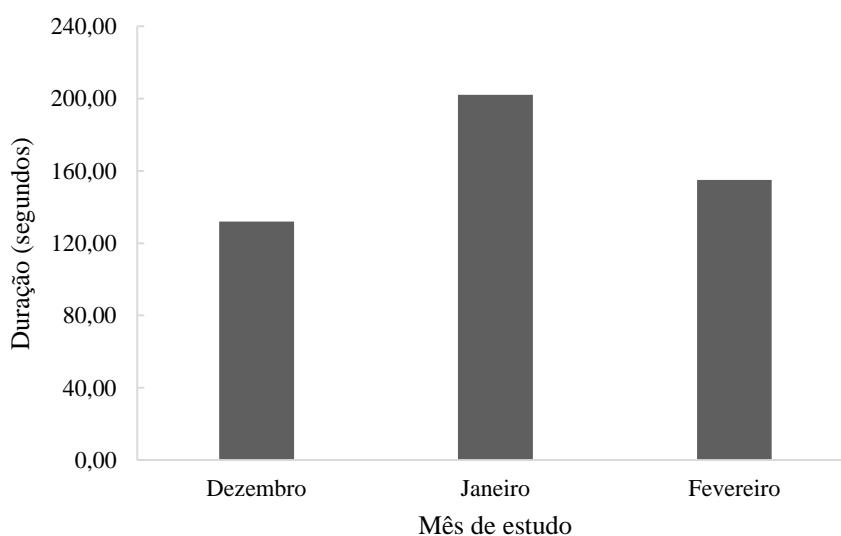


Gráfico 6 - Duração total, em segundos, do tempo despendido pelo sujeito em estudo na realização do comportamento de marcação com urina, por mês de estudo.



Relativamente à localização das marcações, o Gamma realizou 107 marcações com urina no campeio, 53 no maneio grande e 282 no maneio pequeno. De referir que 247 das últimas foram realizadas no mesmo local, poste 2 do telheiro (Anexo VII: Tabela 13 e Anexo III: Figura 12) O comportamento marcar com patas, foi realizado por 7 vezes no campeio e 19, no maneio grande, as últimas na cortiça junto à caixa parideira (Anexo VII: Tabela 14). De referir que durante o estudo, o animal teve acesso a 2 cercados e a localizações diferentes dentro destes (Anexo VII: Tabela 15 e Tabela 16).

Nas sessões de duas horas de observação do animal, não foram registadas as categorias de não identificado (ni) e sem câmara (sc), nem os comportamentos de actividade de lambar genitais, caçar, copular, enterrar, jogo, montar, marcar com barbas, picacismo e conduta repetitiva.

4.2.2 *Scan*

Parâmetros a avaliar: Actividade, inactividade, fora de vista, sem câmara e soma de fora de vista, sem câmara e não identificado

Durante os 3 meses de avaliação do etograma para comparação do sujeito em estudo e dos outros machos presentes no CNRLI pode constatar-se que a frequência relativa do comportamento de actividade variou. Assim, a actividade observada foi menor no mês de Dezembro para ambos (sujeito em estudo - 40%, outros machos - 36%) e maior em Janeiro também para ambos (sujeito em estudo - 46%, outros machos - 42%). (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência relativa, em percentagem, da actividade do sujeito e dos outros machos por mês de estudo.

Mês de estudo	Frequência relativa de actividade (%)	
	Sujeito	Outros
Dezembro 2012	40	36
Janeiro 2013	46	42
Fevereiro 2013	44	37

A inactividade também variou, atingindo valores mais baixos em Dezembro e Fevereiro para o sujeito em estudo (24%) e em Dezembro para os outros (14%). Para a percentagem da soma das categorias fora de vista, sem câmara e não identificado o valor mínimo ocorreu em Janeiro (17% e 32%) e o valor máximo em Dezembro (36% e 48%) para ambos os grupos (sujeito e outros, respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência relativa, em porcentagem, de inatividade, fora de vista, sem câmara e soma de fora de vista (fv), sem câmara (sc) e não identificado (ni) (fv + sc+ ni), do sujeito e dos outros machos por mês do estudo.

Mês de estudo	Frequência relativa de cada categoria de actividade (%)							
	Inatividade		Fora de vista		Sem câmara		fv + sc + ni	
	Sujeito	Outros	Sujeito	Outros	Sujeito	Outros	Sujeito	Outros
Dezembro 2012	24	14	3	9	33	37	36	48
Janeiro 2013	37	26	5	15	12	14	17	32
Fevereiro 2013	24	26	4	11	28	24	33	37

Marcações

Pelo método de *scan*, o sujeito em estudo foi observado a realizar 3 marcações no mês de Dezembro e uma marcação no mês de Fevereiro, não tendo sido observado no mês de Janeiro a realizar este comportamento. Ocorreu pois, uma diminuição desse comportamento no segundo mês (Janeiro), seguido de um aumento no mês de Fevereiro. Para os outros machos no mês de Dezembro foi, também, quando se observou o maior número de marcações, 4,63 em média por animal. Este valor diminuiu nos dois meses seguintes, tendo ocorrido o valor mais baixo, no mês de Fevereiro (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de marcações realizadas pelo sujeito e pelos outros machos por mês de estudo.

Mês de estudo	Número de marcações	
	Sujeito	Outros
Dezembro	3,00	4,63
Janeiro	0,00	2,25
Fevereiro	1,00	1,63

Especificamente ao comportamento de marcação com urina, os resultados foram semelhantes. No mês de Dezembro, o sujeito em estudo foi observado a realizar 3 marcações e apenas uma marcação, no mês de Fevereiro, sendo que no mês de Janeiro não foi registado esse comportamento. Para os outros machos, foi no mês de Dezembro que se observou o maior número de marcações, 26 no total e 3,25, em média por animal. Estes valores diminuíram nos dois meses seguintes, ocorrendo o valor mais baixo, no mês de Fevereiro (Tabela 5).

Tabela 5 – Número de marcações com urina realizadas pelo sujeito e pelos outros machos por mês de estudo.

Mês de estudo	Número de marcações com urina	
	Sujeito	Outros (Média)
Dezembro	3,00	3,25
Janeiro	0,00	1,50
Fevereiro	1,00	1,13

4.2.3 Registo de interacções

Foram observadas e registadas as interacções entre o casal de estudo para se avaliar a compatibilidade do casal e o comportamento sexual do macho, depois do tratamento. Estes episódios foram registados de 16 de Dezembro de 2012 a 31 de Maio de 2013. Foram avaliados 171 episódios de interacções, 12 através da rede e 159 por contacto directo. A fêmea iniciou 93 desses episódios e o macho, 58 (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de episódios de interacção expressos pelo animal que a inicia e pelo tipo de contacto. Número total de episódios de interacção iniciados por cada indivíduo e pelo tipo de contacto.

Animal que inicia a interacção	Número de episódios de interacção		
	Através da rede	Contacto directo	Total
Fêmea	12	81	93
Macho	0	58	58
Desconhecido	0	19	19
Total	12	159	171

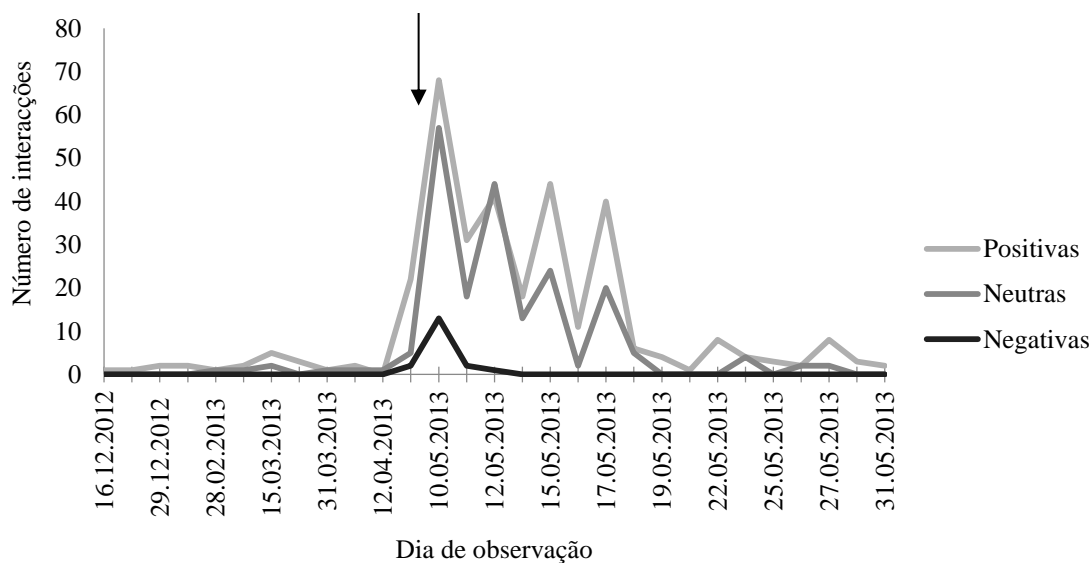
Os episódios de interacção observados através da rede tiveram uma duração de 14,42 minutos (14m25s) e por contacto directo de 290,72 minutos (4h50m43s), o que no total fez 305,13 minutos (5h5m8s) de interacções. A duração média por episódio de interacção foi de 1,80 minutos (1m48s).

Nos 171 episódios de interacções foram registados 557 comportamentos, 336 dos quais foram de carácter positivo, 203 neutros e 18 negativos. No decorrer das interacções negativas nunca houve necessidade de intervir. No dia da união, 9 de Maio de 2013, observaram-se 29 interacções, 22 positivas, 5 neutras e 2 negativas. No dia seguinte, 10 de Maio de 2013, foi o

dia em que se observou o maior número de interações: 138 no total (68 positivas, 57 neutras e 13 negativas) (Gráfico 7 e Anexo VIII: Tabela 17).

Relativamente ao comportamento sexual, na semana 23 do tratamento, no 5º dia (13 de Maio de 2013) em que o casal esteve unido, o sujeito em estudo realizou duas tentativas de cópula. Ao longo dos episódios de interação do casal, não foram registados os comportamentos de esfregar corpo, esfregar barbas, grunhidos e bufidos.

Gráfico 7 – Número de interações do casal em estudo.



(Seta assinala o dia da união do casal, dia 9.05.2013.)

4.3 Reprodução

4.3.1 Exame físico geral e exame dos genitais externos

Peso e condição corporal:

O exame físico realizado durante as anestésias permitiu obter o peso e condição corporal do animal, nas duas situações. No dia 4 de Dezembro de 2012, o seu peso foi de 13,4 kg com uma condição corporal de 3, e no dia 3 de Dezembro de 2013, pesou 14,15 kg e revelou idêntica condição corporal. Assim, constatou-se que o peso do animal aumentou cerca de 750 gramas, mas a sua condição corporal manteve-se.

Espículas penianas

No decorrer da anestesia realizada em Dezembro de 2012, pela observação directa do pénis, classificou-se a aparência das espículas testiculares do sujeito, como moderadamente desenvolvidas. Na realizada em Dezembro de 2013, as espículas revelaram-se menos

desenvolvidas, praticamente invisíveis e portanto, foram classificadas como pouco desenvolvidas. A medição quantitativa das espículas com a quadrícula não foi conseguida.

Medições testiculares

Os valores testiculares, comprimento, largura e profundidade, obtidos aquando das anestésias, por medição ecográfica e com craveira, diminuíram do ano de 2012 para o ano de 2013 (Tabela 7).

Tabela 7 - Medições testiculares do sujeito, no ano de 2012 e no ano de 2013.

Método utilizado	Medição (cm)	2012		2013	
		Testículo		Testículo	
		Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Craveira	Comprimento	1,70	1,60	1,45	1,44
	Largura	1,30	1,20	0,954	0,82
Ecografia	Comprimento	1,72	1,87	1,61	1,69
	Largura	1,50	1,50	0,60	1,08
	Profundidade	1,04	1,05	1,08	1,01

O volume e o peso testicular calculados com base nos valores obtidos à ecografia, também sofreram uma redução do ano de 2012 para 2013 (Tabela 8).

Tabela 8 - Volume e peso testiculares do sujeito, no ano de 2012 e no ano de 2013.

	2012		2013	
	Testículo		Testículo	
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito
Volume testicular (cm ³)	1,41	1,54	0,55	0,97
Peso testicular (g)	3,25		1,67	

4.3.2 Exame do sémen

A electroejaculação realizada em 2013 resultou na colheita de um ejaculado azoospérmico.

4.3.3 Avaliação do perfil hormonal

Testosterona no sangue

O resultado obtido para testosterona sanguínea foi de 0,3ng/ mL.

5. Discussão

5.1 Ingestão de comida e apetite do sujeito em estudo

Como foi referido por Goericke-Pesch et al. (2011), o apetite do animal pode modificar-se ao longo do tratamento com Deslorelina e, portanto, ele deve ser avaliado. No presente estudo o animal não demonstrou alterações na ingestão de comida ou do apetite, tendo sido mantida a quantidade de alimento oferecido, ao longo de todo o estudo.

5.2 Comportamento

Os comportamentos referidos nos estudos já realizados mencionam apenas o comportamento sexual, a agressividade e o comportamento territorial de marcação com urina (Bertschinger et al., 2006; Goericke-Pesch et al., 2011; Novotny et al., 2012).

5.2.1 Sessões de observação contínua do animal em estudo

Parâmetros a avaliar: Actividade, inactividade e fora de vista

Relativamente à frequência de acontecimentos, ou frequência relativa de entradas de dados, o estado activo foi o que mais ocorreu. Isto explica-se facilmente porque, quando o animal está em actividade, ele altera frequentemente o seu comportamento, o que equivale a mais entradas de dados, ou seja, é maior a frequência. Já quando o animal está a descansar ou a dormir, raramente modifica o seu comportamento, equivalendo isso a poucas entradas de dados, uma vez que o comportamento se mantém. Estes últimos comportamentos têm no entanto uma maior duração. Quando activo, os comportamentos mais realizados pelo animal foram os de deslocar, observar e marcar com urina. Estes são comportamentos típicos do felino que pretende defender o seu território e, portanto, estão de acordo com o esperado (Ferrerias et al., 1997; Simón et al., 2012). Destes 3 comportamentos, o mais frequente foi o de se deslocar, nomeadamente a deslocação no perímetro. Como a aluna observou durante o seu estágio, a maioria dos animais no CNRLI quando patrulham deslocam-se pelo perímetro, nomeadamente por cima do muro de betão. Este comportamento pode dever-se ao facto de, em cima do muro, os animais terem uma visão abrangente do seu território.

Em relação à duração dos comportamentos, durante os 3 meses de estudo, o animal permaneceu a maior parte do tempo fora de vista, seguindo-se o estado inactivo e, por fim, o estado activo. O facto de o animal ter permanecido a maior parte do tempo fora de vista, deve-se provavelmente aos cercados terem vários locais onde o animal não era visível. Isto pode significar que existem muitos locais de refúgio, o que é bom para os animais, podendo significar também a necessidade de mais câmaras nos cercados, para uma mais eficiente

observação dos animais. Para além disso, o mês em que o animal foi observado mais tempo em actividade foi em Dezembro e consequentemente, o mês em que permaneceu menos tempo fora de vista. Portanto, a maior parte do tempo que o animal está fora de vista encontrar-se-á possivelmente, no estado inactivo. Este facto é ainda apoiado pela evidência de no mês em que o animal permaneceu mais tempo fora de vista, ter sido o mesmo, em que foi observado mais tempo no estado inactivo. Relativamente à duração dos comportamentos de actividade ao longo dos meses de estudo, observou-se que o animal teve uma diminuição gradual do mês de Dezembro para Fevereiro. Tal, seria de esperar uma vez que, possivelmente, um implante de Deslorelina provoca no animal, efeitos semelhantes aos de uma gonadectomia, incluindo uma diminuição de actividade física (Nguyen et al., 2004; Belsito et al., 2009; Massei & Miller, 2013) No entanto, o manual do medicamento refere que a diminuição de actividade física no cão é uma observação rara (Virbac Portugal, 2012).

Relativamente à actividade diária é difícil concluir se houve ou não um aumento desta. Hipoteticamente, considerando a acção da testosterona na actividade física, devia observar-se um pico de actividade no início do tratamento. No entanto, como nos primeiros dias após a colocação do implante, as condições circundantes (p.ex.: movimentação entre cercados ou no mesmo cercado e movimentação de animais nos cercados vizinhos ou no mesmo cercado) ao animal foram alteradas e algumas sessões não foram mesmo realizadas, nada se pode inferir acerca disto. Estas alterações podem, possivelmente, explicar alguns picos de actividade. No dia 13 de Dezembro de 2012, o animal foi movimentado do cercado 9 para o 8, com acesso apenas a maneios e, nesse mesmo dia, uma fêmea foi transferida para o mesmo cercado, ficando esta apenas com acesso a campeio. Nesse dia, ocorreu um pico de actividade, provavelmente, devido à necessidade da defesa do novo território e à acrescida necessidade do mesmo, quando na presença de outro animal. Outro pico de actividade ocorreu no dia 20 do mesmo mês, momento em que o animal foi movimentado para o campeio e a fêmea para os maneios. Novamente, a defesa do novo território, com patrulha e realização de marcações. Como a aluna observou durante o estágio, quando um animal tem acesso a um cercado ou a parte deste, onde outro esteve, ele patrulha-o incansavelmente. Para os restantes picos de actividade não há explicação objectiva e seria de se esperar picos de actividade noutros dias, com novas passagens do animal de maneios para campeio e vice-versa (27.12.2012; 20.02.2013; 27.02.2013). No entanto, tal não se verificou, provavelmente também dada a aleatoriedade em que a hora de observação foi escolhida e, portanto, poder ter havido coincidência entre a hora de observação e o tempo de inactividade normal do macho.

Marcações

O animal em estudo realizou o comportamento de marcar, por diversas vezes, sendo a mais frequente a marcação com urina, um tipo de marcação muito usual nesta espécie para defesa do território (Simón et al., 2012). Como já foi referido, os felinos para defender o seu território realizam patrulha da área conjuntamente com marcações odoríferas (Ferrerias et al., 1997; Simón et al., 2012).

O dia em que foi observado o maior número de marcações com urina foi a 22 de Fevereiro (63 marcações), primeiro dia em que o animal de estudo foi observado desde que teve novamente acesso a todo o cercado 8, e após a fêmea ter estado nesse cercado. Isto explica-se, novamente, pelo facto de estes animais se sentirem mais ameaçados cada vez que as condições que os rodeiam se alteram, como a mudança de cercado ou de acesso a locais diferentes no cercado, e também quando têm outros animais mais próximo deles. Quando a disponibilidade de lugares aumenta, aumenta o seu território e então, a patrulha e a marcação também aumentam.

Mensalmente o número de marcações e, especificamente, a marcação com urina teve variações, não se tendo observado um aumento ou uma diminuição gradual do comportamento de marcar. Em gatos domésticos tratados com Deslorelina, até à 11^a semana após o início do tratamento, a marcação com urina cessou por completo, existindo uma variação individual; já em mabecos, a marcação com cheiro persistiu e em todos os animais (Bertschinger et al., 2002; Goericke-Pesch et al., 2011). Tais registos indicam-nos que este é um efeito que varia entre espécies e, provavelmente, mesmo entre indivíduos.

Relativamente à duração média de cada comportamento de marcação, ela foi muito baixa, de apenas 2 segundos, sendo importante referir que é devido ao facto de a maioria destes comportamentos serem momentâneos (eventos).

A localização das marcações foi registada como curiosidade por parte da aluna, mas também na tentativa de perceber se existiria uma relação entre a frequência de marcações e o local. O animal realizou o maior número de marcações em maneios, explicando-se pelo facto de ter tido mais acesso a estes do que ao campeio. Em 58 das 69 sessões, teve apenas acesso a maneios. Das marcações com urina, o sujeito realizou 107 no campeio, 53 no maneio grande e 282 no maneio pequeno, nomeadamente 247 no mesmo local (poste 2 do telheiro). Sem dúvida que o maneio pequeno foi o local onde o animal foi mais observado durante as sessões, o que talvez se possa explicar pelo facto de as áreas mais utilizadas do território de um lince, representarem apenas 40% desse espaço e ser nestas que os animais permanecem, usualmente, mais de 50% do seu tempo diário (Simón et al., 2012).

5.2.2 *Scan*

Parâmetros a avaliar: Actividade, inactividade, fora de vista, sem câmara e soma de fora de vista, sem câmara e não identificado

Quando se comparou a actividade do sujeito do estudo com os outros machos pelo método do *scan*, verificou-se que foi em Janeiro que houve maior frequência de actividade para ambos. Tal facto pode explicar-se provavelmente por neste mês ter sido aquele em que mais fêmeas se apresentaram em cio no CNRLI. Quando tal sucede o macho tem maior actividade, uma vez que a segue por um período de 48 a 72 horas para ocorrerem as cópulas e, também, para tentar afastar os restantes machos que a procurem (Simón et al., 2012). O animal do estudo não teve acesso a uma fêmea neste período. No entanto, as interacções entre casais em cercados próximos parecem também ter sido a causa de maior actividade deste linco e de todos os outros lincos do CNRLI.

Dos resultados obtidos pode concluir-se que Janeiro foi o mês em que os animais (Sujeito e outros) mais foram observados, o que foi confirmado por nesse mês se ter obtido o valor de actividade mais elevado e o menor valor da soma de fora de vista, sem câmara e não identificado e, Dezembro foi o mês em que os animais menos foram visualizados, confirmado por nesse mês se ter obtido o menor valor de actividade e o maior valor da soma de fora de vista, sem câmara e não identificado.

Marcações

Pelo método de *scan* o mês em que se observaram menos marcações realizadas pelo sujeito foi Janeiro, o que contraria totalmente o observado pelo método de amostragem contínua, pois foi quando se observou maior frequência das mesmas. Ainda, pelo método de *scan*, Dezembro foi quando se observou maior frequência de marcações do sujeito em estudo, o que também é o oposto do registado pelo método contínuo, pelo qual foi o mês com menor frequência de marcações. Estes resultados mostraram que com métodos diferentes se obtêm dados diferentes e que, neste caso, para comportamentos pontuais como é a marcação, o método de *scan* pode não ser capaz de os detectar. Este comportamento é tão fugaz que pode não ser apercebido pelo observador, quando é utilizado o método de *scan* ou pode mesmo não ser observado, dada a probabilidade do evento acontecer no exacto momento em que o observador visualiza o animal.

5.2.3 Registo de interacções

Um episódio de interacção decorre desde que se inicia a interacção até que esta cessa. Dos resultados obtidos pôde verificar-se que ocorreram poucas interacções negativas, o que pode significar que o casal era aparentemente compatível. Relativamente ao comportamento sexual, as duas tentativas de cópula mostraram que o animal, passado 6 meses de tratamento, expressava este comportamento. No entanto, como a união foi realizada fora da época de cio e a fêmea era inexperiente, não se podem retirar mais conclusões. De referir que o sujeito não foi colocado com uma fêmea em cio porque, tendo o CNRLI o intuito de reprodução, não se poderia desperdiçar uma reprodutora fértil apenas para avaliar este comportamento e, também, porque não se podia arriscar que o sujeito viesse a reproduzir, dado o seu historial de doença potencialmente genética.

5.3 Reprodução

As anestesias realizadas antes e depois da colocação do implante permitiram avaliar se ocorreram alterações no animal, motivadas eventualmente pelo tratamento. A re-avaliação deveria ter sido realizada antes da data em que ocorreu, mas não houve disponibilidade por parte da equipa do CNRLI, nem da parte do técnico especialista para o procedimento de electroejaculação. É necessário referir ainda que o protocolo normal de electroejaculação tende a provocar convulsões nesta espécie e portanto seria um risco executar o procedimento diversas vezes no animal de estudo, epilético.

5.3.1 Exame físico geral e exame dos genitais externos

Peso e condição corporal

Como referido, os análogos da GnRH podem provocar alterações no peso dos animais. Podem provocar um aumento de peso, por inibição da testosterona e por alteração da taxa metabólica dos animais, como ocorre na gonadectomia, mas podem também, promover uma diminuição de peso, se a massa muscular, que normalmente diminui, não for substituída por gordura (AZA wildlife contraception center, 2003; Nguyen et al., 2004; Belsito et al., 2009; Bertschinger, 2010). O peso do animal aumentou em 750 gramas, não se podendo ao certo concluir que essa alteração foi devida ao contraceptivo.

Espículas penianas

O tamanho das espículas penianas no sujeito em estudo diminuiu, tornando-se estas estruturas, praticamente invisíveis aos 12 meses após o tratamento. Tal também foi referido

em machos de chitas (Bertschinger et al., 2002). A redução das espículas é considerado um bom indicador da eficácia do tratamento, uma vez que reflecte o efeito supressivo na produção de testosterona.

Medições testiculares

Quando a recolha de sangue não é possível, e dado que alterações na concentração de testosterona estão relacionadas com alterações no tamanho dos testículos, estes devem ser mensurados para confirmar o estatuto reprodutivo do macho ou para notar modificações hormonais (Asa, 2010). Estas medições foram realizadas e o volume e o peso obtidos permitiram verificar uma diminuição das dimensões médias dos testículos do animal do estudo. Estas alterações foram igualmente, relatada em gatos e chitas tratados com implante de Deslorelina (Bertschinger et al., 2002; Goericke-Pesch et al., 2011; Novotny et al., 2012).

5.3.2 Exame do sémen

A electroejaculação deveria ter sido realizada aquando da anestesia para colocação do implante, para se certificar da existência de espermatozóides antes do tratamento. No entanto, ela não foi realizada por indisponibilidade técnica. Quando se procedeu à colheita e análise do ejaculado, passados 12 meses do tratamento, não foram encontrados espermatozóides (ejaculado azoospérmico), o que também já tinha sido observado em machos de chita, que após 12 meses de tratamento não revelaram espermatozóides viáveis (Bertschinger et al., 2002). Como já foi referido, a electroejaculação deveria ter sido realizada anteriormente ao tratamento para se poder confirmar uma eventual diminuição do número de espermatozoides viáveis. Com esta única recolha só se pode afirmar a azoospermia. Também é importante salientar que a avaliação correcta de um animal em termos reprodutivos, não se deve basear apenas nas características do ejaculado de uma só recolha (Spindler & Wildt, 2010). Claro está que nestes animais, que não são facilmente manuseados, torna-se um risco acrescido sedá-los e anestesiá-los várias vezes para a obtenção deste tipo de informações.

5.3.3 Avaliação hormonal

A avaliação hormonal no decurso do estudo foi realizada unicamente por quantificação da testosterona sanguínea, aquando da anestesia de re-avaliação. A secreção de testosterona é pulsátil e, portanto, a concentração da hormona circulante pode variar acentuadamente em algumas horas ou mesmo minutos, o que torna difícil a interpretação endócrina baseada, na recolha de uma única amostra. No presente estudo, foi realizada a colheita de apenas uma

amostra e pode dizer-se que mais amostras seriam necessárias para a formulação de um juízo preciso.

6. Conclusões e estudos futuros

Diariamente, as populações animais diminuem e tornam-se mais fragmentadas, aumentando o número de espécies extintas e em risco veemente de extinção. O uso de métodos contraceptivos em espécies criticamente ameaçadas, nomeadamente, no lince-ibérico, parece incongruente mas pode ser necessário. Em animais mantidos em cativeiro, pode estar indicado em diversas situações, como por exemplo, para a gestão populacional, genética e de bem-estar. No caso do lince-ibérico, o contraceptivo aplicado no estudo, foi para avaliar o conhecimento dos seus efeitos na espécie, em prol de uma necessidade de gestão futura nos centros de reprodução, nomeadamente, no CNRLI.

Primeiramente, é necessário referir que este trabalho incidiu sobre a primeira utilização de um contraceptivo nesta espécie, e portanto, não existiam dados para comparação dentro da espécie, estando disponíveis apenas os de outros felídeos. Segundo, não é possível retirar conclusões definitivas do presente estudo, dado ter incidido num único animal. Seria interessante poder utilizar-se uma amostra maior, para estudos futuros, mas a verdade é que sendo o lince, uma espécie ameaçada, não existem muitos exemplares com os quais se possam realizar ensaios. Por outro lado, por uma questão de bem-estar desses indivíduos, não podemos retirá-los do meio natural com esse intuito.

O objectivo principal foi alcançado, tendo sido avaliada a ocorrência de alterações provocadas por um implante de Deslorelina aplicado num macho de lince-ibérico. No entanto, não se pode dizer, de forma assertiva que as alterações registadas foram resultantes da acção do contraceptivo.

A observação dos animais permite um grande conhecimento sobre a espécie e o sistema de videovigilância é o método de eleição para tal, visto não perturbar os animais. Relativamente à avaliação comportamental, pode concluir-se que o animal diminuiu a sua actividade física ao longo do estudo. A utilização de um maior número de câmaras, talvez permitisse um melhor seguimento do animal, minimizando a ocorrência de situações de fora de vista. Dos diferentes métodos de observação utilizados pode concluir-se que, o ideal é um seguimento contínuo do animal, pois fornece registos mais precisos, mas que tal pode tornar-se demasiado exigente.

Com a observação contínua do animal e dos restantes lince, durante o estágio, pode concluir-se que esta espécie felina, expressa os comportamentos mais esperados, de patrulha e de marcação do território, e que estes aumentam se as condições vizinhas sofrerem alterações. Neste estudo, o sujeito manteve a realização do comportamento de marcação. Teria sido interessante perceber se o animal tendo mais acesso a campeio, ainda assim, escolheria o maneio pequeno para permanecer e realizar a maioria das suas marcações e, se estas diminuiriam ao longo do tratamento, se o macho não estivesse próximo de fêmeas em cio.

Quanto às avaliações do foro reprodutivo, pode concluir-se que teria sido mais correcto realizar exames antes, durante e após o tratamento. O ideal seria no momento da colocação do implante, outra até aos 6 meses depois da colocação do implante e, aos 12 e aos 24. Verificou-se que as medições testiculares diminuíram, assim como o tamanho das espículas penianas e, por isso, pode afirmar-se que o tratamento de um macho de lince-ibérico com um implante de 4,7 mg de Deslorelina provavelmente surtiu efeito. E se assim foi, possivelmente, o efeito durou um mínimo de 12 meses, pois passado esse período de tempo o animal não revelou presença de espermatozóides no ejaculado. Contudo, há a considerar não ter havido qualquer recolha de sémen, antes do início do tratamento. Como as alterações físicas foram as mais óbvias pode, possivelmente, concluir-se que a sua análise é um bom método para avaliar o efeito deste tipo de contraceptivo.

Sabendo que existem vários métodos contraceptivos, e apesar de já terem sido realizados muitos ensaios sobre este tema, é importante que mais sejam levados a efeito em animais, designadamente, sobre o contraceptivo do estudo e outros análogos da GnRH. Sabe-se que os receptores desta hormona não existem apenas na adenohipófise e no tracto reprodutivo e, portanto, podem ter efeitos noutros tecidos que não os mais conhecidos.

O estudo realizado teve também o intuito de contribuir para o conhecimento da espécie, nomeadamente, quanto ao seu comportamento e fisiologia reprodutiva, sendo igualmente necessários mais trabalhos sobre este assunto.

7. Bibliografia

Aboulgar, M. & Rizk, B. (2011) *Ovarian stimulation*. US: Cambridge University Press.

Alliance for contraception in cats & dogs (2013). *Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats*. (February).

Aldama, J.J, Beltran, J.F. & Delibes, M. (1991). Energy expenditure and prey requirements of free-ranging iberian lynx in southwestern spain. *J. Wildl. Manage.* 55 (4). 635-641.

Altman, J. (1974). *Observation study of behavior: sampling methods*. Acedido em Set 30, 2014, from Princeton University In:
<https://www.princeton.edu/~baboon/publications/1974Behav49.pdf>

Asa, C.S. (1993). The development of contraceptive methods for captive wildlife. In Kregger, T.J. *Proceedings of a Symposium: Contraception in wildlife management*, Denver, Colorado, 26-28 October, pp. 235-240.

Asa, C.S. & Porton, I.J. (2005). *Wildlife contraception: issues, methods and applications*. Maryland: The John Hopkins University Press.

Asa, C.S. & Porton, I.J. (2010). Contraception as a management tool for controlling surplus animals. In Kleiman, D. G, Thompson, K. V. & Baer, C. K. (Eds), *Wild Mammals in Captivity: Principles & Techniques for Zoo Management*, (2nd ed). (p. 469-482). London: The University of Chicago Press, Ltd.

Asa, C.S. (2010). Reproductive physiology. In Kleiman, D.G, Thompson, K.V. & Baer, C.K. (Eds), *Wild Mammals in Captivity: Principles & Techniques for Zoo Management*, (2nd ed). (p. 411-428). London: The University of Chicago Press, Ltd.

Asa, C., Boutelle, S., & Bauman, K. (2012). AZA wildlife contraception center programme for wild felids and canids. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 (Suppl 6), 377–80.

Asa, C.S., Bauman, K.L., Devery, S., Zordan, M., Camilo, G.R., Boutelle, S., & Moresco, A. (2013). Factors associated with uterine endometrial hyperplasia and pyometra in wild canids: implications for fertility. *Zoo Biology*, 33(1), 8–19.

Asa, C. & Boutelle, S. (2012). General: Contraception. In Miller, R.E. & Fowler, M.E., *Zoo and Wild Animal Medicine: Current Therapy*, (Volume 7). Missouri: Elsevier Saunders.

AZA wildlife contraception center (2003). *Contraception recommendations: Contraception methods*. Acedido em Fevereiro 2014, disponível em:

<http://www.stlzoo.org/animals/scienceresearch/contraceptioncenter/contraceptionrecommendatio/contraceptionmethods/>

Barfield, J.P., Nieschlag, E., & Cooper, T.G. (2006). Fertility control in wildlife: humans as a model. *Contraception*, 73(1), 6–22.

Belsito, K.R., Vester, B.M., Keel, T., Graves, T.K. & Swanson, K.S. (2009). Impact of ovariectomy and food intake on body composition, physical activity and adipose gene expression in cats. *Journal of Animal Science*, 87(2), 594–602.

Beltran, J.F. & Delibes, M. (1991). Ecología trófica del lince ibérico en Doñana durante un periodo seco. *Doñana, Acta Vertebrata*. 18 (1).

Beltran, J.F. & Delibes, M. (1994). Environmental determinants of circadian activity of free-ranging Iberian lynxes. *Journal of Mammalogy* 75 (2), 382-393.

Bertschinger, H.J., Trigg, T.E., Jöchle, W., & Human, A. (2002). Induction of contraception in some african wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 60, 41–52.

Bertschinger, H.J., Jago, M., Nöthling, J.O. & Human, A., (2006). Repeated use of the GnRH analogue deslorelin to down-regulate reproduction in male cheetahs (*Acinonyx jubatus*), *Theriogenology*, 66, 1762–1767.

Bertschinger, H.J. (2010). Controlling wildlife reproduction: reversible suppression of reproductive function or sex-related behaviour in wildlife species. Ph.D. Thesis. Utrecht University

Bowen, R.A. (2008). Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), 139–43.

Carter, S. & Kagan, R. (2010). Management of “surplus” animals. In Kleiman, D.G., Thompson, K.V. & Baer, C.K. (Eds), *Wild Mammals in Captivity: Principles & Techniques for Zoo Management*, (2nd ed). (p. 263-267). London: The University of Chicago Press, Ltd.

Castro, L.R., Palma, L. (1996). The current status, distribution and conservation of Iberian lynx in Portugal. *J. Wildl. Res.* 2 (1), 179-181.

Chuei, J.Y., Asa, C.S., Hall-woods, M., & Ballou, J. (2007). Restoration of reproductive potential after expiration or removal of melengestrol acetate contraceptive implants in tigers (*Panthera tigris*), *Zoo Biology*, 26, 275-288.

De Nys, H.M., Bertschinger, H.J., Turkstra, J.A., Colenbrander, B., Palme, R. & Human, A.M.. (2010). Vaccination against GnRH may suppress aggressive behaviour and musth in African elephant (*Loxodonta africana*) bulls – a pilot study. *Journal of the South African Veterinary Association*, 81, 8-15.

Dehnhard. M., Göritz, F., Frank, A., Naidenko, S., Vargas, A. & Jewgenow, K. (2005). Fecal steroid hormones analysis in captive eurasian and iberian lynxes. Comparison of hormone metabolism in the two sister taxa. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds),

Conservación Ex situ del Lince Ibérico: Un Enfoque Multidisciplinar. (pp.353-365).
Fundación Biodiversidad.

Dehnhard, M., Fanson, K., Frank, A., Naidenko, S.V, Vargas, A., & Jewgenow, K. (2010). General and comparative endocrinology comparative metabolism of gestagens and estrogens in the four lynx species, the eurasian (*lynx lynx*), the iberian (*l. Pardinus*), the canada lynx (*l. Canadensis*) and the bobcat (*l. Rufus*). *General and Comparative Endocrinology*, 167(2), 287–296.

de Souza, F.F, Lopes, M.D, Bicudo, S.D. (1999). Constituintes do plasma seminal e suas interações com as células espermáticas. *Revista de Educação continuada do CRMV-SP*, volume 2, 89–95.

Despacho nº 12697/2008. Ministérios do ambiente, do ordenamento do território e do desenvolvimento regional e da agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas. Diário da República n.º 87 – 2ª série.

D’Occhio, M.J., & Aspden, W.J. (1996). Characteristics of luteinizing hormone (LH) and testosterone secretion, pituitary responses to LH-releasing hormone (LHRH), and reproductive function in young bulls receiving the LHRH agonist deslorelin: effect of castration on LH responses to LHRH. *Biology of Reproduction*, 54(1), 45–52.

Ferreras. P., Beltrán, J.F., Aldama, J.J & Delibes, M. (1997). Spatial organization and land tenure system of the endangered Iberian lynx. *The Zoological Society of London* 243. 163–189.

Gañán, N., González, R., Garde, J. J., Martínez, F., Vargas, A., Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (2009). Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction, Fertility, and Development*, 21(7), 848–59.

Gañán, N., Sestelo, A., Garde, J.J., Martínez, F., Vargas, A., Sánchez, I., Pérez-Aspa, M.J., López-Bao, J.V, Palomares, F., Gomendio, M. & Roldan, E. R. S. (2010). Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Society of reproduction and fertility*, 139(1), 275–85.

Garner, D.L. & Hafez, E.S.E. (2004). Espermatozoides e plasma seminal. In Hafez, E.S.E., Hafez, B. (2004). *Reprodução animal* (7.ed.) (pp.97-110). São Paulo: Manole.

Gobello, C. (2007). New GnRH analogs in canine reproduction. *Animal Reproduction Science*, 100(1-2), 1–13.

Gobello, C. (2012). Effects of GnRH antagonists versus agonists in domestic carnivores [abstract]. In 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction: Canada, July.

Godoy, J.A., Casas, M. & Fernández, J. (2009). Genetic issues in the implementation of the Iberian Lynx ex situ conservation programme. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds), *Conservación Ex situ del Lince Ibérico: Un Enfoque Multidisciplinar.* (pp.87-99). Fundación Biodiversidad.

- Goericke-Pesch, S. (2010). Reproduction control in cats: new developments in non-surgical methods. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12(7), 539–46.
- Goericke-Pesch, S., Georgiev, P., Antonov, A., Albouy, M. & Wehrend, A. (2011). Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin, Suprelorin®, regarding suppression of reproductive function in tomcats. *Theriogenology*, 75(5), 803–810.
- Göriz, F., Dehnhard, M., Hildebrandt, T. B., Naidenko, S. V, Vargas, a, Martinez, F., López-Bao, J.V., Palomares, F. & Jewgenow, K. (2009a). Non cat-like ovarian cycle in the Eurasian and the Iberian lynx - ultrasonographical and endocrinological analysis. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 2 (November 2003), 87–91.
- Göriz, F., Vargas, A., Martínez, F., Hildebrant, T.B., Naidenko, S.V., Palomares, F., López-Bao, J.V., Pérez, M.J., Quevedo, M.A. & Jewgenow, K. (2009b). Ultrasonographical assessment of structure and function of the male and female reproductive organs in the Eurasian and the Iberian lynx. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds), *Conservación Ex situ del Lince Ibérico : Un Enfoque Multidisciplinar*. (pp.367-375). Fundación Biodiversidad.
- Grupo de manejo sanitario del lince ibérico (2014). *Manual sanitario del lince ibérico*.
- Hafez, E.S.E., Jainudeen, M.R. & Rosnina, Y. (2004). Hormônios, factores de crescimento e reprodução. In Hafez, E.S.E., Hafez, B. (2004). *Reprodução animal* (7.ed.) (pp.33-53). São Paulo: Manole.
- Herbert, C.A., Trigg, T.E., Renfree, M.B., Shaw, G., Eckery, D.C., & Cooper, D.W. (2004). Effects of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Implant on Reproduction in a Male Marsupial, *Macropus eugenii*, *Biology of Reproduction* 70, 1836–1842.
- Hillermann, A. (2009). Husbandry guidelines for african lion - *Panthera leo*. Western Sydney Institute of TAFE, Richmond.
- Hodges, K, Brown, J. & Heistermann, M. (2010). Endocrine monitoring of reproduction and stress. In Kleiman, D. G, Thompson, K. V. & Baer, C. K. (p. 447-468). London: The University of Chicago Press, Ltd
- Howe, L.M. (2006). Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66(3), 500–9.
- Jewgenow, K., Dehnhard, M., Hildebrandt, T.B. & Göriz, F. (2006a). Contraception for population control in exotic carnivores. *Theriogenology*, 66, 1525–1529.
- Jewgenow, K., Naidenko, S.V, Göriz, F., Vargas, A., & Dehnhard, M. (2006b). Monitoring testicular activity of male Eurasian (*Lynx lynx*) and Iberian (*Lynx pardinus*) lynx by fecal testosterone metabolite measurement. *General and comparative endocrinology* 149, 151–158.
- Jewgenow, K., Braun, B.C., Göriz, F., Voigt, C.C., Martínez, F., Anaya, L., Vargas, A. and Dehnhard, M. (2009a). Pregnancy diagnosis in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) based on urinary and blood plasma hormones (Eds), *Conservación Ex situ del Lince Ibérico: Un Enfoque Multidisciplinar*. (pp.377-388). Fundación Biodiversidad.

- Jewgenow, K., Göritz, F., Vargas, A. & Dehnhard, M. (2009b). Seasonal profiles of ovarian activity in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) based on urinary hormone metabolite analyses. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 (Suppl 2), 92–7.
- Junaidi, A., Williamson, P.E., Cummins, J.M., Martin, G.B., Blackberry, M. A. & Trigg, T.E. (2003). Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reproduction, Fertility, and Development*, 15(6), 317–22.
- Junaidi, A., Williamson, P.E., Martin, G. B., Blackberry, M.A, Cummins, J.M., & Trigg, T.E. (2009). Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(5), 725–34.
- Kutzler, M., & Wood, A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66(3), 514–25.
- Lehner, P.N. (1996) *Handbook of ethological methods*. (2nd ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Léon-Quinto, T, Simón, M.A., Cadenas, R., Jones, J., Ruiz, V., Moreno, J.M. & Soria, B. (2005). An Iberian lynx Biological Resource Bank and its applications to the *in situ* and *ex situ* conservation of the species. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds), *Conservación Ex situ del Lince Ibérico : Un Enfoque Multidisciplinar*. (pp.319-324). Fundación Biodiversidad.
- Leus, K. & Lacy, R.C. (2009). Genetic and demographic management of conservation breeding programmes oriented towards reintroduction. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds), *Conservación Ex situ del Lince Ibérico : Un Enfoque Multidisciplinar*, (pp.75-84). Fundación Biodiversidad.
- Loureiro, F., Martins, A R., Santos, E., Lecoq, M., Emauz, A., Pedroso, N.M., & Hotham, P. (2011). O papel do programa lince (lpn/ffi) na recuperação do habitat e presas do lince-ibérico no sul de portugal, *Galemys*, 23, 17–25.
- Massei, G. & Miller, L.A. (2013). Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: a review of products and criteria for field applications. *Theriogenology*, 80(8), 829–38.
- McPhee, M.E & Carlstead, K. (2010) The importance of maintaining natural behaviors in captive mammals. In Kleiman, D.G, Thompson, K.V. & Baer, C.K. (Eds), *Wild Mammals in Captivity: Principles & Techniques for Zoo Management*, (2nd ed). (p.303-313). London: The University of Chicago Press, Ltd.
- Melville, D.F., Brien, G.M.O., Crichton, E.G., Theilemann, P., & Mckinnon, A. (2012). Reproductive seasonality and the effect of the GnRH agonist deslorelin as a contraceptive in captive male Black Flying-foxes. *Theriogenology*, 77(3), 652–661.
- Miller, S. M., Bissett, C., Burger, A., Courtenay, B., Dickerson, T., Druce, D. J., Ferreira, S., Funston, P.J, Hofmeyr, D., Kilian, P.J., Matthews, W., Naylor, S., Parker, D.M., Slotow, R., Toft, M. & Zimmermann, D. (2013). Management of reintroduced lions in small fenced

reserves in South Africa: an assessment and guidelines, *South African Journal of Wildlife Research* 43(2), 138–154.

Munson, L. (2006). Contraception in felids, *Theriogenology*, 66, 126–134.

Nestor, J.J.Jr (1984) LHRH and its analogs: contraceptive and therapeutic applications. Springer Netherlands.

Nguyen, P.G., Dumon, H. J., Siliart, B. S., Martin, L. J., Ph, D., Sergheraert, R., & Biourge, V.C. (2004). Effects of dietary fat and energy on body weight and composition after gonadectomy in cats, *American Journal of Veterinary Research* 65 (12), 1–6.

Novotny, R., Cizek, P., Vitasek, R., Bartoskova, A., Prinosilova, P., & Janosovska, M. (2012). Reversible suppression of sexual activity in tomcats with deslorelin implant. *Theriogenology*, 78(4), 848–857.

Painer, J., Jewgenow, K., Dehnhard, M., Arnemo, J. M., Linnell, J.D.C., Odden, J., Goeritz, F. (2014). Physiologically persistent corpora lutea in Eurasian lynx (*lynx lynx*) - Longitudinal ultrasound and endocrine examinations intra-vitam. *Plos one*, 9.

Palomares, F., Ferreras, P., Fedriani, J.M. & Delibes, M. (1996). Spatial relationships between Iberian lynx and other carnivores in an area of south-western Spain. *Estación Biológica Doñana (CSIC)*, Sevilla, Spain.

Palomares, F., Revilla, E., Calzada, J., Fernández, N., & Delibes, M. (2005). Reproduction and pre-dispersal survival of Iberian lynx in a subpopulation of the Doñana National Park. *Biological Conservation*, 122(1), 53–59.

Palomares, F. (2009). Life history and ecology of the Iberian lynx. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds), *Conservación Ex situ del Lince Ibérico: Un Enfoque Multidisciplinar*. (pp.5-11). Fundación Biodiversidad.

Palomares, F., Rodríguez, A., Revilla, E., López-Bao, J. V., & Calzada, J. (2011). Assessment of the conservation efforts to prevent extinction of the Iberian lynx. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 25(1), 4–8.

Pelican, K.M, Abaigar, T., Vargas, A. Rodríguez, J.M., Bergara, J., López, J., Vázquez, A., Chaparro, J.M, Brown, J. e Wildt, D.E. (2009). Unusual gonadal hormone profiles in the Iberian lynx as determined by fecal monitoring. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds), *Conservación Ex situ del Lince Ibérico: Un Enfoque Multidisciplinar*, (pp.343- 352). Fundación Biodiversidad.

Programa de Conservación Ex-situ del Lince Ibérico (2013). *Toma de datos etológicos en el Lince Ibérico*.

Purswell, B.J & Jöchle, W. (2010) Targets and historical approaches to non-surgical sterilization in dogs and cats. [abstract] *4th International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control, Dallas, Texas, 8-10 April, 2010*. Acedido em Março, 2014 em: <http://www.michelsonprizeandgrants.org/resources/canine-feline-reproduction-contraception/symposia>

- Roldan, E.R.S. & Gomendio, M. (2009) Sperm and conservation. In T.R. Birkhead, D.J. Hosken, S. Pitnick (Eds), *Sperm Biology: an Evolutionary Perspective*. (pp. 539-564). London: Academic Press.
- Sarmento, P., Cruz, J., Moterroso, P., Tarroso, P., Ferreira, C. & Negrões, N. (2005). Iberian lynx conservation in Portugal: dilemmas and solutions. *Wildl. Biol. Pract*, 1, 156–162.
- Sarmento, P., Cruz, J., Monterroso, P., Tarroso, P., Ferreira, C., Negrões, N., & Eira, C. (2008). Status survey of the critically endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* in Portugal. *European Journal of Wildlife Research*, 55(3), 247–253.
- Seal, U.S., Barton, R., Mather, L., Olberding, K., Plotka, E.D. & Gray, C.W. (1976) Hormonal contraception in captive female lions (*Panthera leo*). *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 7, No 4, 12-20. Acedido em Jan. 8, 2013, disponível em <http://www.jstor.org/stable/20094382>.
- Serra, R., Sarmento, P., Baeta, R., Simão, C. & Abreu, T. (2005). *Plano de Conservação ex situ para o lince-ibérico em Portugal*. ICNF.
- Serra, R., Ferreira, C., Alves, B., Azevedo, A., Costa, T., Ferreira, L., Fjaere, M., Gonçalves, N., Grancho, A., Madeira, V., Moreira, M., Pechém, J., Requeijão, V., Sanchez, N. & Valkenburg, J. (2012). *Programa Funcionamento - Centro Nacional de Reprodução de Lince Ibérico*. ICNF.
- Simón, M. et al. (2012). Introduction. In Simón, M. et al. *Ten years conserving the Iberian lynx*, (pp. 12-71). Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Seville.
- Spindler, R. E. & Wildt, D. E.. (2010). Male reproduction: assessment, management, assisted breeding, and fertility control. In Kleiman, D. G, Thompson, K. V. & Baer, C. K. (Eds), *Wild Mammals in Captivity: Principles & Techniques for Zoo Management*, (2nd ed). (p. 429-446). London: The University of Chicago Press, Ltd.
- Trigg, T.E., Wright, P.J., Armour, A.F., Williamson, P.E., Junaidi, A., Martin, G.B., Doyle, A.G. & Walsh, J. (2001). Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement, 57, 255–61.
- Trigg, T.E., Doyle, A.G, Walsh, J.D. & Swangchan-uthai, T. (2006) A review of advances in the use of GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, 66, 1507–1512.
- Vargas, A., Sánchez, I., Martínez, F., Rivas, A., Godoy, J.A., Roldan, E., Simón, M.A., Serra, R., Pérez, M.J., Sliwa, A., Delibes, M., Aymerich, M. & Breitenmoser, U. (2009). Interdisciplinary methods in the Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) conservation breeding programme. In Vargas, A., Breitenmoser, C. & Breitenmoser, U. (Eds), *Conservación Ex situ del Lince Ibérico : Un Enfoque Multidisciplinar*, (pp.57- 71). Fundación Biodiversidad.
- Virbac Portugal (2012). *Suprelorin, resumo das características do medicamento*. Acedido em Nov. 28, 2012, disponível em <http://www.virbac.pt/>

Weckermann, D. & Harzmann, R. (2004). Hormone therapy in prostate cancer: LHRH antagonists versus LHRH analogues. *European Urology* 46, 279–284.

William, B. J., Bharathidasan, M., Thirumurugan, R., Arunprasad, A., Kananan, T. A., George, R.S., Nagarajan, L. & Ramani, C. (2014). Three finger palpation technique of vas deferens for keyhole vasectomy in spotted (*Axis axis*) and sambar deer (*Cervus unicolor*). *Veterinary World*. Volume 7. 685-688.

8. Anexos

Anexo I. Informações e historial clínico do sujeito em estudo

Informações

Identificação do Animal: Gamma Sexo: Macho

Data de Nascimento: 19/04/2010

Origem: Cativeiro - *Centro de Cría de Lince Ibérico "La Olivilla"* (CCLI)

Genótipo: Serra Morena

Progenitores: Castañuela X Beta

Nº de *microchip*: 941000012459421

Historial Clínico:

Animal nascido em cativeiro no (CCLI) em 19/04/2010.

Nasce com pouca vitalidade, só começando a mover-se aos 30 minutos pós-parto.

Aos 37 dias de vida no período de lutas tem de ser assistido devido a um quadro de dificuldade respiratória.

Dia 04/07/2010 aos 75 dias de idade apresenta um quadro convulsivo. No dia seguinte apresenta nova crise convulsiva e é iniciada terapia com fenobarbital. Todas as análises realizadas estavam dentro dos valores normais, sendo que o único agente patogénico detectado foi *Campylobacter*.

A 26/11/2010 foi transferido para o CNRLI, estando na altura a fazer desmame da medicação (Fenobarbital 3,5 mg SID), que acabou por suspender completamente em Maio de 2011.

Após um episódio de tensão com a sua irmã Guara, apareceu no dia bastante prostrado e pouco reactivo. A suspeita inicial era que tivesse tido uma crise convulsiva durante a noite, que não tivesse sido detectada por videovigilância. Foi examinado não se detectando sinal de trauma ou suspeita de processo infeccioso, tendo sido medicado com antibioterapia e corticoesteróides.

No mesmo dia teve três crises convulsivas confirmando-se a suspeita de que seria essa a causa da sua prostração. As crises foram controladas com administração de Valium e Midazolam e

reiniciou-se medicação com Fenobarbital 15 mg/SID. Esta dose tem sido progressivamente diminuída estando agora a fazer 7,5 mg/SID.

Anexo II. Resumo das características do medicamento

1. Nome do medicamento veterinário: Suprelorin® 4.7 mg implante para cães

2. Composição qualitativa e quantitativa:

Substância activa: Deslorelina (sob a forma de acetato de Deslorelina).....4,7mg

Excipiente (s): Para a lista completa de excipientes ver secção 6.1.

3. Forma farmacêutica: Implante, cilíndrico branco a amarelo pálido.

4. Informações clínicas

4.1 Espécies – alvo: Cães (macho).

4.2 Indicações de utilização, especificando as espécies-alvo: Para a indução da infertilidade temporária em cães machos saudáveis, não castrados, com maturidade Sexual.

4.3 Contra-indicações: Não existem.

4.4 Interações medicamentosas e outras formas de interacção: desconhecidas.

4.5 Posologia e via de administração:

Via subcutânea. A dose recomendada é de um implante por cão, independentemente do seu tamanho. A desinfecção do local de implantação deve ser efectuada antes da implantação para evitar a introdução de infecção. Se os pêlos forem longos, devem ser bem cortados numa pequena área, se necessário. O medicamento veterinário deve ser implantado por via subcutânea na pele laxa do dorso entre a parte inferior do pescoço e a região lombar. Evitar injectar o implante em tecido adiposo, dado que a libertação da substância activa pode ser alterada em zonas pouco vascularizadas.

1.Retirar a tampa luer lock da seringa para implantes.

2. Prender o dispositivo de administração na seringa para implantes usando a conexão luer lock.

3. Levantar a pele laxa situada entre as omoplatas. Introduzir por via subcutânea todo o comprimento da agulha.

4. Premir completamente o êmbolo do dispositivo de administração e, ao mesmo tempo, retirar lentamente a agulha.

5. Exercer pressão na pele no local de inserção à medida que a agulha é retirada e manter a pressão durante 30 segundos.

6. Examinar a seringa e a agulha para verificar se o implante não ficou na seringa ou na agulha e que o espaçador é visível. Pode ser possível palpar o implante *in situ*.

O implante bio compatível não necessita de ser removido. Contudo, se for necessário terminar o tratamento, os implantes podem ser removidos cirurgicamente por um médico veterinário. Os implantes podem ser localizados através de ultra-sons.

5. Propriedades farmacológicas

Grupo farmacoterapêutico: hormonas libertadoras de gonadotrofinas (GnRH), código atcvet: Qh01ca93.

6. Informações farmacêuticas

6.1 Lista de excipientes: Óleo de palma hidrogenado, Lecitina, Acetato de sódio anidro

6.2 Incompatibilidades: Desconhecidas.

Titular da autorização de introdução no mercado Virbac s.a.

(adaptado de Virbac Portugal, 2012)

Anexo III. Informações acerca dos cercados do CNRLI

Descrição dos cercados:

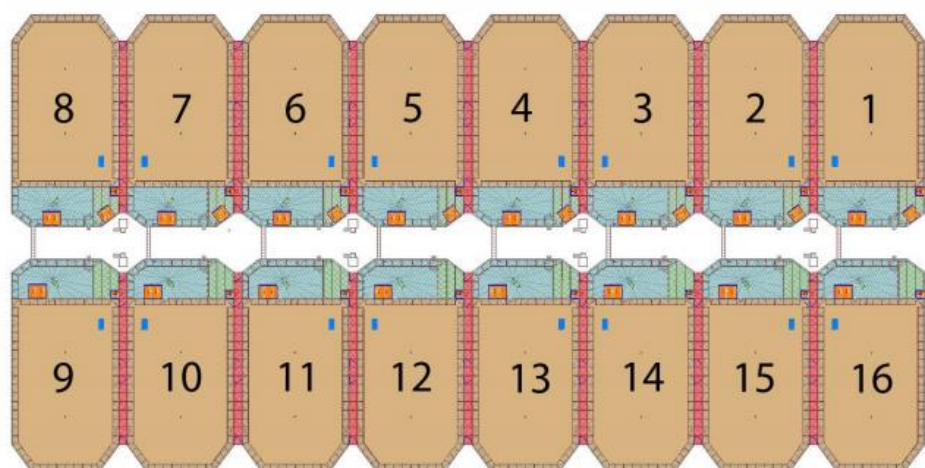
O complexo dos cercados “consiste num recinto com cerca de 1,6 ha, vedado em todo o seu perímetro, com acesso ao interior por duas vias, uma antecâmara e um portão.” (Serra et al., 2012, p.15). Existem 16 cercados, tendo cada um uma área total de 1000 m². Essa área é delimitada por um muro de betão e uma rede com 3,5 m de altura, terminando numa baía angulada a 45° em direcção ao interior. Para evitar estímulos visuais que possam perturbar os animais, os cercados têm ainda uma rede de ensombramento até à altura de 3 m (Serra et al., 2012).

A área do cercado está dividida em 4 locais diferenciados: campeão (C), maneio grande (Mg), maneio pequeno (Mp - com edifício parideira (ep)) e corredor de intercomunicação (ci). O “edifício Parideira é um pequeno edifício em betão” que possui “duas plataformas rebatíveis a alturas distintas e uma caixa parideira em madeira” (Serra et al., 2012, p.17). Os corredores de comunicação (ou passeios) entre cercados contíguos têm 1,5 m de largura possibilitando diversos graus de proximidade entre animais de dois cercados adjacentes: “separados pela largura do corredor, separados por uma única vedação (corredor aberto para um dos lincas apenas) ou em contacto completo, segundo o objectivo que se pretenda cumprir.” Os corredores “entre cercados de linhas opostas permitem movimentar os lincas entre cercados opostos sem a necessidade de os capturar” (passeio de leão) (Serra et al., 2012, p.17).

Em cada cercado existem 6 a 7 guilhotinas que permitem a movimentação dos animais entre as diferentes áreas do cercado e entre cercados, podendo todas elas ser accionadas no exterior dos mesmos. Uma para cada corredor de comunicação com o/s cercado/s contíguo/s, uma entre campeão e maneio grande, uma entre campeão e maneio pequeno, uma entre maneios, uma do maneio grande para o corredor central (passeio de leão) e ainda uma no maneio pequeno de entrada para o edifício parideira (Serra et al., 2012).

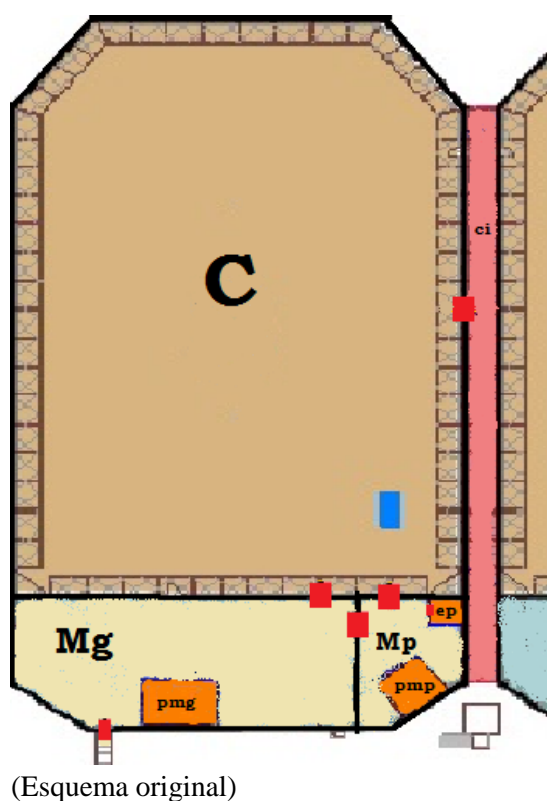
Como forma de enriquecimento ambiental, ao longo do cercado foram colocadas vegetação natural, pequenas pedras, barreiras visuais e ainda outras estruturas, como observatórios (OT), plataformas (p) e *penthouse*. Estas construções, com diferentes alturas relativamente ao solo, são ideais para observação e descanso. Os observatórios são estruturas verticais com prateleiras, existindo 2 no campeio (OT1 e OT2) e um no maneio grande (OT3), as plataformas, também elas prateleiras, existem duas por cercado, uma no maneio grande e uma no maneio pequeno (cobertas por um telheiro de betão, excepto no maneio pequeno dos cercados 9 a 16) e a *penthouse* é um telheiro de madeira localizado no fundo de campeio. Por cercado, existem ainda 3 caixas de madeira (uma no campeio, uma no maneio grande e uma dentro do edifício parideira), designadas de caixas parideiras, colocadas para aumentar as possibilidades de selecção de parideira das fêmeas. No entanto, não são utilizadas apenas para este propósito sendo que a maioria dos animais as utiliza como local de abrigo e de descanso. Em cada cercado existem 3 bebedouros de água, um em cada maneio (automáticos) e um no campeio (manual), tendo portanto todos os animais água *ad libitum* (Serra et al., 2012).

Figura 10 - Esquema da planta dos cercados do CNRLI.



(Esquema gentilmente cedido pelo CNRLI)

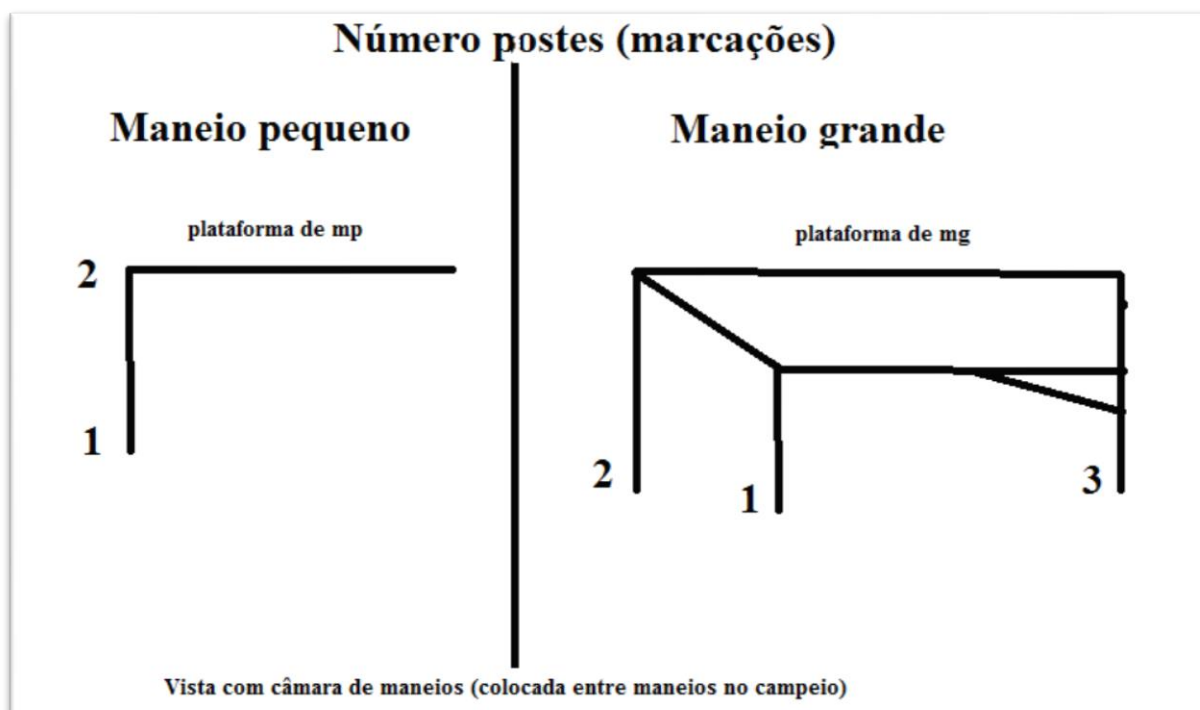
Figura 11 - Esquema da área de um cercado.



Legenda: Áreas do cercado - campeio (C), maneio grande (Mg), maneio pequeno (Mp - com edifício parideira (ep)) e corredor de intercomunicação (ci). Alguns elementos de enriquecimento ambiental - plataforma de maneio grande (pmg) e plataforma de maneio pequeno (pmp). Outros elementos - Guilhotinas (■) e bebedouro (■).

(Esquema original)

Figura 12 - Esquema representativo dos postes dos telheiros, de maneio grande e maneio pequeno, enumerando-os.



(Esquema original)

Anexo IV. Definições do etograma

Categorias de Informação:

O etograma está estruturado em 13 categorias de informação: data, número da sessão, horas da sessão, quem realizou a gravação, hora de início, hora de fim e duração do comportamento, comportamento, actividade, localização e localização específica, se separado da fêmea e observações. As categorias de actividade e comportamento estão detalhadas em seguida.

Actividade

- Activo – quando o animal realiza um comportamento que não o descansar ou o dormir.
- Fora de vista (fv) - quando o animal está num local onde não é visível.
- Inactivo – quando o animal se encontra a descansar ou a dormir.
- Não identificado (ni) – quando no mesmo cercado não é possível distinguir um animal de outro.

Comportamento

Alogrooming: o animal em questão lambe o outro ou vice-versa ou os dois procedem à limpeza um do outro. Ver definição de Lamber-se.

Alogrooming activo (aa): o animal lambe outro.

Alogrooming pasivo (ap): outro indivíduo lambe o animal em questão.

Alogrooming mútuo (am): o animal lambe outro indivíduo e este último lambe o primeiro.

Beber (b): Ingestão de água mediante sucessivas “lambidelas”.

Caçar/*Cazar* (cz): um comportamento que faz parte da sequência de comportamentos dirigidos a capturar uma presa viva. Se existe a oportunidade de o animal capturar a presa (presa perto do animal, parada, sem obstáculos entre o lince e a presa) e o animal não a captura (não a mata nem a come), anota-se a categoria de “jogo com presa”.

Cheirar/*Olfatear* (olf): realiza inalações curtas e repetidas de ar pelo focinho, estando parado ou a deslocar-se. Pode cheirar o ar, objectos ou substratos (solo). Também pode exibir a resposta de flémen: inalação do ar levantando o focinho, os lábios superiores, enrugando o nariz e com a boca ligeiramente aberta.

Coçar-se/*Rascarse* (ras): O animal esfrega uma zona do corpo com uma das patas.

Comer (c): O animal ingere qualquer tipo de alimento sólido com fins nutritivos.

Condutas repetitivas: animal repete o deslocamento sobre os seus passos e sem focar a atenção em mais nada pelo menos 3 vezes, num tempo de 30 segundos de observação.

Conduta repetitiva com estímulo. Nos casos em que seja possível detectar directa ou indirectamente um estímulo (no qual o animal está focado, demonstra interesse ou medo) que coincida com o momento da conduta anota-se uma das categorias:

- Conduta repetitiva, alimentação (ra): conduta repetitiva em que se detecta directamente ou indirectamente alimento ou o acto de alimentação como estímulo desencadeador. Inclui a presença do tratador com alimento na hora do maneo.
- Conduta repetitiva, evasiva (re): o animal afasta-se de um estímulo negativo (pessoas, rega, obras ou outro lince). Quando se afasta pode correr ou caminhar com o ventre junto ao solo.
- Conduta repetitiva, lince (rl): conduta repetitiva em que se detecta directamente ou indirectamente outro lince como estímulo desencadeador. O animal não tem as barbas abertas nem o pêlo eriçado (i-, pique), e o outro animal ao qual se dirige a conduta não faz deslocamento sincronizado com este (i, passeio em paralelo).
- Conduta repetitiva, outro estímulo (ro): conduta repetitiva em que se detecta directamente ou indirectamente outro estímulo como desencadeador. Deve-se apontar o estímulo.
- Conduta repetitiva, tratador/*cuidador* (rc): conduta repetitiva em que se detecta directamente ou indirectamente um tratador como estímulo desencadeador fora da hora de maneo. Não existe alimento.

Conduta repetitiva sem estímulo (r): Neste caso não é detetado directa ou indirectamente nenhum estímulo que desencadeie o comportamento.

Copular (co): para os dois sexos, quando o macho monta a fêmea, agarrando-a com os dentes/boca pela nuca.

Defecar (df): Evacuação de fezes. O animal posiciona-se com a zona ano-genital um pouco elevada, separada do solo e com as patas traseiras flectidas. Pode fazer um buraco no solo antes de defecar.

Descansar (des): o animal está em decúbito com ou sem a cabeça levantada. Se tem a cabeça levantada tem os olhos semi-cerrados ou fechados. Se a cabeça não está levantada se os olhos estão semi-cerrados. O animal não está focado em nada de concreto e pode exibir movimentos pequenos como mexer as orelhas ou mudar de posição.

Dormir (d): O animal está em decúbito com a cabeça apoiada e com os olhos fechados. E está relaxado ou seja sem movimentos pequenos constantes das orelhas ou de mudança de posição.

Deslocar:

Deslocar-se (d): o animal movimenta-se no seu cercado sem recorrer ao perímetro e sem repetir a conduta de repetir sobre os seus passos mais de duas vezes num tempo de 30 segundos de observação. Caso exista simultaneamente o comportamento de cheirar, anota-se a categoria “Cheirar” e não de deslocamento.

Deslocar-se no perímetro (dp): o animal desloca-se no perímetro ou a uma distância deste menor que a do seu comprimento corporal.

Enterrar (en): O animal cobre a comida, urina ou fezes com terra e/ou ervas raspando com as patas anteriores.

Escavar (es): raspa a superfície com as patas para fazer um buraco ou retirar bocados de terra.

Evitar (ev): o animal afasta-se de um estímulo negativo (pessoas, rega, obras ou outro lince) ou esconde-se utilizando um elemento do campeio. Quando se afasta pode movimentar-se com o ventre junto ao solo.

Interacções:

Interacção negativa (i-): Comportamento agressivo realizado por um animal contra outro indivíduo. Anota-se quando se observa algum dos seguintes comportamentos:

- ✓ Grunhir: o animal emite um ruído surdo grave (como não há sistema de som, este comportamento, quando perceptível, é o apenas pela observação do movimento da boca do animal)
- ✓ Lutar: dois animais enrolam-se num combate físico, mordendo-se e arranhando-se mutuamente.

- ✓ Morder: o animal morde outro animal.
- ✓ Patadas: o animal atinge o outro indivíduo directamente ou através da vedação com as patas dianteiras.
- ✓ Pêlo eriçado: o animal levanta o pêlo do pescoço e/ou da espádua/ombros.
- ✓ Pique: o animal desloca-se junto à vedação, de forma repetitiva ou não, com barbas abertas e/ou pêlo eriçado. Pode incluir patadas e mordidelas na vedação. O animal está focado noutro lince que pode ou não corresponder.

Interação neutra (i): O animal exhibe um dos seguintes comportamentos não coincidindo com a categoria de comportamentos de “i-“ ou “i+”. Sempre que associados a comportamentos de i- ou i+, se anota i- o i+.

- ✓ Barbas abertas: o animal abre as barbas para ambos os lados, ficando com a cabeça em forma de leque.
- ✓ Cabecear: os animais chocam a cabeça entre si.
- ✓ Morder a vedação: o animal morde a vedação que o separa de outro lince.
- ✓ Passeio em paralelo: o animal desloca-se em sincronia com outro lince, seguindo-o e por isso deslocando-se ambos em paralelo, num mesmo cercado ou em cercados contíguos.

Interação positiva (i+): Comportamento amistoso realizado por um animal a outro indivíduo. Não há exibição de comportamentos negativos/agressivos (pêlo eriçado, bufidos e/ou grunhidos). Esta categoria inclui os seguintes comportamentos:

- ✓ *Alogrooming*: o animal lambe e “mordisca” o pêlo do outro indivíduo
- ✓ Cheirar: o animal cheira o corpo de outro indivíduo.
- ✓ Girar sobre o solo: o animal roda o corpo no solo apoiado na espádua perto de outro indivíduo. Mais frequentemente na época de cio.
- ✓ Jogar: dois adultos realizam algum tipo de jogo social. Pode incluir: perseguição, mordidelas, etc.
- ✓ Marcar com urina: o animal marca com urina em jacto o corpo do outro indivíduo.
- ✓ Mostrar genitais: o animal coloca a zona genital perto do focinho do outro indivíduo com a cauda erguida.
- ✓ Roçar cara/corpo: o animal roça com as barbas ou com o corpo no outro indivíduo.
- ✓ Vocalizar: o animal emite um som semelhante a um miado. Pode ser acompanhado de uma ligeira elevação da cabeça, com movimentos das orelhas para trás e com um esticar da garganta.

Jogar:

Jogo com objectos (jo): o animal manipula um objecto inanimado com as patas. As formas mais frequentes são: golpear com as patas (com as garras retraídas), lançá-lo ao ar, saltar sobre o objecto ou lutar com este.

Jogo com presa (jp): o animal manipula a presa ou exhibe comportamentos que integram a sequência de comportamentos de caça, com a presa viva ou morta, e mesmo tendo a oportunidade de a capturar, matar ou comer não o faz. É frequente que a capture com a boca ou patas e a volte a soltar para o jogo continuar.

Jogo locomotor (jl): jogo do animal mediante a interacção com o meio, sem envolver especificamente outro indivíduo ou manipulação de objectos inanimados. Jogos de corridas, saltos e escalada.

Lamber-se/*Acicalarse* (a): Limpeza da pele ou pêlo com a língua ou com as patas dianteiras. Também se podem observar pequenos mordiscos na pele.

Lamber genitais (ag): se unido à fêmea e ocorrerem cópulas.

Marcar (x): o animal impregna com o seu odor um objecto do meio.

Com barbas (xb): o animal roça as barbas contra objectos, vegetação ou o solo. Pode cheirar previamente a zona onde se roça.

Com o corpo (xc): o animal gira o corpo esfregando-se no solo ou na vegetação.

Com patas (xp): o animal raspa com as patas uma superfície ou vegetação, afiando as garras.

Com urina (xo): o animal dirige a urina em jacto contra um objecto, principalmente em superfícies acima da cota soleira. Enquanto o faz mantém-se de pé com a cauda erguida e pode realizar um movimento vibratório desta. No caso de marcar crias posiciona os genitais à altura destas.

Montar (mo): o animal monta um lince ou outro elemento do seu ambiente. Pode incluir mordisco na nuca verificando-se as seguintes condições: a) os animais não são um par de adultos, b) são um par de adultos mas não se encontram em época reprodutiva, c) o comportamento é dirigido a um elemento que não outro lince (coelho ou objecto).

Observar (obs): o animal está parado (de pé sobre as 4 patas, sentado ou deitado) com os olhos abertos, movendo regularmente as orelhas. Caso exista simultaneamente o comportamento de cheirar anota-se “cheirar”.

Urinar/*Orinar* (o): O animal excreta urina em jacto. Posiciona-se com a zona ano-genital perto do solo, quase sentado. É frequente que faça previamente um buraco para urinar.

Anexo VI. Escala de classificação da condição corporal (CC) do lince-ibérico

A escala de classificação da condição corporal do lince-ibérico, foi realizada pelo grupo de manejo sanitário do lince-ibérico (Grupo de manejo sanitario del lince ibérico, 2014). Estando expressa seguidamente:

Classificação 1 na escala de CC - Caquexia: o animal não apresenta gordura e padece de atrofia muscular. Costelas, coluna vertebral, escápula e proeminências ósseas são visíveis (Figura 14);

Classificação 2 na escala de CC – Delgado: Gordura abdominal mínima e cintura abdominal muito evidente. Costelas, coluna vertebral, escápula e proeminências ósseas são visíveis (Figura 15);

Classificação 3 na escala de CC – Ideal: Pouca gordura abdominal, cintura abdominal evidente. Costelas, coluna vertebral, escápula e proeminências ósseas não são visíveis, mas são facilmente palpáveis (Figura 16);

Classificação 4 na escala de CC – Sobrepeso: Sem cintura abdominal, distensão abdominal evidente. As costelas, coluna vertebral, escápula e proeminências ósseas são dificilmente palpáveis (Figura 17),

Classificação 5 na escala de CC - Obeso: Depósitos adiposos massivos na região do tórax, coluna vertebral e abdômen. Distensão abdominal grande (Figura 18).

Figura 14 – Classificação 1 na escala de CC - Caquexia



(Grupo de manejo sanitario del lince ibérico, 2014)

Figura 15 – Classificação 2 na escala de CC – Delgado



(Grupo de manejo sanitario del lince ibérico, 2014)

Figura 16 – Classificação 3 na escala de CC – Ideal



Figura 17 – Classificação 4 na escala de CC – Sobrepeso



(Grupo de manejo sanitario del lince ibérico, 2014)

Figura 18 – Classificação 5 na escala de CC - Obeso



(Grupo de manejo sanitario del lince ibérico, 2014)

Anexo VII. Dados recolhidos nas sessões de observação contínua do sujeito em estudo

Tabela 9 – Duração em minutos, total e média, dos estados de actividade (activo, inactivo e fora de vista) do sujeito em estudo por sessão/dia de observação.

Dia de observação	Duração (minutos)			Total
	Actividade	Inactividade	Fora de vista	
05-12-2012	31,75	47,32	40,57	119,63
12-12-2012	34,75	54,17	30,43	119,35
13-12-2012	55,83	15,15	47,83	118,82
14-12-2012	51,75	13,97	55,15	120,87
15-12-2012	27,70	82,12	8,78	118,60
16-12-2012	14,98	82,98	21,50	119,47
17-12-2012	2,80	0,00	117,18	119,98
18-12-2012	13,87	0,00	105,97	119,83
19-12-2012	0,00	0,00	120,00	120,00
20-12-2012	101,37	0,00	14,97	116,33
21-12-2012	3,70	42,60	0,00	46,30
22-12-2012	99,78	4,78	13,85	118,42
23-12-2012	89,63	26,55	1,95	118,13

24-12-2012	12,87	105,47	1,32	119,65
25-12-2012	78,12	0,00	39,30	117,42
26-12-2012	65,02	52,65	1,22	118,88
27-12-2012	16,32	81,68	19,50	117,50
28-12-2012	9,63	110,07	0,00	119,70
29-12-2012	0,35	62,17	0,00	62,52
30-12-2012	45,18	9,75	61,03	115,97
31-12-2012	69,23	21,02	28,87	119,12
01-01-2013	61,17	33,18	21,97	116,32
03-01-2013	87,37	11,18	20,82	119,37
04-01-2013	17,30	77,00	24,93	119,23
05-01-2013	19,62	99,52	0,52	119,65
06-01-2013	5,27	114,57	0,00	119,83
07-01-2013	10,00	100,98	8,17	119,15
08-01-2013	29,00	11,93	76,68	117,62
09-01-2013	60,22	23,68	34,18	118,08
10-01-2013	48,95	50,35	18,10	117,40
11-01-2013	32,33	87,17	0,43	119,93
12-01-2013	0,00	0,00	120,00	120,00
13-01-2013	27,70	0,00	6,57	34,27
14-01-2013	9,12	105,35	0,00	114,47
17-01-2013	7,25	0,00	101,63	108,88
18-01-2013	14,35	0,00	104,60	118,95

Tabela 9 – (continuação)

Dia de observação	Duração (minutos)			
	Actividade	Inactividade	Fora de vista	Total
19-01-2013	14,88	89,98	14,65	119,52
20-01-2013	20,88	34,85	63,48	119,22
21-01-2013	34,57	0,00	81,97	116,53
22-01-2013	0,00	0,00	120,00	120,00
23-01-2013	6,63	85,07	30,60	122,30
24-01-2013	18,78	0,00	100,73	119,52
25-01-2013	14,43	32,18	70,63	117,25
26-01-2013	5,57	57,63	52,13	115,33
27-01-2013	0,00	119,95	0,00	119,95
28-01-2013	11,63	0,00	106,92	118,55
29-01-2013	23,47	0,00	95,60	119,07
30-01-2013	32,57	0,00	83,55	116,12
31-01-2013	19,92	0,47	95,68	116,07
01-02-2013	0,13	0,00	119,82	119,95
02-02-2013	10,02	0,00	107,48	117,50
04-02-2013	47,93	1,38	60,60	109,92

05-02-2013	2,40	104,83	12,68	119,92
06-02-2013	6,57	113,40	0,00	119,97
07-02-2013	18,90	102,02	0,00	120,92
08-02-2013	25,85	0,00	90,72	116,57
09-02-2013	46,58	0,00	67,23	113,82
10-02-2013	4,17	83,15	31,17	118,48
11-02-2013	1,25	28,93	60,72	90,90
12-02-2013	3,58	96,33	11,40	111,32
14-02-2013	0,00	0,00	120,00	120,00
16-02-2013	0,00	0,00	120,00	120,00
17-02-2013	9,40	7,72	102,70	119,82
18-02-2013	13,15	0,00	86,93	100,08
19-02-2013	0,00	0,00	120,00	120,00
21-02-2013	22,88	16,92	79,48	119,28
22-02-2013	81,42	0,00	31,23	112,65
24-02-2013	2,70	117,27	0,00	119,97
25-02-2013	0,00	0,00	120,00	120,00
Total	1754,53	2619,43	3526,13	7900,10
Média por sessão	25,43	37,96	51,10	114,49

Tabela 10 – Número de marcações (com urina, com patas, com corpo e total) realizadas pelo sujeito em estudo e respectivo número de sessões em que o comportamento foi observado.

	Marcação com urina	Marcação com patas	Marcação com corpo	Total
Nº de marcações	442	26	1	469
Nº de sessões em que o comportamento foi observado	25	16	1	28

Tabela 11 – Número de marcações (com urina, com patas, com corpo e total) realizadas pelo sujeito em estudo e a sessão/dia de observação respectiva/o.

Nº de marcações observadas				
Dia de observação	Com urina	Com patas	Com corpo	Total
18-12-2012	0	1	0	1
20-12-2012	21	0	0	21
23-12-2012	13	4	0	17
25-12-2012	11	2	0	13
30-12-2012	48	0	0	48
31-12-2012	0	1	0	1

01-01-2013	50	1	0	51
03-01-2013	33	1	0	34
04-01-2013	5	1	0	6
07-01-2013	3	0	0	3
08-01-2013	6	0	0	6
09-01-2013	6	0	0	6
10-01-2013	14	0	0	14
13-01-2013	23	0	0	23
18-01-2013	4	2	0	6
21-01-2013	5	0	0	5
25-01-2013	1	0	0	1
28-01-2013	1	0	0	1
29-01-2013	15	0	0	15
30-01-2013	34	0	0	34
31-01-2013	12	1	0	13
01-02-2013	0	1	0	1
02-02-2013	7	1	0	8
04-02-2013	33	3	0	36
08-02-2013	11	2	0	13
09-02-2013	22	3	0	25
18-02-2013	2	1	0	3
22-02-2013	62	0	1	63

Tabela 12 - Duração do tempo despendido, pelo sujeito em estudo, na realização de marcações (com urina, com patas, com corpo e total), por cada sessão/dia de observação, em que foi observado o comportamento.

Dia de observação	Duração (segundos)			Total
	Marcação com urina	Marcação com patas	Marcação com corpo	
18-12-2012	0,00	47,00	0,00	47,00
20-12-2012	48,00	5,00	0,00	53,00
23-12-2012	23,00	32,00	0,00	55,00
25-12-2012	12,00	10,00	0,00	22,00
30-12-2012	49,00	0,00	0,00	49,00
31-12-2012	0,00	8,00	0,00	8,00
01-01-2013	52,00	14,00	0,00	66,00
03-01-2013	34,00	23,00	0,00	57,00
04-01-2013	9,00	27,00	0,00	36,00
07-01-2013	4,00	0,00	0,00	4,00
08-01-2013	7,00	0,00	0,00	7,00
09-01-2013	6,00	0,00	0,00	6,00
10-01-2013	23,00	0,00	0,00	23,00
13-01-2013	28,00	0,00	0,00	28,00
18-01-2013	4,00	19,00	0,00	23,00

21-01-2013	8,00	0,00	0,00	8,00
25-01-2013	1,00	0,00	0,00	1,00
28-01-2013	1,00	0,00	0,00	1,00
29-01-2013	17,00	0,00	0,00	17,00
30-01-2013	47,00	0,00	0,00	47,00
31-01-2013	13,00	5,00	0,00	18,00
01-02-2013	0,00	6,00	0,00	6,00
02-02-2013	8,00	9,00	0,00	17,00
04-02-2013	44,00	49,00	0,00	93,00
08-02-2013	12,00	45,00	0,00	57,00
09-02-2013	24,00	23,00	0,00	47,00
18-02-2013	4,00	5,00	0,00	9,00
22-02-2013	63,00	0,00	21,00	84,00
Total	541,00	327,00	21,00	889,00

Tabela 13 - Número de marcações com urina realizadas pelo sujeito, por local do cercado e localização específica/elemento de enriquecimento ambiental.

Local do cercado	Localização específica/elemento de enriquecimento ambiental	Nº de marcações com urina
Campeio	Cortiça	1
	Caixa parideira	2
	Ervas	70
	Marçoço	26
	Perímetro	5
	<i>Penthouse</i>	3
	Total	107
Maneio grande	Caixa parideira	3
	Ervas	30
	Perímetro	1
	Poste 2 do telheiro	19
	Total	53
Maneio pequeno	Cortiça debaixo do telheiro	3
	Ervas	12
	Poste 1 do telheiro	20

Poste 2 do telheiro	247
Total	282

Tabela 14 - Número de marcações com patas realizadas pelo sujeito, por local do cercado e localização específica/elemento de enriquecimento ambiental.

Local do cercado	Localização específica/elemento de enriquecimento ambiental	Nº de marcações com patas
Campeio	Árvore	1
	Cortiça	3
	Maroço	3
	Total	7
Maneio grande	Cortiça	19
	Total	19

Tabela 15 – Número do cercado onde o animal permaneceu e localizações disponíveis, por dias de observação.

Dias de observação	Número do cercado onde permaneceu	Localizações disponíveis no cercado			
		Maneio grande	Maneio pequeno	Edifício parideira	Campeio
4.12 a 12.12	9	X	X	X	
13.12 a 19.12	8	X	X	X	
20.12 a 26.12	8				X
27.12 a 19.2	8	X	X	X	
20.02 a 27.02	8	X	X	X	X

Tabela 16 – Localizações disponíveis e respectivo número de sessões realizadas.

Localizações disponíveis	Nº de sessões
Maneio grande, maneio pequeno, edifício parideira e campeio	4
Apenas Campeio	7
Maneio grande, maneio pequeno e edifício parideira	58

Anexo VIII. Dados recolhidos da ficha de interações do casal de estudo

Tabela 17 - Número de interações (positivas, neutras, negativas e total) por dia de observação.

Dia de observação	Número de interações observadas			
	Positivas	Neutras	Negativas	Total
16.12.2012	1	0	0	1
28.12.2012	1	0	0	1
29.12.2012	2	0	0	2
27.02.2013	2	0	0	2
28.02.2013	1	1	0	2
02.03.2013	2	1	0	3
15.03.2013	5	2	0	7
22.03.2013	3	0	0	3
31.03.2013	1	1	0	2
04.04.2013	2	1	0	3
12.04.2013	0	1	0	1
09.05.2013	22	5	2	29
10.05.2013	68	57	13	138

11.05.2013	31	18	2	51
12.05.2013	41	44	1	86
13.05.2013	18	13	0	31
15.05.2013	44	24	0	68
16.05.2013	11	2	0	13
17.05.2013	40	20	0	60
18.05.2013	6	5	0	11
19.05.2013	4	0	0	4
20.05.2013	1	0	0	1
22.05.2013	8	0	0	8
24.05.2013	4	4	0	8
25.05.2013	3	0	0	3
26.05.2013	2	2	0	4
27.05.2013	8	2	0	10
28.05.2013	3	0	0	3
31.05.2013	2	0	0	2
Total	336	203	18	557