

Avaliação do nível de cortisol em amostras de pelo de Lobo

Patrícia Alexandra de Oliveira Pereira

Mestrado de Ecologia e Ambiente

Departamento de Biologia

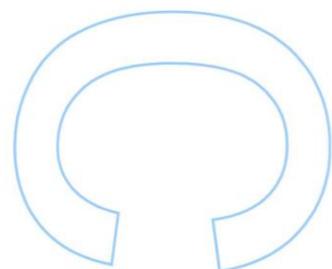
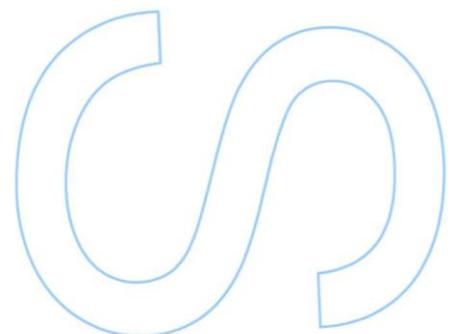
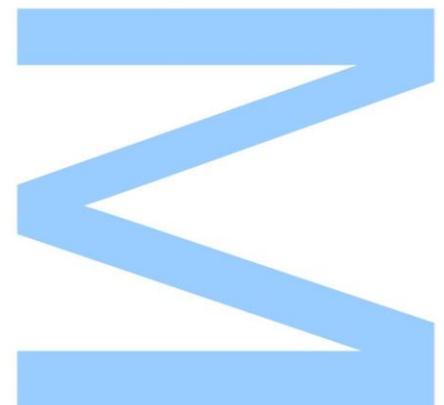
2020

Orientador

Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos Santos, Investigador Post-Doc,
CIBIO-InBIO

Co-orientador

Francisco Jorge Álvares, Investigador Post-Doc,
CIBIO-InBIO

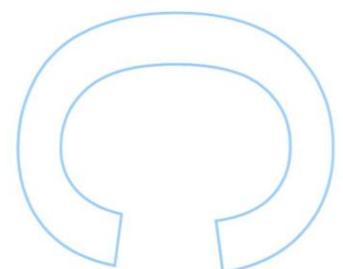
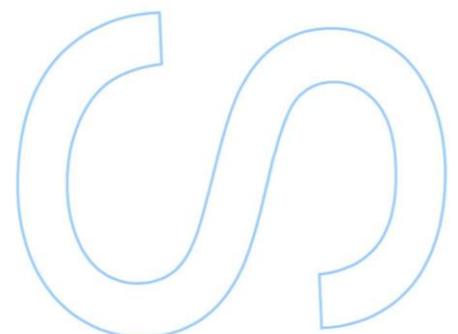
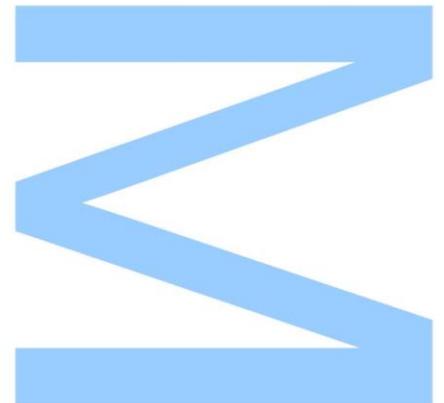




Todas as correções
determinadas pelo Júri, e só
essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ___/___/___



Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e ao Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos por terem possibilitado e reunido todas as ferramentas e condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Doutor Nuno Gonçalo Carvalho Caroço dos Santos, por ter aceitado orientar e sugerir este estudo, pela ajuda na elaboração da dissertação, por toda a disponibilidade prestada, pela confiança e por me ter levado e mostrado vários cantos de Portugal.

Ao meu co-orientador Doutor Francisco Álvares, pela ajuda e apoio durante a elaboração da dissertação.

A toda a equipa do CIBIO que me apoio e ajudou durante a componente experimental desta dissertação.

Aos meus pais e irmão que aturaram todo o meu mau humor e *stress* durante os últimos dois anos e aos meus amigos por me terem motivado e impedido de desistir em todo o meu percurso académico.

Por último, mas não menos importante, a mim própria, que perseverei e ultrapassei todos os obstáculos com sucesso, atigindo todos os meus objetivos.

Resumo

O lobo (*Canis lupus* Lineu, 1758) é um carnívoro de grande porte originalmente distribuído por grande parte da Europa, Ásia e América do Norte, capaz de se adaptar a uma grande variedade de habitats. Na Europa, as suas populações sofreram uma acentuada regressão durante os últimos anos devido à perseguição humana e alterações do habitat, verificando-se recentemente uma recuperação populacional, nomeadamente na Península Ibérica. Face à crescente expansão humana e distintos regimes de gestão de que o lobo é alvo (e.g. proteção vs. controlo populacional), torna-se necessário perceber os níveis de *stress* crónico que poderão estar a afetar as suas populações. O objetivo deste estudo é determinar que fatores estão relacionados com a variação da concentração de cortisol no pelo de lobos, numa perspectiva metodológica (e.g. tipo de pelos amostrados), geográfica (e.g. várias populações Europeias) e temporal (e.g. ao longo do séc. XX na Península Ibérica). A concentração de cortisol no pelo (CCP) foi analisada através de um ensaio de imunoabsorção enzimática em 456 amostras provenientes de 274 lobos das populações Ibéricas (Portugal, Cantábria, Astúrias, Galiza, Castela e Leão e Aragão), Alpinas, Escandinavas e Dináricas. A média de CCP foi de 16.01 ± 44.86 pg/mg. Os resultados do modelo linear misto das amostras Europeias mostraram diferenças significativas entre as regiões corporais amostradas, com menor CCP em relação à região lombar ($p=0.023$ para a região tórax ventral e $p=0.034$ para a cauda, sem diferenças na região cervical) e, incidência de doenças crónicas infecciosas ($p<0.001$). O peso do pelo usado para extração, o comprimento do pelo usado para extração e o tempo de armazenamento (até 4 anos) não mostraram diferenças significativas. Relativamente às amostras ibéricas, verificou-se diferenças não significativas nos subadultos ($p=0.175$), nas populações históricas a Norte ($p=0.1152$) e a Sul ($p=0.2744$) do Tejo, na população da Galiza ($p=0.2376$), no comprimento corporal ($p=0.103$) e na densidade de estradas ($p=0.054$). Apesar de não serem significativos, a densidade de alcateias ($p=0.591$) e a condição corporal, SMI (Scaled Mass Index) ($p=0.528$) mostrou uma tendência negativa com a CCP, que foi maior em fêmeas do que em machos. Os resultados preditos pelo modelo mostraram que a CCP tem um pico durante a época de acasalamento e atinge o seu mínimo durante a fase de partos, e os valores aumentam ligeiramente nos anos mais recentes. Sugerimos que a inibição potencial do efeito das hormonas reprodutivas pelo aumento do cortisol durante a época de acasalamento pode contribuir para explicar a existência de não reprodutores numa alcateia. Os resultados obtidos comprovam a CCP como um biomarcador de *stress* crónico em lobos num período retrospectivo de várias semanas, sendo, no entanto crucial uma uniformização da amostragem e das técnicas de análise.

Palavras-chave: Península Ibérica, Populações Europeias de lobo, Perspetiva histórica, *Stress* crónico, Glicocorticoides

Abstract

The wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) is a large carnivore originally distributed across Europe, Asia and North America and capable of adapting to a wide range of habitats. In Europe, wolf populations have suffered a sharp decline during the last centuries due to human persecution and habitat changes, with a recent population recovery, mainly in the Iberian Peninsula. Given the increasing human expansion and distinct wolf management regimes in Europe (e.g. protection vs. culling), it becomes necessary to understand the levels of chronic *stress* that may be affecting wolf populations. The aim of this study is to determine which factors are related to the variation in hair cortisol concentration, in a methodological (e.g. type of sampled hairs), geographical (e.g. several European wolf populations) and historic perspective (e.g. along XXth century in Iberian Peninsula). The hair cortisol concentration (HCC) was analyzed through an enzyme-linked immunosorbent assay with 456 samples belonging to 274 wolves from the Iberian (Portugal, Cantabria, Asturias, Galicia, Castile and Leon and Aragon), Alpine, Scandinavian and Dinaric wolf populations. The mean HCC was 16.01 ± 44.86 pg/mg. The results of the mixed linear model for the European dataset showed significant differences in the sampled body regions with lower HCC compared to lumbar region ($p=0.023$ for the ventral thorax and $p=0.034$ for the tail, without differences in the cervical region), incidence of chronic infectious diseases ($p<0.001$). The weight of hair used for extraction, the length of hair used for extraction and the storage time (up to 4 years) did not show significant differences. The Iberian dataset showed non-significant results in the subadults ($p=0.175$), in the historical populations at north ($p=0.1152$) and south ($p=0.2744$) of Tejo river, in the population of Galicia ($p=0.2376$), body length ($p=0.103$) and road density ($p=0.054$). Although not significant, the density of wolves' packs ($p=0.591$) and SMI ($p=0.528$) showed a negative trend with HCC and was higher in females than in males. Results predicted by the model showed that the HCC peaked during the mating season and reached its minimum during the parturition, and the values increased slightly in recent years. We suggest that the potential inhibition effect of reproductive hormones by increasing cortisol during the mating season may contribute to explain the existence of non-reproducers in a pack. These results support HCC as a reliable chronic *stress* biomarker in wolves over a period of several weeks, although standardization of sampling and analysis techniques is key to a rigorous assessment.

Keywords: Iberian Peninsula, European wolf populations, Historic perspective, Chronic *stress*, Glucocorticoids

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O LOBO COMO CASO DE ESTUDO: ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO.....	1
1.1.1. <i>Distribuição da espécie</i>	1
1.1.2. <i>Ecologia da espécie</i>	4
1.1.3. <i>Fatores de ameaça</i>	7
1.1.4. <i>Conservação do lobo na Europa</i>	11
1.2. A IMPORTÂNCIA DO CORTISOL NA FISIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO.....	14
1.2.1. <i>Fisiologia da conservação</i>	14
1.2.2. <i>Fisiologia do stress</i>	15
1.2.3. <i>Cortisol no pelo</i>	17
1.3. O ESTUDO DE NÍVEIS DE CORTISOL NA CONSERVAÇÃO DO LOBO.....	18
1.4. OBJETIVOS.....	19
2. METODOLOGIA	20
2.1. ÁREA DE ESTUDO E RECOLHA DE AMOSTRAS.....	20
2.2. EXTRAÇÃO DE CORTISOL DO PELO.....	21
2.3. EXTRAÇÃO DE CORTISOL.....	25
2.4. DETERMINANTES DA CONCENTRAÇÃO DE CORTISOL NO PELO.....	26
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
2.5.1. <i>Análise das amostras de lobo da Europa</i>	31
2.5.2. <i>Análise das amostras de lobo da Península Ibérica</i>	32
3. RESULTADOS	33
3.1. NÍVEIS DE CORTISOL NAS POPULAÇÕES EUROPEIAS DE LOBO.....	33
3.2. NÍVEIS DE CORTISOL NAS SUB-POPULAÇÕES IBÉRICAS DE LOBO.....	37
4. DISCUSSÃO	42
4.1. NÍVEIS DE CORTISOL NAS POPULAÇÕES EUROPEIAS DE LOBO.....	42
4.2. NÍVEIS DE CORTISOL NAS POPULAÇÕES IBÉRICAS DE LOBO.....	46
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7. ANEXOS	62

Lista de figuras

Figura 1 – Distribuição do lobo na Europa, no seu mínimo populacional durante as décadas de 1950-1970 (a) em comparação com a sua distribuição em 2011 (Retirado de: Chapron et al., 2014).....	2
Figura 2 - Evolução histórica da distribuição do lobo na Península Ibérica (Retirado de: Álvares, 2011).....	3
Figura 3 - Distribuição geográfica dos locais de recolha das amostras analisadas de pelo de lobo.	20
Figura 4 - Exemplar de amostra de pelo de lobo no processo de pré-extração.....	22
Figura 5 - Amostras de pelo de lobo durante o processo de lavagem.....	22
Figura 6 - Amostras de pelo de lobo a serem cortadas para tubos Eppendorf PP de 2ml	23
Figura 7 - Amostras de pelo de lobo após a saírem da centrífuga	23
Figura 8 - Amostras de pelo de lobo a serem transferidas para os frascos de vidro ...	24
Figura 9 - Amostras de pelo de lobo durante o processo de evaporação de metanol .	24
Figura 10 - Resultado de um dos testes ELISA para extrair o cortisol das amostras de pelo de lobo	25
Figura 11 - Distribuição das medições de cortisol em pelo de lobo (CCP).....	29
Figura 12 - Concentração de cortisol no pelo de lobo, por região corporal.	33
Figura 13 - Concentração de cortisol no pelo de lobo, divididas por classes de causa de morte ou captura.	34
Figura 14 - Concentração de cortisol no pelo de lobo, por peso do pelo usado na extração de cortisol. A faixa cinzenta corresponde ao desvio-padrão da relação quadrática entre o peso do pelo e a CCP.....	35
Figura 15 - Concentração de cortisol no pelo de lobo, por tempo de armazenamento	35
Figura 16 - Variação mensal da concentração de cortisol no pelo de lobos fêmea da população Ibérica preditos pelo modelo linear misto	37
Figura 17 - Concentração de cortisol no pelo de lobo prevista pelo modelo linear misto, em cada uma das populações europeias e utilizando lobos fêmea em janeiro	37
Figura 18 – Concentração de cortisol no pelo de lobos Ibéricos, por comprimento corporal do individuo amostrado	40
Figure 19 - Concentração de cortisol no pelo de lobos Ibérico, por idade do individuo amostrado.....	40
Figure 20 – Concentração de cortisol no pelo de lobos Ibéricos, por densidade de estradas	41

Figura 21 - Concentração de cortisol no pelo de lobos Ibéricos, por densidade de alcateias..... 41

Figura 22 - Concentração de cortisol no pelo de lobos fêmea da população Ibérica ao longo das últimas décadas, preditos pelo modelo linear misto 42

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resumo das variáveis intrínsecas, metodológicas e ambientais analisadas para avaliar os níveis de cortisol em pelo de lobo. ³Todas as variáveis ambientais foram medidas num Buffer de 500km² dos pontos das amostras 27

Tabela 2 - Resumo das amostras de pelo de lobo por idade, sexo, regiões corporais e captura/causa de morte utilizadas no conjunto de amostras Europeias de modo a avaliar os fatores de *stress* intrínsecos e metodológicos..... 30

Tabela 3 - Resumo das amostras de pelo de lobo por idade, sexo, regiões corporais e captura/causa de morte utilizadas no conjunto de amostras Ibéricas de modo a avaliar os fatores de *stress* intrínsecos e metodológicos..... 30

Tabela 4 - Resumo das amostras de pelo de lobo por idade, sexo, regiões corporais e captura/causa de morte utilizadas no conjunto de amostras Ibéricas de modo a avaliar os fatores de *stress* intrínsecos e metodológicos e ambientais 31

Tabela 5 - Resultados do modelo linear misto da concentração de cortisol no pelo de lobo, por região corporal. O lobo como indivíduo está incluído como efeito aleatório. Os valores com diferenças significativas encontram-se assinalados a negrito..... 33

Tabela 6 - Resumo dos resultados do modelo linear misto final dos fatores determinantes intrínsecos e metodológicos da concentração de cortisol no pelo de lobo para as populações europeias. Os valores com diferenças significativas (<0,05) encontram-se assinalados a negrito e os valores próximos de 0,05 encontram-se a sublinado. 36

Tabela 7 - Resumo dos resultados do modelo linear misto final dos fatores determinantes intrínsecos e metodológicos na concentração de cortisol no pelo de lobo

para as subpopulações Ibéricas. Os valores com diferenças significativas encontram-se assinalados a negrito e os valores próximos de 0,05 encontram-se a sublinado. 38

Tabela 8 - Resumo dos resultados do modelo linear misto final dos fatores determinantes ambientais na concentração de cortisol no pelo de lobo para as subpopulações Ibéricas..... 39

Tabela 9 - Resumo do LMM com eliminação backwards stepwise das variáveis intrínsecas e metodológicas analisadas no conjunto de amostras de pelos de lobo Europeia..... 62

Tabela 10 - Resumo do LMM com eliminação backwards stepwise das variáveis intrínsecas e metodológicas analisadas no conjunto de amostras de pelos de lobos Ibéricos 63

Tabela 11 - Resumo do LMM com eliminação backwards stepwise das variáveis intrínsecas, metodológicas e ambientais analisadas no conjunto de amostras de pelos de lobos Ibéricos 63

Lista de abreviaturas

AIA	Avaliação de impacto ambiental
CCP	Concentração de cortisol no pelo
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GCs	Glucocorticoides
HCC	Hair cortisol concentration
HFI	Human Footprint Index
HHA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
LMM	Linear Mixed Model
SMI	Scaled Mass Index

1. Introdução

1.1 O lobo como caso de estudo: ecologia e conservação

1.1.1. Distribuição da espécie

O lobo (*Canis lupus* Lineu, 1758) é um canídeo social generalista, adaptável e altamente resiliente, com uma ampla distribuição por todo o hemisfério norte (Blanco, 2019). São predadores inteligentes que se adaptaram a uma grande variedade de habitats, desde a tundra do Ártico aos desertos da Arábia, evitando apenas pântanos e florestas tropicais (Geffen *et al.*, 2004). Tal como outros grandes carnívoros, são esquivos, principalmente noturnos, percorrem longas distâncias e ocorrem em baixas densidades (Blanco e Cortés, 2012). O lobo é capaz de tolerar uma ampla variação de condições ambientais, com temperaturas de -56°C a +50°C (Álvares, 2011). As diferentes populações, no entanto, adaptam-se às condições locais e especializam-se no uso de habitats para refúgio e procura de alimento, fisiografia e seleção de presas (Paquet e Carbyn, 2003).

Historicamente, o lobo distribuía-se pelo continente Europeu, Asiático e Norte-americano, exceto em poucas ilhas. Na América do Norte, a área de distribuição de lobos espalhava-se até ao sul do México (Corsi *et al.*, 1999), e eram encontrados em todo o território, exceto no sudeste dos Estados Unidos da América, na Califórnia (a oeste da Sierra Nevada) e nas partes tropicais e subtropicais do México (Paquet e Carbyn, 2003). A distribuição natural na Europa cobria maior parte do continente (Zlatanova e Popova, 2013) até aos finais do século XVIII (Boitani, 2000). No entanto, a partir do final do século XIX, e especialmente nos anos posteriores à Segunda Guerra Mundial, esta espécie foi exterminada de vários países da Europa central e do Norte (Boitani, 2000). Aparentemente, apenas sobreviveu nas penínsulas a sul (Península Ibérica, Itália e Balcãs) e nos países do Leste (Boitani, 2000) (Fig.1).

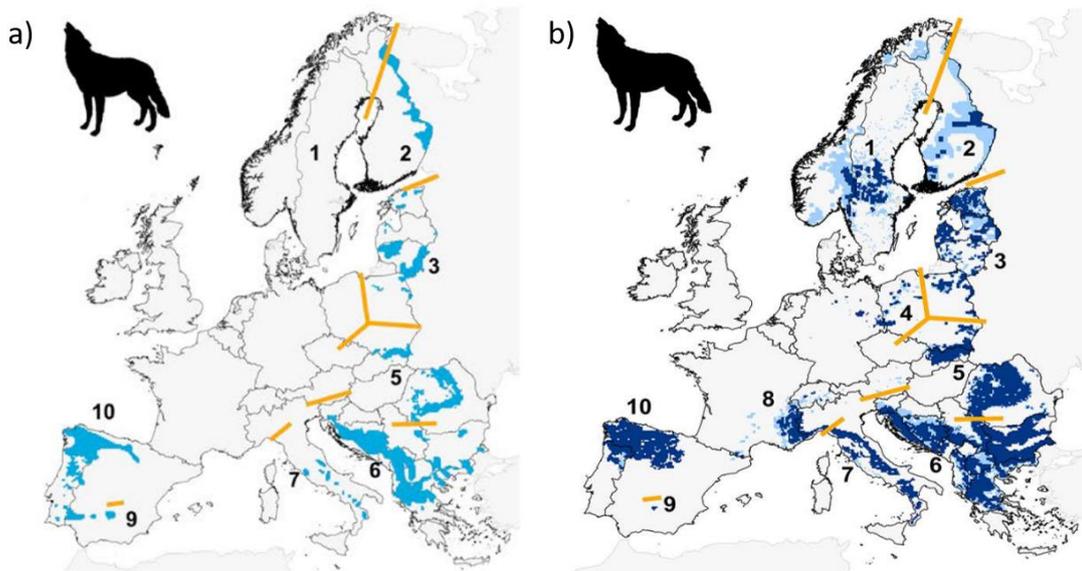


Figura 1 – Distribuição do lobo na Europa, no seu mínimo populacional durante as décadas de 1950-1970 (a) em comparação com a sua distribuição em 2011 (Retirado de: Chapron et al., 2014). Os números indicam as diferentes populações Europeias: 1: Escandinava; 2: Carélia; 3: Báltica; 4: Cárpata; 5: Balcãs Orientais; 6: Dinárica; 7: Central Alpina; 8: Alpina; 9: Central Ibérica; 10: Cantábrica;

Nos últimos anos, as populações de lobos em vários países europeus aumentaram em número e área de distribuição (Nowak e Myslajek, 2017). As populações de lobo de alguns países de leste expandiram-se para o oeste e, ao mesmo tempo, lobos italianos migraram para o norte, recolonizando países como França, Alemanha e República Checa (Boitani, 2000). Atualmente existem populações em Portugal, Espanha, Itália, Grécia e Finlândia e populações mais numerosas a leste. Durante os últimos vinte anos, a espécie tem estado a recuperar naturalmente em várias partes da Europa verificando-se uma tendência positiva, embora incerta, em número e área de distribuição das populações da França, Alemanha, Suíça, Suécia e Noruega, devido a esforços de recolonização (Boitani, 2000).

Na Península Ibérica, uma população de lobos remanescentes (*Canis lupus signatus*) atingiu o seu mínimo populacional na década de 1970, tendo apenas persistido principalmente no Noroeste Ibérico (Fig.2). Embora os lobos em Portugal estejam listados como “em perigo” e totalmente protegidos desde 1988, em Espanha os lobos são considerados “quase ameaçados” e podem ser legalmente caçados a norte do Rio Douro (Anexo IV e V da Diretiva de Habitats) (Trouwborst, 2014). Recentemente, a população do Noroeste Ibérico começou a aumentar e a expandir-se para o sul e leste. É interessante notar que durante as últimas cinco décadas, os lobos persistiram não só no norte de Portugal (Torres e Fonseca, 2016), mas também na região noroeste de Espanha – Galiza – onde persistiram com altos níveis de densidade e atividade humana

(cerca de 80 a 90 habitantes/km²) (Llaneza et al., 2012). A população ibérica constitui a maior população de lobos da Europa Ocidental (Blanco, 2019) composta por um mínimo de 254 alcateias (Chapron et al., 2014). A maioria das populações tem aumentado ou estabilizado nos últimos anos, e as estimativas mais recentes sugerem que na Península Ibérica não existam mais de 2000 lobos (Blanco e Cortés, 2012; Torres e Fonseca, 2016). Estes estão principalmente reunidos numa população numerosa e contínua na região noroeste e em duas outras populações isoladas: uma delas na Andaluzia (Serra Morena, sul de Espanha) que está virtualmente extinta com apenas uma alcateia detetada em 2010 (Gómez-Sánchez *et al.*, 2018), e a outra população na região do centro de Portugal, a sul do rio Douro (Blanco e Cortés, 2012; Torres e Fonseca, 2016). Em Portugal, os lobos desapareceram progressivamente desde inícios do século XX, nas regiões do litoral, sul e centro do país (Trouwborst *et al.*, 2015; Torres e Fonseca, 2016).

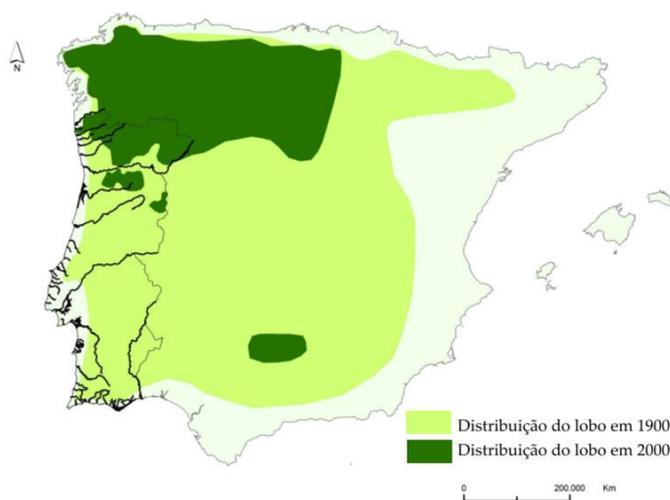


Figura 2 - Evolução histórica da distribuição do lobo na Península Ibérica (Retirado de: Álvares, 2011)

Um cenário semelhante ao Europeu ocorreu nos Estados Unidos da América e no Canadá nos inícios do século XX, sendo que nos EUA apenas restaram populações no Alasca e norte de Minnesota, e no Canadá a espécie foi exterminada em New Brunswick, Nova Escócia, Newfoundland, partes do sul de Quebec e Ontário (Paquet e Carbyn, 2003). No continente Norte-americano, devido a programas de recuperação, o declínio na distribuição e abundância das populações foi revertido. Foram desenvolvidos programas para reintroduzir lobos no Parque Nacional de Yellowstone, em Idaho, no Arizona e no Novo México (Paquet e Carbyn, 2003). A distribuição do lobo na América do Norte agora está confinada principalmente à metade norte do continente, no Alasca e Canadá. Nos EUA contíguos, existem populações no norte de Minnesota, no norte de

Wisconsin e na Península Superior de Michigan, e em partes de Washington, Idaho e Montana (Paquet e Carbyn, 2003).

A Europa alberga o dobro de lobos (>11.000) que os Estados Unidos contíguos (~ 5.500 lobos), apesar de ter metade do tamanho (4,3 milhões de km² contra 8 milhões de km²) e ser duas vezes mais densamente povoada (97 habitantes/km² contra 40 habitantes/km²) (Chapron *et al.*, 2014). O número total de lobos que vivem em países europeus é relativamente alto, no entanto, apenas 6 países têm uma população de mais de 1000 lobos, apenas 11 países têm mais de 500 e 8 países têm populações muito reduzidas com menos de 50 animais (Boitani, 2000).

1.1.2. Ecologia da espécie

Um lobo macho adulto pesa entre 20 e 80 kg; as fêmeas são menores com cerca de 15 a 55 kg, sendo que os maiores animais são encontrados em latitudes mais a norte. O comprimento total da cabeça e do corpo num lobo adulto é 110-148 cm. Os lobos são digitígrados e as suas pegadas são semelhantes às de um cão grande, mostrando 4 dedos e as unhas. O quinto dedo é encontrado apenas nas patas dianteiras e não toca no solo (Boitani, 2000). Tem uma longevidade máxima de cerca de 13 anos em liberdade e um tempo de geração de 3 a 4 anos (Mech and Boitani, 2010). As alcateias são a unidade social e reprodutiva básica de uma população e são tipicamente grupos familiares formados por um casal reprodutor dominante e os seus descendentes, que ocupam um território exclusivo, cuja dinâmica e estrutura dependem essencialmente da produtividade, mortalidade e dispersão (Álvares, 2011). Estas alcateias normalmente contêm 5 a 8 membros, mas já foram relatadas alcateias de 36 membros, e são mantidas unidas por fortes laços afetivos que se desenvolvem, são reforçados e se fixam nas crias durante os primeiros 5 meses de vida (Mech, 1974). Estes laços sociais entre os componentes da alcateia regulam a estabilidade interna e dinâmica dos grupos familiares. Uma hierarquia linear entre os membros é construída e mantida através de um comportamento agressivo ritualizado. Indivíduos com nível de domínio mais alto têm a maioria das iniciativas e dos privilégios associados à alimentação e reprodução (Boitani, 2000). A hierarquia de dominância muda constantemente, sendo que a maioria das mudanças de estatuto social ocorre antes e durante a estação reprodutiva (Boitani, 2000).

Cada grupo familiar de lobos tem o seu próprio território, uma zona de caça mais ou menos exclusiva, que geralmente sinalizam por meio de marcação olfativa (por fezes e

urina) e acústica (os uivos) (Blanco, 2019). O tamanho do território depende de muitos fatores, mas principalmente da quantidade de alimento disponível. De forma geral, quanto mais presas um território tem, menor é a sua dimensão (Blanco, 2019). O território de um lobo é geralmente definido como uma área dentro da qual pode aceder a todos os seus requisitos biológicos anuais: o habitat sazonal de alimentação, as necessidades térmicas e de segurança, as deslocações, o refúgio e a reprodução são todos requisitos essenciais à sua vida (Paquet e Carbyn, 2003). Em geral, grandes áreas de floresta são particularmente adequadas para lobos na Europa, embora os lobos não sejam principalmente uma espécie florestal (Boitani, 2000). Dada a sua relevância para o sucesso reprodutivo, espera-se que os lobos localizem estrategicamente os locais de nascimento das crias para garantir um cuidado parental adequado, o fornecimento de alimentos e proteção contra predadores, incluindo mortes territoriais intraespecíficas (Ciucci *et al.*, 2018). Territórios mantidos por alcateias cobrem desde menos de umas centenas a alguns milhares de quilómetros quadrados, com os maiores na zona mais a norte da sua distribuição geográfica. De facto, uma correlação positiva foi encontrada entre a latitude e o tamanho do território dos lobos na Europa (Jedrzejewski *et al.*, 2007). O tamanho do território varia muito, dependendo da densidade de lobos e presas, características geográficas, distúrbios humanos e infraestruturas antropogénicas (Boitani, 2000). A dimensão média dos territórios do lobo é cerca de 200 km² nas regiões temperadas da América do Norte e Europa (quando estão disponíveis ungulados de médio porte), cerca de 800 km² (quando só existem ungulados de grande porte), cerca de 5,000 km² em regiões árticas e sub-árticas (quando há reduzida densidade de ungulados), e superior a 60,000 km² (quando estão disponíveis presas que efetuam longas migrações sazonais) (Álvares, 2011).

Os vários membros de uma alcateia têm diferentes hierarquias sociais e usam o habitat de maneiras diferentes, o que afeta a extensão em que cada um pode ser detetado. Existem lobos periféricos, que geralmente evitam o núcleo da alcateia, e flutuantes, que são lobos solitários e altamente móveis que tentam estabelecer um território fixo (Blanco e Cortés, 2002). Estes animais dispersam-se dos seus territórios parentais em busca de uma nova área para se estabelecer, ou podem ter sido rejeitados pela sua alcateia, o que acontece, por exemplo, quando um lobo dominante perde o seu lugar hierárquico (Boitani, 2000). Os lobos dispersantes preenchem lacunas deixadas quando os membros da alcateia morrem, contribuindo assim para a estabilidade da população (Blanco e Cortés, 2002). Eles movem-se principalmente ao longo da periferia dos territórios existentes e caçam sozinhos. A distância de dispersão pode ser substancial

sendo que na América do Norte verificou-se ser entre 8 e 354 km (886 km no máximo) (Boitani, 2000), e na Europa cerca de 390 a 1,092 km (Ciucci *et al.*, 2009).

Como regra geral, apenas uma fêmea dá à luz em cada alcateia, mas às vezes duas ou até três fêmeas, normalmente com grau de parentesco entre si, podem dar à luz (Blanco and Cortés, 2002) pois o acasalamento pode ocorrer entre membros adultos dentro dos grupos ou entre lobos machos solitários que se emparelham com fêmeas da alcateia durante o período de reprodução (Mech, 1974). Uma alcateia geralmente tem uma a três fêmeas reprodutoras, mas os outros membros adultos ajudam na criação dos filhotes (Paquet e Carbyn, 2003). As crias nascem na primavera após um período de gestação de 61 a 64 dias. O tamanho médio da ninhada é de 6 e varia de 1 a 11 crias (Boitani, 2000; Álvares, 2011). Em ambientes naturais, a sobrevivência da descendência após o primeiro inverno está fortemente correlacionada com a densidade de presas. Os lobos atingem a maturidade sexual aos dois anos de idade (Boitani, 2000), mas geralmente não acasalam até aos três anos de idade devido à estrutura social hierárquica do grupo (Paquet e Carbyn, 2003). Os animais jovens permanecem na alcateia até aos dois anos de idade, quando enfrentam a alternativa de dispersar em busca de um novo parceiro e território, ou permanecer na alcateia e tentar alcançar níveis mais altos de dominância na hierarquia (Boitani, 2000).

Embora o lobo seja reconhecido como um predador generalista, a sua ecologia alimentar difere em toda a Europa e parece estar relacionada principalmente com a abundância de presas selvagens, a idade e condição física das presas, tipo de alimento disponível e medidas de proteção (Figueiredo *et al.*, 2020). São maioritariamente caçadores de ungulados, lagomorfos e roedores (Álvares, 2011), entre os quais escolhem os indivíduos mais vulneráveis, isto é, as crias, os mais velhos, aqueles que sofrem de alguma doença ou lesão ou que se aventuraram longe de refúgios (Blanco, 2019). Nos ecossistemas humanizados e com reduzida disponibilidade de presas selvagens, grande parte do alimento pode vir de animais domésticos e de resíduos associados a lixo de origem humana, os quais podem representar a principal fonte de alimento em algumas regiões (Blanco e Cortés, 2002; Ciucci *et al.*, 2020). Apesar de poder ter hábitos necrófagos, o lobo é essencialmente um predador que caça cooperativamente com a alcateia, embora com uma reduzida (10-50%) taxa de sucesso predatório (Álvares, 2011). Na Europa central e do Norte, devido à alta abundância de presas selvagens, como por exemplo, veado (*Cervus elaphus*), corço (*Capreolus capreolus*) e javali (*Sus scrofa*), a dieta dos lobos é baseada principalmente nessas espécies. No sul da Europa, no entanto, densidades mais baixas de presas selvagens

e paisagens humanizadas levaram os lobos a basear a sua dieta em animais domésticos e até mesmo lixo de origem antrópica (Figueiredo *et al.*, 2020). Avaliações à escalas continental e global, mostram que os lobos tendem a preferir os ungulados selvagens aos domésticos, quando ambos estão disponíveis (Zlatanova *et al.*, 2014; Newsome *et al.*, 2016).

No que respeita à Península Ibérica, um estudo realizado na Galiza (Noroeste Ibérico) mostra que os lobos se alimentam principalmente de póneis selvagens e gado bovino nas áreas situadas a norte e no centro, enquanto corços e javalis compõem a maior parte da dieta nas regiões a este (Lagos e Bárcena, 2018). A necrofagia também é uma importante fonte de alimento para os lobos em diversas áreas da Península Ibérica (Álvares, 2011; Lagos e Bárcena, 2018), desempenhando um papel significativo na estruturação das cadeias alimentares, pois representa uma transferência de energia entre os níveis tróficos sem alterações na demografia das espécies consumidas ou gasto de energia pelo predador para perseguir e matar sua presa (Ciucci *et al.*, 2020). Em Portugal, a dieta pode variar dependendo do local das alcateias. Nas regiões do noroeste do país, com reduzida densidade de ungulados selvagens e produção extensiva de gado, os ungulados domésticos como os caprinos, ovinos, bovinos e equinos, são as presas mais consumida (Vos, 2000; Álvares, 2011). Na região a sul do rio Douro, a cabra doméstica também é a presa mais consumida, seguida da vaca e ovelha (Torres *et al.*, 2015). Em relação às presas selvagens, em geral o javali é a espécie mais consumida, seguida do corço e dos lagomorfos (Vos, 2000; Álvares, 2011; Torres *et al.*, 2015). No entanto, os ungulados selvagens são a base da dieta dos lobos unicamente no município de Bragança, pois apresentam uma maior densidade e diversidade de espécies (Figueiredo *et al.*, 2020).

1.1.3. Fatores de ameaça

O lobo é o predador mais controverso da Europa, pois desperta fortes sentimentos nos humanos, sendo simultaneamente amado e odiado (Boitani, 2000). Por um lado, é considerado por muitos um símbolo da vida selvagem e uma ligação à natureza, enquanto para outros o lobo simboliza o medo, destruição e percepções negativas (Salvatori e Linnell, 2005). Muitas sociedades chamam o lobo de cruel e malvado, fazendo dele o papel de vilão, atribuindo-lhe defeitos que apenas correspondem ao ser humano (Blanco, 2019). Isto é devido principalmente a lendas e histórias falsas que enriqueceram este tópico. A percepção do lobo como um animal perigoso varia com as

culturas sendo que a literatura europeia e asiática até o século atual está repleta de relatos de ataques de lobos (Boitani, 2000). Na primeira metade do século XX, as condições ecológicas eram muito diferentes das contemporâneas e a infecção com o vírus da raiva era comum nos lobos, podendo ter ocorrido experiências negativas com humanos. No entanto, não há nenhuma evidência de que lobos selvagens não raivosos representem qualquer perigo para os humanos na Europa atual (Boitani, 2000) sendo que ataques a humanos são bastante raros (Carricondo-Sanchez *et al.*, 2020). Por outro lado, a predação sobre animais domésticos constitui uma realidade bem evidente e um dos maiores problemas na conservação da espécie (Pimenta *et al.*, 2017).

Na realidade, os ataques de lobo direcionados ao gado representam um comportamento completamente previsível num predador com as suas características (Blanco, 2019). Na Europa, como consequência da redução das populações de ungulados selvagens, os lobos tendem a consumir mais alimentos fornecidos pelo homem, incluindo lixo e espécies domésticas se estiverem vulneráveis à predação (Newsome *et al.*, 2016). Os seus grandes requisitos espaciais e a predação de gado doméstico provocam um alto potencial de conflito entre humanos e lobos. Este conflito enraizado entre este predador e os seres humanos devido à predação do gado é agravado principalmente em áreas onde a diversidade e a densidade de presas selvagens são mais reduzidas (Boitani, 2000). Isto é considerado uma grande preocupação de conservação para este grande carnívoro. Além disso, a desflorestação e a consequente diminuição das presas naturais também devem ser levadas em consideração (Torres e Fonseca, 2016; Figueiredo *et al.*, 2020). No entanto, as evidências mostram que a deficiente proteção do gado é o fator que mais favorece a predação pelo lobo (Pimenta *et al.*, 2017; Blanco, 2019). Sendo um predador de topo, o lobo exerce vários efeitos sobre outros componentes e processos do ecossistema onde está inserido. Alterações na sua abundância e presença, e também no seu comportamento predatório podem induzir alterações na dinâmica populacional das suas presas e, consequentemente, através de um efeito cascata, em todo o ecossistema (Álvares, 2011).

A falta de aceitação dos lobos por parte de humanos parece ser um grande problema, especialmente em locais onde os lobos recolonizaram áreas após um período de ausência. Isto está ligado a muitos conflitos diferentes pois, para além da depredação do gado, existem outros problemas como: competição com caçadores, predação de cães domésticos, medo e conflitos sociais (Salvatori e Linnell, 2005). Os lobos da Europa Ocidental causam mais danos do que em outras áreas menos povoadas do mundo, mas mesmo assim as perdas económicas são aceitáveis (Blanco, 2019). Pode

destacar-se, por um lado, que os ataques ao gado dependem mais da vigilância de que são alvo pelos seus proprietários e do número de animais por rebanho, do que da abundância de presas selvagens (Pimenta *et al.*, 2017). Por outro lado, a mortalidade causada pelo homem é proporcional à intensidade de ataques no gado (Pimenta *et al.*, 2017; Blanco, 2019). Como resultado, a conservação desta espécie tende a ser cada vez mais determinada não só por aspetos biológicos mas principalmente por questões económicas, políticas e ideológicas (Álvares, 2011).

A mortalidade causada pelo Homem, seja através de controle letal autorizado ou caça furtiva, parece ser o principal fator limitante para as populações de lobos (Suutarinen e Kojola, 2017). As principais causas de mortalidade do lobo são atropelamentos, tiro, caça furtiva, envenenamento, agressão por outros canídeos e doenças infecciosas (Álvares, 2011; Torres e Fonseca, 2016). Existem vários países onde a gestão de lobos baseada em controlos populacionais é claramente insustentável devido à morte excessiva de animais, e até mesmo programas estaduais sancionados (Salvatori and Linnell, 2005). Por outro lado, a morte do lobo adequadamente regulamentada parece ser compatível com a sua conservação em muitos países (Suutarinen and Kojola, 2017). Desta forma, compreender as razões pelas quais a aceitação varia tanto entre países pode ser importante para encontrar as soluções mais adequadas (Salvatori e Linnell, 2005).

Para além dos conflitos com o Homem, a degradação e fragmentação de habitat e a falta de presas também constitui um fator de ameaça para a espécie, sendo que a forte intervenção humana é a ameaça mais significativa ao seu habitat (Torres e Fonseca, 2016). O uso do solo pelos humanos não tem em consideração a simples necessidade da existência de áreas de refúgio seguras para que o lobo possa escapar à pressão humana. Com efeito, parece haver pelo menos dois fatores ambientais limitantes à ocorrência do lobo: cobertura vegetal e relevo topográfico que confira refúgio e diversidade de presas selvagens (Grilo *et al.*, 2019). Os lobos raramente são encontrados onde a densidade humana está acima de 30-40 pessoas/km² (Boitani, 2000). No entanto, os grandes carnívoros geralmente evitam interações com humanos e tendem a adaptar o seu comportamento espaço-temporalmente para diminuir o risco de interferência com humanos, como por exemplo, adotar hábitos noturnos (Carricondo-Sanchez *et al.*, 2020). A tendência do lobo de evitar riscos relacionados com o homem restringe fortemente a distribuição espacial de habitats adequados e a conectividade funcional em paisagens altamente modificadas pelos humanos (Rio-Maior *et al.*, 2019). A fragmentação de habitat pode também levar a uma maior dificuldade de dispersão,

devido a barreiras topográficas naturais ou antropogénicas (Geffen *et al.*, 2004). As restrições da paisagem parecem ser a principal razão pela qual as populações de lobo em habitats muito humanizados têm distâncias de dispersão mais curtas do que aquelas que vivem em áreas não perturbadas (Blanco e Cortés, 2007).

Outro crescente fator de ameaça, nomeadamente à integridade genética e evolutiva do lobo, é a hibridação com cães domésticos (Salvatori *et al.*, 2019). O risco de hibridização é considerado particularmente alto em alguns países mediterrâneos (Espanha, Portugal, Itália, Grécia e Israel), pois as populações de lobos são pequenas e habitam em áreas humanizadas com grande número de cães incontrolados (Torres e Fonseca, 2016). No entanto, também já foi documentado na Escandinávia, países bálticos e várias áreas da Europa Oriental (Randi *et al.*, 2014). Lobos e cães domésticos são iso cariotípicos (cariótipos idênticos) e foi demonstrado que acasalam com sucesso em cativeiro e na natureza quando coocorrem, produzindo descendência fértil (Verardi *et al.*, 2006; Hindrikson *et al.*, 2012). A hibridação é mais comum entre um lobo fêmea e cão macho mas o contrário já foi verificado (Hindrikson *et al.*, 2012). Embora a integridade do genoma não seja necessariamente interrompida pela hibridização, as consequências evolutivas a longo prazo da introgressão permanecem amplamente imprevisíveis (Randi *et al.*, 2014). A introgressão de genes domésticos em espécies selvagens pode inundar a diversidade genética, interromper equilíbrios epistáticos específicos da espécie e adaptações locais assim como conduzir populações locais ou espécies inteiras à beira da extinção genética (Randi *et al.*, 2014). A principal preocupação de conservação é a redução significativa da perda de adaptações específicas que podem levar à extinção de populações de lobos já pequenas e fragmentadas caso a introgressão seja suficientemente frequente (Hindrikson *et al.*, 2012). Múltiplos estudos revelam que os *pools* de genes de lobo e cão permanecem nitidamente distintos, sugerindo que a hibridização não é assim tão frequente e que a introgressão na natureza é contrabalançada por fatores comportamentais ou restrições seletivas (Verardi *et al.*, 2006). No entanto, devido ao perigo representado por hibridação com cães vadios, a pressão de caça sobre os lobos deve ser mantida sob controle, especialmente em áreas com baixa abundância de lobos, para manter a taxa de hibridização o mais baixa possível (Hindrikson *et al.*, 2012). A maioria dos países carece de legislação que trate dessa questão, o que torna o status legal do híbrido difícil de avaliar (Torres e Fonseca, 2016; Salvatori *et al.*, 2019).

Como se pode verificar, vários fatores interferem com a sobrevivência e conservação das populações de lobos, sendo que todos estes estão relacionados entre si e podem

ser atribuídos a uma causa comum, a pressão antropogénica. A fragmentação de habitat, diminuição de presas naturais e constante crescimento humano faz aumentar a incidência de conflitos que põe em risco este grande carnívoro.

1.1.4. Conservação do lobo na Europa

O lobo constitui uma das espécies de grandes carnívoros que tem sido alvo de maior número de estudos científicos e de ações de conservação (Álvares, 2011). A legislação internacional é especialmente importante na coordenação da conservação de espécies altamente móveis e de baixa densidade, cujas populações normalmente cruzam fronteiras e se estendem por vários países, como é o caso do lobo (Linnell *et al.*, 2017). As estratégias de gestão para o lobo variam consideravelmente em toda a sua área de distribuição mundial, verificando-se desde a perseguição total à proteção integral (Nowak e Myslajek, 2017). Na Europa, a legislação internacional de proteção do lobo mais importante é a Convenção de Berna de 1979 (Convenção sobre a Conservação da Vida Selvagem e Habitats Naturais Europeus) administrada pelo Conselho da Europa, e a Diretiva Habitats de 1992 (Diretiva do Conselho 92/43/CEE sobre a Conservação de Habitats Naturais e da Fauna e Flora Selvagens) administrada pelo União Europeia (Linnell *et al.*, 2017). Todos os países da União Europeia (UE) estão sujeitos a ambas as legislações, enquanto a maioria dos países europeus fora da UE estão sujeitos apenas à Convenção de Berna, o que limitou a perseguição ao lobo e resultou na recuperação da espécie em grande parte da Europa (Linnell *et al.*, 2017; Nowak e Myslajek, 2017).

O lobo é considerado uma espécie ameaçada de extinção em Portugal, e quase ameaçado na Espanha, sendo estritamente protegido em Portugal e protegido na Espanha pela Convenção de Berna (Anexos III e II respetivamente). Também é abrangido pela Diretiva Habitats da União Europeia (92/43/CEE), a qual contempla que o lobo seja estritamente protegido em todo Portugal e Espanha a sul do Rio Douro (Anexo IV), enquanto que a norte do Rio Douro em Espanha, pode ser alvo de gestão letal, se justificado (Anexo V). A Diretiva também inclui um mandato para a proteção do habitat do lobo, pela sua inclusão no Anexo II (Portugal e Espanha ao sul do Rio Douro), do qual algumas recomendações foram recentemente derivadas, incluindo a identificação, através de modelos espacialmente explícitos, de áreas potenciais para expansão e recolonização natural (Grilo *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas, devido às políticas de proteção legal, à recolonização natural e ao aumento de ungulados selvagens, as populações de lobos aumentaram e estão agora a expandir-se em alguns países da Europa. Em Portugal, para combater o drástico declínio verificado durante século XX, esta espécie é protegida por lei e encontra-se listada como “Ameaçada” no Livro Vermelho de Vertebrados de Portugal (Figueiredo *et al.*, 2020), com penalidades para captura ou morte de lobos, destruição e perturbação do habitat, principalmente durante a época de reprodução (Torres e Fonseca, 2016). Também em Itália, o lobo encontra-se totalmente protegido por lei, desde 1976 (Corsi *et al.*, 1999). Pelo contrário, em Espanha o lobo pode ser caçado, dependendo das cotas estabelecidas pelas várias regiões autónomas (Blanco e Cortés, 2012).

Muitas ferramentas de gestão da vida selvagem podem ser usadas para promover uma situação de coexistência em vez de conflito. Por exemplo, há uma série de medidas que podem ser adotadas para proteger animais domésticos de ataques de carnívoros, e existem muitas formas de diálogo estruturado para desarmar conflitos sociais (Linnell *et al.*, 2017). O número de áreas protegidas deve ser aumentado em alguns locais e a eficácia das reservas existentes de menores dimensões ou com configurações inadequadas devem ser melhoradas com a criação de zonas-tampão. Na maioria das vezes, a gestão de populações de lobos fora de áreas protegidas também poderia ser melhorada (Paquet e Carbyn, 2003).

Em contraste, o uso de medidas letais que envolvem a morte de animais selvagens é altamente controverso, do ponto de vista ecológico, social e legal (Linnell *et al.*, 2017). À medida que as populações de lobos continuam a crescer em áreas recém-colonizadas, pode haver uma necessidade crescente de controle dos lobos que caçam animais domésticos (Paquet e Carbyn, 2003). Isso é especialmente verdadeiro para grandes carnívoros, cuja conservação é regida por vários instrumentos jurídicos internacionais, além da legislação nacional e regional (Linnell *et al.*, 2017). As populações de lobos podem ser numericamente estáveis, mesmo se a mortalidade causada por humanos exceder 30% anualmente (Nowak e Myslajek, 2017). Porém, a caça furtiva é um problema generalizado em muitos países, a qual tem origens socioeconómicas muito diversas (Salvatori e Linnell, 2005) e um efeito profundamente negativo na organização socio-espacial das populações de lobos, assim como na morte de indivíduos reprodutores que muitas vezes leva à dissolução da alcateia (Nowak e Myslajek, 2017).

O aumento da abundância de presas selvagens é uma outra medida de conservação crucial, permitindo um maior suplemento de alimentos para este predador, reduzindo os

ataques de gado e aliviando os conflitos com os humanos (Cruz *et al.*, 2014). No entanto, a solução não deve ser focada apenas na reintrodução de presas selvagens, mas sim estabelecer uma nova cultura responsável de pastoreio de gado, incluindo maior investimento em cães de guarda (Torres e Fonseca, 2016). Investigações futuras devem concentrar-se nos mecanismos que regulam o tamanho da população, ocupação do território, interações com espécies de presas domésticas e selvagens, monitorização do estado de saúde e modelação ecológica para determinar tendências e riscos populacionais (Torres e Fonseca, 2016). Adicionalmente, as Áreas Protegidas através dos seus corpos técnicos e vigilantes da natureza, bem como os investigadores que se encontram a desenvolver trabalho no terreno, no âmbito de projetos científicos e de processos de Avaliação de Impacto Ambiental (AIA), são fundamentais para garantir que a monitorização da população de lobo continue a ser assegurada (Pimenta *et al.*, 2005).

Uma mitigação de conflitos eficaz implica facilitar a coexistência e reduzir as perdas económicas associadas à propriedade humana (Álvares, 2011). As autoridades responsáveis devem integrar programas de compensação e prevenção em processos participativos que considerem aspetos socioculturais a um nível nacional, regional e local. Agências de vida selvagem muitas vezes implementam programas de compensação para mitigar conflitos emergentes relacionados com perdas e danos causados pelo lobo e, portanto, aumentar a tolerância das partes interessadas que compartilham a paisagem com este predador (Bautista *et al.*, 2019). Contudo, as principais falhas nos programas de compensação são pagamentos insuficientes e/ou atrasados, procedimentos administrativos ineficientes, falha em avaliar os protocolos de verificação de danos, falha em condicionar a compensação à prevenção e ignorar a opinião das partes interessadas locais (Bautista *et al.*, 2019). Em Portugal, por exemplo, o valor anual da compensação por ataques de lobo à pecuária é de cerca de 1.000.000€ correspondendo a cerca de 2.400 ataques anuais atribuídos ao lobo (Torres *et al.*, 2015). Em suma, para a eficaz conservação do lobo deverá ser assegurada uma educação do público, incluindo grupos de interesse específicos (como agricultores, caçadores, gestores de áreas naturais, setor turístico); potenciar um consumo de presas selvagens através de medidas preventivas na pecuária e fomento de ungulados silvestres; promover regras claras e conhecimentos adequados sobre a compensação de ataques de lobo à pecuária; e assegurar a monitorização das suas populações (Trouwborst, 2010).

1.2. A importância do cortisol na fisiologia da conservação

1.2.1. Fisiologia da conservação

A mudança ambiental global está a causar níveis sem precedentes de perda de biodiversidade. Das espécies avaliadas, a União Internacional para a Conservação da Natureza classifica 22% dos mamíferos como extintos ou ameaçados de extinção (Cristine *et al.*, 2014; Dantzer *et al.*, 2014) e uma em cada cinco espécies de vertebrados está em risco de extinção, estando categorizadas como vulneráveis, em perigo ou criticamente em perigo (Kersey e Dehnhard, 2014).

Os fatores antropogénicos relacionados com este declínio, incluindo alteração de habitat, mudança climática e poluição, perturbam a otimização fisiológica dos organismos. A complexidade das ameaças e suas interações exigem ações decisivas e eficientes de conservação e gestão (Cristine *et al.*, 2014). Em resposta a ameaças à biodiversidade global, os profissionais de conservação exigem informações baseadas cientificamente sobre as causas e consequências do declínio das espécies, para que possam desenvolver e implementar estratégias eficazes para conter estas perdas (Cooke e O'Connor, 2010). A obtenção de informações biológicas básicas sobre essas espécies complementa e aumenta outros esforços de conservação, como avaliação de habitat e gestão de indivíduos em cativeiro. Neste sentido, compreender a atividade endócrina fornece uma visão incomparável da biologia animal e das espécies, porque as hormonas afetam todos os tecidos do corpo (Kersey e Dehnhard, 2014).

Embora a disciplina da fisiologia da conservação tenha sido formalmente definida apenas recentemente, o estudo da fisiologia acompanha a biologia da conservação há décadas. Como uma união sinérgica de duas disciplinas, a fisiologia da conservação tem o potencial de desenvolver diversas ferramentas e novos paradigmas teóricos para apoiar a conservação de espécies ameaçadas (Madliger *et al.*, 2016). Pode então definir-se esta subdisciplina como “o estudo das respostas fisiológicas dos organismos à alteração humana do ambiente que pode causar ou contribuir para o declínio da população” (Cooke e O'Connor, 2010). A fisiologia da conservação integra perspetivas fisiológicas numa ciência de conservação mais ampla. A fusão desses dois campos permite um melhor conhecimento dos mecanismos fisiológicos, que pode ser usado para gerar recomendações de políticas altamente eficazes e específicas para a conservação das espécies (Madliger *et al.*, 2016). A fisiologia da conservação propõe quantificar as respostas fisiológicas dos indivíduos às perturbações, determinar como essas respostas afetam o comportamento, a sobrevivência e a reprodução assim como

compreender se as respostas ao nível individual aumentam para impactar a viabilidade das populações (Dantzer *et al.*, 2014).

As questões de conservação incluem a avaliação da viabilidade de espécies e populações, as ameaças antropogénicas que afetam os organismos e a eficácia da intervenção. O objetivo desta ciência é promover soluções de conservação e, portanto, é importante avaliar se as abordagens fisiológicas contribuem para bons resultados de conservação e decisões eficazes de gestão (Madliger *et al.*, 2016). A fisiologia pode ser usada para identificar os efeitos sub-letais e letais que geram declínio na condição física. Assim, a fisiologia da conservação é uma ciência que vincula os efeitos das mudanças globais na abundância, dispersão e aptidão das espécies aos mecanismos fisiológicos que geram esses declínios e, em particular, a aplicação desse conhecimento aos esforços de conservação (Coristine *et al.*, 2014). Os seus potenciais benefícios estão bem estabelecidos e incluem maior especificidade de técnicas de gestão, determinação de relações causa-efeito, aumento da sensibilidade da saúde, monitorização de perturbações e maior capacidade de prever mudanças futuras (Madliger *et al.*, 2016). As medidas fisiológicas fornecem conhecimentos mecânicos adicionais que podem não ser acessíveis a partir de estudos puramente ecológicos, permitindo maior precisão na deteção, atribuição e previsão de espécies e respostas individuais a formas específicas de mudança ambiental (Coristine *et al.*, 2014). Também pode ajudar a determinar quais populações são mais suscetíveis a distúrbios, períodos-chave em que os distúrbios podem ser mais prejudiciais e se as técnicas de gestão estão a ter efeitos positivos (Madliger e Love, 2014). Um foco importante na fisiologia da conservação são as causas e consequências do *stress* fisiológico (Dantzer *et al.*, 2014).

1.2.2. Fisiologia do *stress*

Monitorizar o impacto da perturbação antropogénica em espécies ou populações de interesse é um importante objetivo de conservação. Como os efeitos da alteração ambiental geralmente se manifestam na fisiologia de um organismo antes que as mudanças possam ser detetadas ao nível da população, as medidas fisiológicas podem fornecer uma deteção mais precoce de distúrbios e maior capacidade preditiva do que os métodos demográficos tradicionais (Madliger e Love, 2014). A endocrinologia é uma ferramenta indispensável na pesquisa de espécies ameaçadas. O estudo da endocrinologia nestas espécies avança o conhecimento do mecanismo endócrino e contribui também para os esforços de conservação das espécies estudadas. Para este

fim, a endocrinologia tem sido tradicionalmente usada para entender os eixos endócrinos reprodutivos e adrenocorticais, quantificando os metabólitos esteroides excretados (Kersey e Dehnhard, 2014).

Ao longo da evolução, existem mecanismos múltiplos e sobrepostos para lidar com ameaças agudas e prolongadas (Herman *et al.*, 2016). Desafios ambientais ou distúrbios antropogénicos podem desencadear a ativação do eixo neuro endócrino dos vertebrados, resultando na libertação de hormonas do *stress*, os glicocorticoides (GCs) (Dantzer *et al.*, 2014). O *stress* é uma perturbação fisiológica causada por ameaças reais ou subjetivas, que perturbam o estado físico e/ou psicológico de um indivíduo e podem ser causadas por condições físicas, fisiológicas e psicossociais únicas ou combinadas (Webb *et al.*, 2010). A chamada "resposta ao *stress*" representa uma reação integrada aos fatores de *stress*, amplamente definidos como ameaças, reais ou aparentes, à homeostasia ou ao bem-estar (Herman *et al.*, 2016). 'Stress' é uma palavra ambígua, dado que pode ser usada para definir tanto a perturbação ambiental (fator de *stress*) e o conjunto de respostas fisiológicas à perturbação (*stress*), de modo que a definição se torne um tanto circular (fatores de *stress* causam *stress*). O *stress* fisiológico é frequentemente descrito como o grupo de respostas fisiológicas adaptativas a um estímulo extrínseco aversivo que ajuda a restaurar a homeostase interna após a exposição ao estímulo (Dantzer *et al.*, 2014).

O sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é rapidamente ativado por fatores de perturbação. A atividade do eixo HHA é comumente avaliada pela avaliação de GCs como o cortisol (Meyer e Novak, 2012). A sua ativação representa uma resposta hormonal primária ao desafio homeostático. Em geral, algum tipo de alteração no eixo HHA é gerado por todas as variedades de fatores de *stress* e é uma característica da reação fisiológica ao *stress*. Com a libertação de GCs, o eixo HHA mobiliza reservas de energia para garantir que o organismo tenha os recursos necessários para atender a uma ameaça física real (uma resposta 'reativa') ou para se preparar para uma ameaça prevista (uma resposta 'antecipatória') (Herman *et al.*, 2016). Os desafios ambientais que ativam o eixo HHA dos vertebrados podem ser fatores de *stress* agudos ou crónicos. Os fatores de *stress* agudos, como uma forte tempestade ou perseguição por um predador, podem elevar os níveis de GCs no sangue e causar uma série de mudanças fisiológicas e comportamentais que facilitam a superação do desafio ambiental. No entanto, fatores de *stress* crónicos podem levar a uma desregulação do HHA que é causado por exposição a mudanças ambientais imprevisíveis ou incontroláveis. Este aumento crónico de GCs pode levar à inibição da reprodução e diminuição da

sobrevivência (Dantzer *et al.*, 2014). A quantificação de GCs numa variedade de matrizes biológicas (sangue, saliva, urina, fezes) pode fornecer um índice composto aproximado dos níveis de cortisol ao longo do tempo. No entanto, nenhuma destas abordagens fornece um índice verdadeiro a longo prazo da atividade do eixo HHA, assim como a avaliação da capacidade de resposta desse sistema a fatores de perturbações crónicas (Meyer e Novak, 2012).

1.2.3. Cortisol no pelo

Os GCs, frequentemente chamados de hormonas do *stress*, representam alguns dos biomarcadores fisiológicos mais amplamente utilizados (Madliger e Love, 2014). O cortisol é responsável por uma ampla gama de funções, como a regulação do metabolismo, crescimento e desenvolvimento, bem como respostas ao *stress* que influenciam a fisiologia e endocrinologia dos sistemas reprodutivo e imunológico (Bechshøft *et al.*, 2012).

Historicamente, o sangue era o principal tipo de amostra usado para examinar os GCs em humanos e outras espécies (Koren *et al.*, 2019). Porém, a partir do final dos anos 80, estudos de campo começaram a usar fezes e urina para medir os níveis de GCs em animais selvagens. Entretanto, o pelo emergiu como um tipo de amostra adicional para quantificar esteroides endógenos em animais domésticos em meados da década de 1990 e foi aplicado pela primeira vez em espécies selvagens por Koren *et al.* (2002). Pelo, fezes e urina geralmente podem ser coletados de uma forma menos invasiva e com recurso a maiores tamanhos amostrais, comparativamente com o sangue (Koren *et al.*, 2019). Embora as concentrações hormonais no sangue mudem rapidamente ao longo de alguns minutos em resposta a condições externas ou internas de curto prazo, estes tipos de amostra menos invasivos geralmente refletem a atividade endócrina por períodos mais longos, incluindo horas a meses (Koren *et al.*, 2019). As matrizes mais usadas atualmente para avaliar o cortisol em animais são o sangue e a saliva, as quais produzem estimativas pontuais da atividade do HHA. Amostras urinárias e fecais produzem medições da excreção de cortisol e/ou metabólito que duram desde várias horas até a um dia inteiro em alguns casos (Meyer e Novak, 2012). No entanto, amostras de pelos têm a vantagem de expressar *stress* crónico, em vez de flutuações hormonais de curto prazo, causadas, por exemplo, por ritmos circadianos ou pelo *stress* da procura de alimento (Bechshøft *et al.*, 2012). O cortisol é incorporado no pelo à medida que cresce, o que significa que os valores do cortisol refletem o nível hormonal geral no

corpo dos mamíferos durante esse período de tempo específico (Bechshøft *et al.*, 2012). Em comparação com o sangue, estes outros tipos de amostra são, portanto, menos influenciados por fatores de *stress* de curto prazo (como captura e manuseamento) e são considerados indicadores mais significativos dos estados e processos fisiológicos de longo prazo (Koren *et al.*, 2019).

O pelo, que integra GCs ao longo de vários meses a anos, fornece assim uma abordagem valiosa para investigar respostas fisiológicas a processos naturais e potenciais fatores de *stress* de longo prazo (Bryan *et al.*, 2015). Os GCs são incorporados no eixo capilar durante a fase de crescimento do folículo capilar e, portanto, acredita-se que os valores de esteroides no pelo reflitam a atividade média do eixo HHA durante a respetiva fase de crescimento (Kersey e Dehnhard, 2014). O cabelo humano tem uma taxa de crescimento bastante previsível de aproximadamente 1 cm/mês. Portanto, o segmento de 1 cm mais proximal do couro cabeludo aproxima-se da produção de cortisol do mês passado, o segundo segmento de 1 cm mais proximal se aproxima da produção durante o mês anterior e assim por diante (Russell *et al.*, 2012). Pensa-se que os GCs (livres) não ligados sejam incorporados no crescimento do pelo através dos vasos sanguíneos que nutrem o folículo piloso e também podem vir da síntese local de GCs no folículo e/ou de secreções de glândulas ao redor do folículo piloso (Bryan *et al.*, 2015). No entanto, os níveis de cortisol no pelo podem não refletir exclusivamente a síntese e secreção adrenocortical (Kersey e Dehnhard, 2014), uma vez que o folículo em crescimento pode incorporar GCs provenientes de secreções glandulares (sebo) que rodeiam o pelo ou substâncias externas (saliva, urina ou fezes) (Koren *et al.*, 2019). Para além disto, ao contrário dos fluidos corporais que requerem condições especiais de armazenamento antes da análise, as amostras de pelo são facilmente transportadas e armazenadas em envelopes ou frascos em temperatura ambiente e os GCs nas amostras parecem permanecer estáveis durante meses a anos (Koren *et al.*, 2019).

1.3. O estudo de níveis de cortisol na conservação do lobo

O lobo é a espécie-modelo adequada para examinar os efeitos fisiológicos da perturbação e mortalidade legal e ilegal causada pelo homem, uma vez que foi extremamente perseguida e requer zonas de refúgio para reprodução. Este carnívoro é especialmente suscetível à rutura social devido à alta mortalidade porque a sua estrutura social complexa afeta muitos aspetos da sua dinâmica populacional (Bryan *et*

al., 2015). O estudo de Bryan *et al.* (2015) é o único que avalia hormonas esteroides em pelo de lobos e faz a comparação entre populações de lobos altamente caçados e populações com menor pressão de caça. Para isto foram comparados lobos da tundra-taiga do Canadá (n=103), sujeitos a alta pressão de caça, com os lobos da floresta boreal do Norte (n=45), onde a perseguição humana é substancialmente mais reduzida (Bryan *et al.*, 2015).. Os lobos tundra-taiga apresentaram níveis mais altos de cortisol, o que pode refletir instabilidade social. Outros estudos semelhantes, mostraram que os níveis de GCs em fezes, eram mais elevados em populações de lobos onde a perturbação humana era superior, nomeadamente causada pelo uso de motas de neve ou pela caça (Creel *et al.*, 2002; Molnar *et al.*, 2015).

O pelo foi recentemente reconhecido como um biomaterial que pode acumular e traduzir a variação de GCs por períodos temporais de semanas a meses (Kersey e Dehnhard, 2014) e está a emergir como uma ferramenta popular para examinar os níveis de hormonas de *stress* em mamíferos selvagens. Até há data, o método de avaliação de cortisol no pelo foi utilizado em vários estudos com várias espécies de canídeos, incluindo o coite (*Canis latrans*; Schell *et al.*, 2017) , cão doméstico (*Canis familiaris*; Veronesi *et al.*, 2015) e lobo (*Canis lupus*; Bryan *et al.*, 2015). Contudo, as decisões relacionadas com a variação do procedimento a ser utilizado em cada etapa da análise de hormonas capilares dependem de vários fatores como a biologia e a estrutura capilar de cada espécie (Koren *et al.*, 2019).

1.4. Objetivos

Devido à crescente pressão antrópica e mudanças climáticas sem precedentes, é necessário um aumento do conhecimento da fisiologia das espécies de modo a desenvolver e implementar medidas de gestão mais eficazes. O lobo, sendo um mamífero que esteve perto da extinção no passado, mas que se encontra a recuperar, é a espécie-alvo ideal para avaliar os efeitos que fatores intrínsecos e extrínsecos podem causar a nível fisiológico. Face a este contexto, esta dissertação tem como principais objetivos: 1) avaliar que fatores intrínsecos e extrínsecos estão relacionados com os níveis de cortisol no pelo, corrigindo para o enviesamento causado por variáveis ambientais, com recurso a amostras de várias populações europeias de lobo; e 2) comparar os níveis de cortisol de amostras históricas com amostras contemporâneas de lobos ibéricos. Com base nos resultados obtidos, são sugeridas medidas para assegurar a conservação deste predador tão emblemático.

2. Metodologia

2.1. Área de estudo e recolha de amostras

As amostras de pelo (n=456) foram recolhidas de 274 lobos capturados para fins científicos, encontrados mortos ou caçados legalmente em Portugal (n=42 amostras, 24 lobos) Espanha (n=316 amostras, 194 lobos), Itália (n=26 amostras, 14 lobos), Eslovénia (n=17 amostras, 11 lobos) e Suécia (n=55 amostras, 31 lobos) (Fig.3). As amostras de pelo foram recolhidas de quatro regiões corporais: lombar, dorsal cervical, tórax ventral e caudal. O pelo foi cortado, o mais perto da pele possível, com uma tesoura e armazenado em envelopes de papel à temperatura ambiente protegidos da luz solar direta. Dados sobre idade, género, data (mês e década) e causa de morte/captura, localização geográfica, peso e comprimento corporal foram obtidos para a maioria dos lobos. As amostras de lobos ibéricos foram agrupadas por décadas de acordo com a intensidade de perseguição humana: 1950-1969 (a espécie foi oficialmente perseguida), 1970-1989 (a espécie foi intensivamente caçada), 1990-2009 (espécie passou a ser protegida) e 2010-2020 (atualidade).



Figura 3 - Distribuição geográfica dos locais de recolha das amostras analisadas de pelo de lobo.

A armadilhagem para captura de lobos foi conduzida dentro das leis emitidas pelas autoridades de conservação da natureza em Portugal (338/2007/CAPT, 258/2008/CAPT, 286/2008/CAPT, 260/2009/CAPT, 332/2010/MANU, 333/2010/CAPT, 336/2010/MANU, 26/2012/MANU, e 72/2014/CAPT) e Espanha (E-0020/13-PNPE e 095/2013—Xunta de Galicia) e de acordo com a legislação nacional e internacional (Diretiva 2010/63/EU) em experimentação animal e padrões de vida selvagem internacionais.

A idade de cada animal foi estimada pelo desgaste dos dentes, e classificados como juvenis (apenas dentes de leite presentes), subadultos (só dentes definitivos, sem desgaste detetável) e adultos (desgaste suave a moderado) (Gipson *et al.*, 2000) e o sexo foi determinado através de inspeção da genitália externa. As causas de morte foram classificadas como: i) agudas, que pudessem ter a duração de minutos a horas (colisão automóvel e tiroteio); ii) subagudas, com duração de horas a dias (afogamento/asfixia, envenenamento, armadilhas e ferimentos resultantes de agressões intraespecíficas); e iii) crónicas, com duração de semanas a meses (doenças infecciosas – esgana canina, parvovirose canina, leptospirose; parasíticas – sarna sarcótica; e tumorais); ou ainda causas de morte desconhecidas. O comprimento total foi obtido utilizando fitas métricas (com precisão de 1mm), medindo desde o focinho até à ponta distal final da última vértebra caudal. O peso corporal foi medido com balanças com precisão de 100g.

2.2. Extração de cortisol do pelo

As etapas de pré-extração e extração basearam-se no procedimento descrito anteriormente por Bryan *et al.*, 2015 em pelos de lobos sendo que todas as análises foram realizadas nos laboratórios do Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO-InBIO).

Aproximadamente 40mg de pelo de guarda foram separados, limpos de contaminantes grosseiros e colocados em tubos falcon de 15ml (Fig.4). O comprimento médio de três pelos aparentemente intactos foram medidos e registados para cada amostra. As amostras foram depois lavadas duas vezes com 40µl de água destilada/mg de pelo e três vezes com o mesmo volume de isopropanol. Em cada etapa de lavagem, os tubos falcon com amostra e solução de lavagem foram vortexados, o sobrenadante foi descartado, e o pelo foi seco com papel limpo (Fig.5). Após a última lavagem, os pelos

foram deixados a secar, dentro dos tubos sem tampa, durante a noite à temperatura ambiente.



Figura 4 - Exemplar de amostra de pelo de lobo no processo de pré-extração

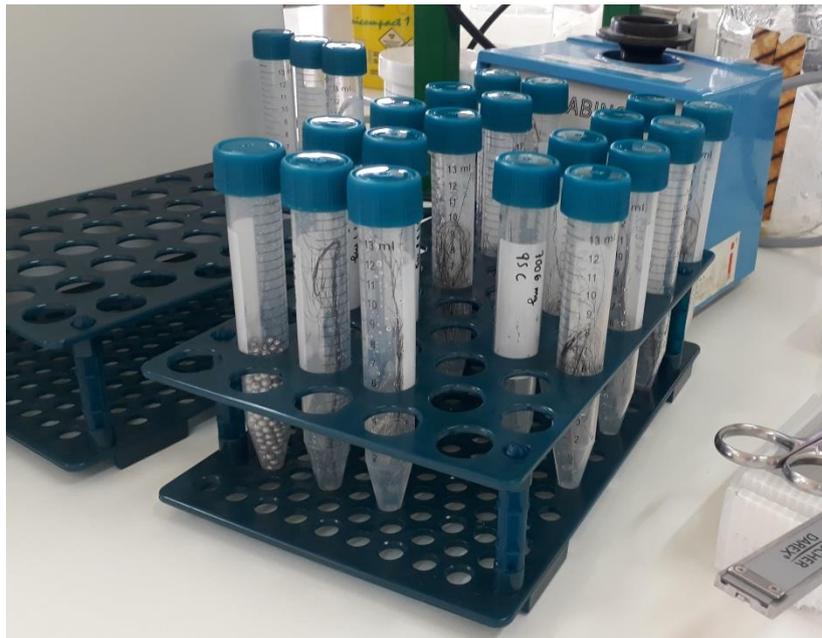


Figura 5 - Amostras de pelo de lobo durante o processo de lavagem

No dia seguinte, 30mg de pelo lavado foi cortado para tubos Eppendorf PP de 2 ml de plástico com tampa de rosca (Fig.6) e foram adicionadas cinco *beads* de aço de 4mm a cada tubo.



Figura 6 - Amostras de pelo de lobo a serem cortadas para tubos Eppendorf PP de 2ml

O pelo foi reduzido a um pó fino num homogenizador de amostra FastPrep (MP Biomedicals, EUA) 4 vezes durante 1min a 6.5m/s.. Posteriormente, 50µl de metanol/mg de pelo foram adicionados e sonicados (Izasa Scientific, Portugal) por 30min a 50Hz a 50°C. As amostras foram incubadas durante 18h a 50°C num agitador (Heidolph, Alemanha) a 160rpm e centrifugadas (Thermo Fisher Scientific, EUA) durante 15min a 14,000g a 20°C (Fig.7).

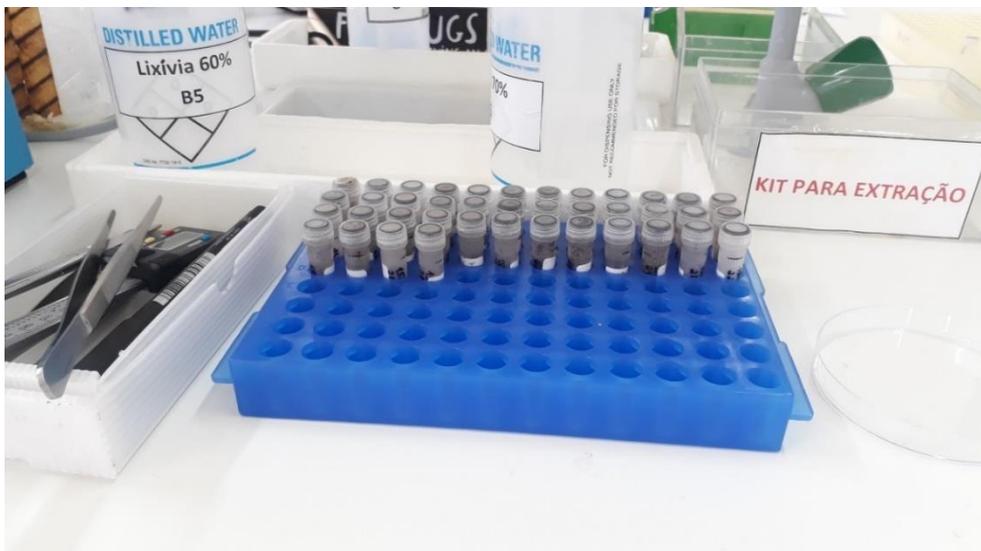


Figura 7 - Amostras de pelo de lobo após a saírem da centrifuga

Para a evaporação do metanol, 1000µl do sobrenadante foi recolhido para frascos de vidro (Fig.8) e secos a 38°C numa suave corrente de azoto (Fig.9). Devido a restrições no uso do laboratório durante a pandemia de SARS-Cov-2, alguns lotes foram evaporados durante a noite numa hotte química.

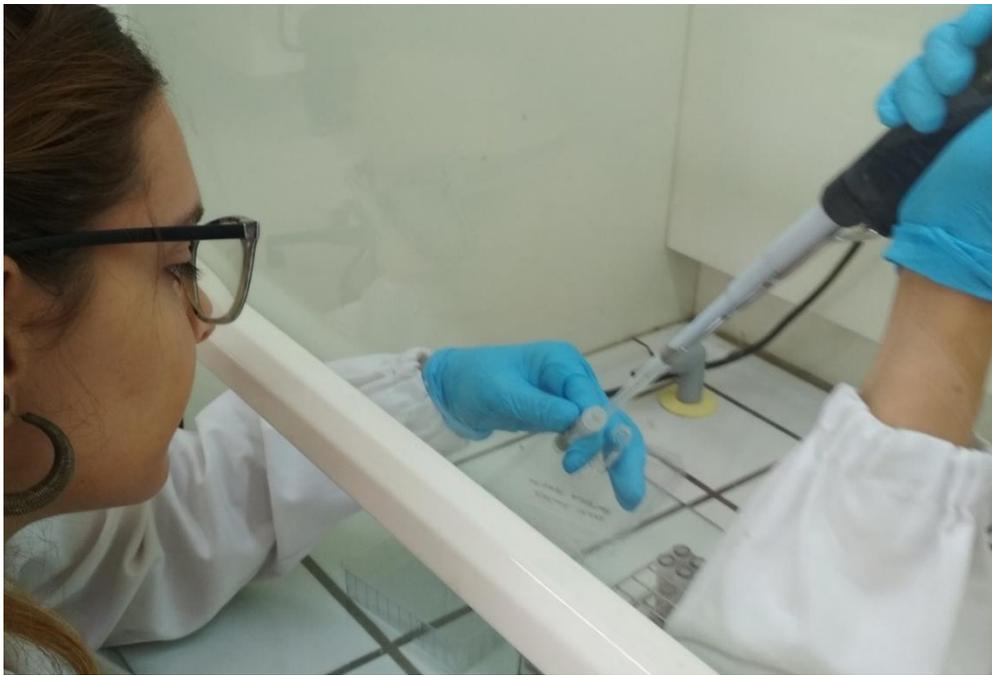


Figura 8 - Amostras de pelo de lobo a serem transferidas para os frascos de vidro



Figura 9 - Amostras de pelo de lobo durante o processo de evaporação de metanol

2.3. Extração de cortisol

Para quantificar o cortisol extraídos das amostras, foi utilizado um kit comercial ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Demeditec, Alemanha) do tipo competitivo desenhado para quantificar cortisol livre na saliva, seguindo as direções do fabricante. Brevemente, as amostras foram reconstituídas com 5% metanol em PBS, a 17 μ de solução/100 μ l de metanol extraído, e vortexadas cerca de 30s. Na placa de ELISA, foram colocados 50 μ l de soluções padrão com concentrações de cortisol definidas, 50 μ de controlos, 50 μ de amostra e 50 μ de conjugado, em cada poço. Os poços estavam revestidos com anticorpos policlonais de coelho anti cortisol. Depois de 10s de agitação as amostras ficaram a incubar 60min à temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, a placa foi lavada (BioTek Instruments, EUA), adicionou-se 200 μ l de substrato a cada poço e a placa ficou a incubar durante 30min. Finalmente, 50 μ l de solução stop foram adicionados (Fig.10) e a densidade ótica foi lida a 450nm de comprimento de onda, num leitor de microplacas (iMark Reader, Bio-Rad, Japão) num espaço de 15min de modo a quantificar a concentração de cortisol. As amostras foram testadas em duplicado para evitar possíveis erros e variações.

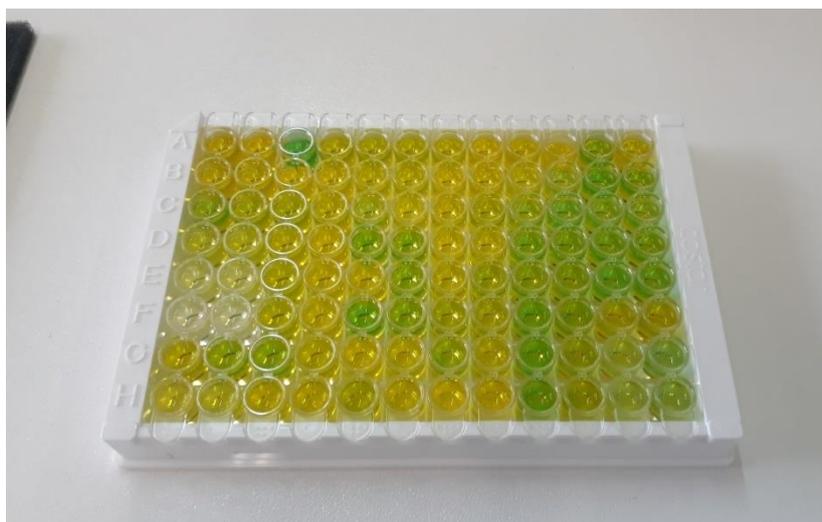


Figura 10 - Resultado de um dos testes ELISA para extrair o cortisol das amostras de pelo de lobo

A curva padrão logística de 4-parâmetros foi calculada a partir da transformação logarítmica da concentração de cortisol das soluções padrão e da sua absorvência a 450nm (Findlay e Dillard, 2007). As curvas-padrão foram calculadas recorrendo ao software GraphPad Prism (GraphPad Prism version 6.04 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, EUA), com um R² ajustado médio de 0.992 (0.968 – 0.999). A concentração de cortisol das amostras reconstituídas foi estimada a partir da curva padrão e convertida em concentração de cortisol por miligrama de pelo de amostra.

Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram estimados para seis ensaios ELISA de 37 a 40 amostras cada. Os controlos baixo e alto incluídos no kit foram usados para estimar o coeficiente de variação entre os ensaios.

2.4. Determinantes da concentração de cortisol no pelo

Os potenciais determinantes da concentração de cortisol no pelo (CCP) investigados incluem variáveis intrínsecas, ambientais e metodológicas.

As variáveis intrínsecas consistiam em: sexo, idade, condição corporal, tamanho corporal, causa de morte/captura e população. A idade e o sexo foram classificados como mencionadas posteriormente, assim como as causas de morte. A captura de animais vivos foi mantida como uma categoria em separado. Para avaliar a condição corporal foi utilizado o *scaled mass index* (SMI) (Peig e Green, 2009) que foi estimado através da transformação logarítmica dos dados de peso e comprimento corporal. A transformação logarítmica do comprimento corporal foi também usada como um indicador do tamanho da estrutura corporal. Por último, as amostras foram divididas nas seguintes populações de lobo: Ibérica, Alpina, Dinárica-Balcânica e Escandinava. As amostras da população Ibérica foram ainda divididas em: contemporâneas, que se subdividem em: Portugal, Cantábria, Astúrias, Galiza, Castela e Leão e Aragão; e históricas, subdivididas em: região Portuguesa a Norte e Sul do rio Tejo.

As variáveis metodológicas, relacionadas com o método laboratorial utilizado, foram: comprimento e peso do pelo, tempo de armazenamento, região corporal e o protocolo de evaporação de metanol. O comprimento e peso do pelo foram obtidos como mencionado anteriormente. O tempo de armazenamento foi calculado através da diferença entre os meses da data de morte e da data de extração de cortisol. Para as amostras em que apenas estava disponível o ano de morte, foi atribuída a data 30 de junho desse ano. A região corporal foi registada aquando da recolha das amostras já mencionado posteriormente. A variável categórica atribuída às amostras com os métodos de evaporação por corrente de azoto vs evaporação na hotte foi usada para controlar alguma potencial confusão originada por esta mudança inesperada no protocolo, devido à pandemia provocada pelo SARS-Cov-2.

Relativamente às variáveis ambientais, diferentes fatores de *stress* foram selecionados de acordo com os componentes da configuração do habitat que poderiam atuar como um impacto potencial na fisiologia do lobo (Wingfield *et al.*, 2011). As amostras com

coordenadas GPS e dados geográficos detalhados permitiram efetuar uma análise espacial de acordo com a biologia do lobo e o alcance da sua dispersão, utilizando a ferramenta *Zonal Statistics* (estatística zonal de soma) disponível no software QGIS com um *buffer* de 500km². Este *buffer* foi selecionado de acordo com a literatura estudada que refere que na Península Ibérica cerca de 80 lobos seguidos por telemetria utilizaram uma área média superior a 400km² (Silva *et al.*, 2018). As variáveis extrínsecas incluíram: i) densidade de alcateias (Pimenta *et al.*, 2005), como indicador do *stress* intraespecífico; ii) densidade de gado (Instituto Nacional de Estadística, 2009; Instituto Nacional de Estadística, 2009) e diversidade de presas selvagens (Linnell *et al.*, 2020), como indicador da disponibilidade de alimento, quer doméstico ou selvagem; iii) dimensão de explorações pecuárias (Instituto Nacional de Estadística, 2009; Instituto Nacional de Estadística, 2009), como indicador do grau de perseguição humana; iv) rugosidade do terreno (Copernicus Land Monitoring Service, 2020), como indicador do grau de refúgio que o terreno disponibiliza ao lobo; e v) os componentes do Índice de Pegada Humana (*Human Footprint Index*, HFI) (Venter *et al.*, 2016), como indicador de perturbação antropogénica. Os componentes do HFI consistiram em densidade de: estradas, caminhos de ferro, população, terreno de pastagem, águas navegáveis, luzes noturnas, construções e terrenos de cultivo (Tabela 1). As variáveis contínuas foram estandardizadas aos seus *z-scores* e as variáveis discretas foram convertidas em fatores.

Tabela 1 - Resumo das variáveis intrínsecas, metodológicas e ambientais analisadas para avaliar os níveis de cortisol em pelo de lobo. ¹Norte do Tejo; ²Sul do Tejo; ³Todas as variáveis ambientais foram medidas num Buffer de 500km² dos pontos das amostras

Nome	Abreviatura no modelo	Unidade/Fatores	Descrição	Referência Bibliográfica
Variável dependente				
Concentração de cortisol no pelo	hcc	pg/mg	Concentração de cortisol no pelo medida através do protocolo experimental	(Bryan <i>et al.</i> , 2015)
Variáveis intrínsecas				
Sexo	gender	Fêmea Macho Desconhecido	Sexo do indivíduo determinado através de inspeção da genitália externa	
Idade	age	Juvenil Subadulto Adulto Desconhecido	Idade do indivíduo estimada a partir do exame da dentição	(Gipson <i>et al.</i> , 2000)
Região corporal	body	Lombar Dorsal cervical Cauda Tórax ventral	Região corporal de onde foi recolhido o pelo	

Scaled mass index	smi		Calculado através do peso e comprimento corporal através da fórmula: $\hat{M}_i = M_i \left[\frac{L_0}{L_i} \right]^{b_{SMA}}$	(Peig e Green, 2009)
Tamanho corporal	body length	mm	Comprimento medido com fita métrica com precisão de 1mm	
Causa de morte/captura	death	Vivo Aguda Subaguda Crónica Desconhecido	Capturas/causas de morte classificadas de acordo com a duração do fator de <i>stress</i>	
População	population	Ibérica Alpina Dinárca-Balcãs Escandinava	Populações de lobos dos diferentes locais de recolha na Europa	
Subpopulação	sub-population	Portugal Cantábria Astúrias Galiza Castela e Leão Aragão Histórias NT ¹ Históricas ST ²	Subpopulações ibéricas divididas de acordo com os locais de recolha e data de recolha. ¹ NT- Norte do Tejo ² ST – Sul do Tejo	
Mês	month	Jan, Fev, Mar, Abr, Mai, Jun, Jul, Ago, Set, Out, Nov, Dez Desconhecido	Meses do ano de acordo com a data de recolha do pelo	
Década	decade	1950-1969 1970-1989 1990-2009 2010-2020	Décadas da data de recolha do pelo agrupadas de acordo com a intensidade de perseguição	
Variáveis metodológicas				
Comprimento do pelo	hair length	mm	Comprimento médio de 3 pelos medido com uma craveira com precisão de 0,01mm	VWR™
Peso do pelo	weight hair	mg	Peso do pelo utilizado para extração pesado numa balança com precisão de 0,001g	OHAUS Explorer
Tempo de armazenamento	storage	meses	Tempo calculado através da diferença entre os meses da data de morte e da data de extração de cortisol	
Protocolo de evaporação de cortisol	protocol	Evaporação por azoto Evaporação na hotte	Controlo de mudança no protocolo causada pela pandemia de SARS-Cov-2	
Variáveis ambientais³				
Densidade de alcateias	alc		<i>Heatmap</i> dos pontos das alcateias da Península Ibérica	(Bencatel e Sabino-marques, 2019)
Densidade de gado	cn		Cabeças normais calculadas através da fórmula: bov/equ=1CN; ovi/cap=0,15CN	(Instituto Nacional de Estadística, 2009; Instituto Nacional de Estadística, 2009)

Diversidade de presas selvagens	ung		Número de espécies de presas selvagens do lobo: javali, veado, corço, gamo, cabra montês e camurça	(Linnell <i>et al.</i> , 2020)
Dimensão média dos rebanhos	cn_expl		Cabeças normais por exploração pecuária	(Instituto Nacional de Estatística, 2009; Instituto Nacional de Estatística, 2009)
Rugosidade do terreno	ruged		Rugosidade do terreno	(Copernicus Land Monitoring Service, 2020)
Estradas	roads	0 – 8 Impactos diretos 0 – 4 Impactos indiretos	500m de cada lado das estradas com uma pontuação de pressão direta de 8 A partir de 500m fora da estrada, pontuação de pressão de 4 exponencialmente decaindo até 15 km.	(Venter <i>et al.</i> , 2016)
Caminhos de ferro	rails	0 – 8	500m de cada lado das ferrovias com uma pontuação de pressão direta de 8	(Venter <i>et al.</i> , 2016)
Luzes noturnas	lights	0 – 10 Contínuo	Caixas de iguais quantis	(Venter <i>et al.</i> , 2016)
Construções	built	0 – 10	Todas as áreas mapeadas como construção receberam pontuação de 10	(Venter <i>et al.</i> , 2016)
Densidade Populacional	popdens	0 – 10 Contínuo	Pontuação de pressão = $3,333 \times \log(\text{densidade populacional} + 1)$	(Venter <i>et al.</i> , 2016)
Terrenos de cultivo	crop	0 – 7	Todas as áreas mapeadas como culturas receberam pontuação de 7	(Venter <i>et al.</i> , 2016)
Terrenos de pastagem	pastures	0 – 4	Todas as áreas mapeadas como pastagens receberam pontuação 4.	(Venter <i>et al.</i> , 2016)
Águas navegáveis	water	0 – 4	Pontuação de pressão de 4 decaindo exponencialmente até 15 km	(Venter <i>et al.</i> , 2016)

2.5. Análise estatística

As medições de cortisol em pelo de lobo mostraram não mostraram uma distribuição normal (Fig.11).

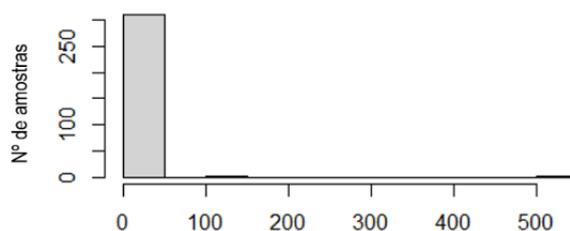


Figura 11 - Distribuição das medições de cortisol em pelo de lobo (CCP)

A análise dos dados foi realizada em dois conjuntos de dados diferentes, sendo que o primeiro analisou as amostras dos vários países europeus, mas apenas foram consideradas as variáveis intrínsecas e metodológicas (Tabela 2). O segundo conjunto, focou-se apenas nas amostras ibéricas e analisou tanto as variáveis intrínsecas e metodológicas como as variáveis ambientais (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 2 - Resumo das amostras de pelo de lobo por idade, sexo, regiões corporais e captura/causa de morte utilizadas no conjunto de amostras europeias de modo a avaliar os fatores de stress intrínsecos e metodológicos

Populações de lobos	Idade (n lobos)				Sexo (n lobos)			Região corporal (n amostras)				Captura/causa de morte (n lobos)				
	Juvenis	Subadultos	Adultos	Desconhecido	Fêmeas	Machos	Desconhecido	Lombar	Cervical dorsal	Cauda	Tórax ventral	Vivos		Morte		
												Armadilhas	Aguda	Subaguda	Crónica	Desconhecida
Ibérica	7	35	53	6	45	55	1	95	31	34	30	10	64	6	9	12
Alpina	6	4	4	0	7	7	0	13	12	0	0	0	11	2	1	0
Dinárca-Balcã	1	0	2	2	1	2	2	4	5	0	0	0	3	0	0	2
Escandinava	4	3	24	0	10	20	1	27	25	0	0	0	27	2	2	0
Total	18	42	83	8	63	84	4	139	74	34	30	10	105	10	12	14

Tabela 3 - Resumo das amostras de pelo de lobo por idade, sexo, regiões corporais e captura/causa de morte utilizadas no conjunto de amostras ibéricas de modo a avaliar os fatores de stress intrínsecos e metodológicos.

Sub-populações de lobos	Idade (n lobos)				Sexo (n lobos)			Captura/causa de morte (n lobos)			
	Juvenis	Subadultos	Adultos	Desconhecido	Fêmeas	Machos	Desconhecido	Vivos		Morte	
								Armadilha	Aguda	Subaguda	Desconhecida
Portugal	3	1	6	1	5	5	1	2	3	5	1
Cantábria	3	18	39	5	33	32	0	0	63	0	2
Astúrias	14	27	38	3	39	41	2	7	49	1	25
Galiza	4	8	12	7	11	21	1	0	21	2	8
Castela e Leão	0	0	1	4	1	2	1	0	0	0	4
Aragão	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Históricas NT	9	2	7	36	26	14	14	0	2	1	21
Históricas ST	1	0	2	6	3	2	4	0	2	0	7
Total	34	56	105	63	118	118	23	9	140	9	69

Tabela 4 - Resumo das amostras de pelo de lobo por idade, sexo, regiões corporais e captura/causa de morte utilizadas no conjunto de amostras Ibéricas de modo a avaliar os fatores de stress intrínsecos e metodológicos e ambientais

Sub-populações de lobos	Idade (n lobos)				Sexo (n lobos)			Captura/causa de morte (n lobos)			
	Juvenis	Subadultos	Adultos	Desconhecido	Fêmeas	Machos	Desconhecido	Vivos		Morte	
								Armadilha	Aguda	Subaguda	Desconhecida
Portugal	3	1	6	1	5	5	1	2	3	5	1
Cantábria	3	18	39	5	33	32	0	0	63	0	2
Astúrias	14	27	38	3	39	41	2	7	49	1	25
Galiza	4	8	12	7	11	21	1	0	21	2	8
Castela e Leão	0	0	1	4	1	2	1	0	0	0	4
Aragão	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
Total	24	54	96	21	89	102	5	9	136	8	41

2.5.1. Análise das amostras de lobo da Europa

Em primeiro lugar, os efeitos da região corporal foram apurados através de um modelo linear misto (*linear mixed model* (LMM)) com a CCP como variável dependente, a região corporal como variável categórica independente e o lobo individual como efeito aleatório. A região lombar foi definida como referência. Isto previne que os dados do mesmo lobo sejam consideradas como independentes, e permite que a variação das variáveis independentes que diferem entre lobos seja totalmente utilizada na análise (Pearce-Higgins e Yalden, 2004).

Em segundo lugar, os efeitos das variáveis intrínsecas e metodológicas na CCP da região lombar foi apurada por um LMM com a idade, sexo, SMI, tamanho corporal, causa de morte/captura, população de lobos, comprimento e peso do pelo, tempo de armazenamento e método da evaporação de metanol como variáveis independentes de fatores fixos. O mês de recolha da amostra foi incluído como fator aleatório. O objetivo foi identificar que variáveis metodológicas influenciam a CCP e controlar para fatores de confusão. Isto foi atingido ao realizar sub-sets dos dados e verificar se os fatores de confusão eram removidos. As classes de referência foram definidas como: fêmea,

adulto, morte por atropelamento/tiro, população ibérica, e evaporação de metanol por corrente de azoto. O mês de janeiro foi o mês de referência.

2.5.2. Análise das amostras de lobo da Península Ibérica

Primeiramente, efetuou-se uma análise ao modelo final obtido anteriormente, através de um LMM para avaliar os efeitos das variáveis intrínsecas e metodológicas na população ibérica de lobos, apenas na região lombar (já controlados para os fatores de confusão: parâmetro morte e peso do pelo). Para além do fator mês, foi adicionado o fator década como efeito aleatório de modo a efetuar uma avaliação temporal. Removeu-se também o SMI e o comprimento corporal do modelo por haver poucas amostras com estes dados.

De seguida, efetuou-se um LMM com o modelo final (controlados para os fatores de confusão) juntamente com as variáveis extrínsecas independentes: a densidade de alcateias, animais domésticos e diversidade de animais selvagens, rugosidade do terreno, tamanho médio dos rebanhos e os componentes do HFI. O fator mês foi definido como aleatório. Este modelo apenas foi efetuado para as amostras contemporâneas (de 2000 a 2020) pois os dados relativos às amostras ambientais apenas estavam disponíveis para este período de tempo.

Os modelos lineares mistos foram ajustados usando a *package* "lme4" (Bates *et al.*, 2007) no R 3.6.1. (R Core Team, 2019). Partindo de um modelo completo, foi realizada uma eliminação *backwards stepwise* das variáveis independentes metodológicas, baseada no seu valor p. Os valores p foram calculados pelo método de Satterthwaite's graus de confiança usando a *package* "lmerTest" in R 3.6.1 (R Core Team, 2019).

Os modelos foram comparados através de uma estrutura de informação teórica através do Critério de Informação de Akaike (*Akaike's Information Criterion (AIC)*) (Burnham and Anderson, 2002). As correlações entre os efeitos fixos do modelo foram estimadas com um limite de aceitação de 0.650. O R^2 condicional foi estimado pelo método de (Nakagawa e Schielzeth, 2013) implementado na *package* "MuMIn" (Barton e Barton, 2015). A CCP prevista para o modelo final foi usada para verificar os efeitos das variáveis independentes intrínsecas e extrínsecas. Os gráficos foram produzidos usando a *package* "ggplot2" (Wickham, 2016) no R 3.6.1 (R Core Team, 2019).

3. Resultados

3.1. Níveis de cortisol nas populações Europeias de lobo

A CCP média foi de 16.01 ± 44.86 pg/mg de pelo, variando de 1.58-526.86 pg/mg. O coeficiente de variação intra-ensaio variou de 6,50-9.97% (média 7.66%), enquanto o coeficiente de variação inter-ensaio foi de 11.54%-9.08% (média 10.31%).

O modelo LMM mostrou uma grande diferença na CCP de acordo com a região corporal de onde o pelo foi recolhido (Fig. 12). A região caudal ($p=0.034$) e do tórax ventral ($p=0.023$) tinham menos cortisol que a região lombar, enquanto na região dorsal cervical não se registaram diferenças (Tabela 5). Portanto, todas as análises subseqüentes foram realizadas apenas para as amostras da região lombar.

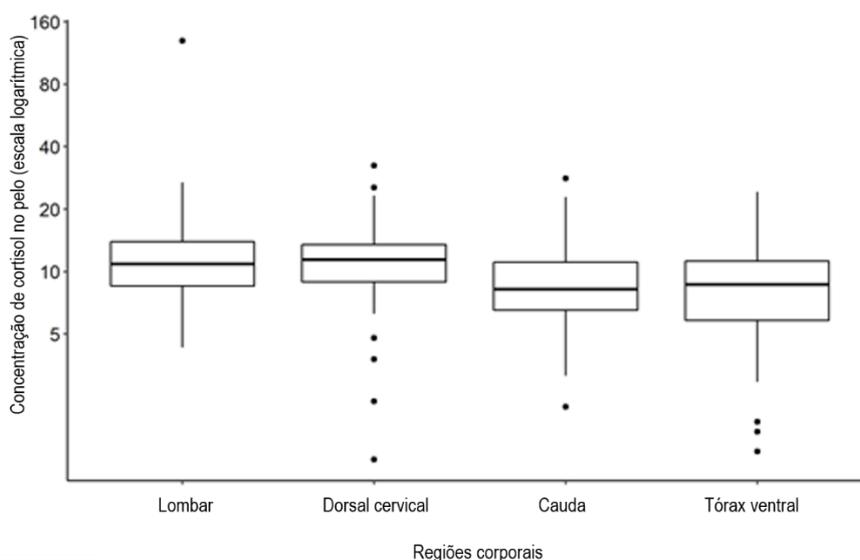


Figura 12 - Concentração de cortisol no pelo de lobo, por região corporal.

Tabela 5 - Resultados do modelo linear misto da concentração de cortisol no pelo de lobo, por região corporal. O lobo como indivíduo está incluído como efeito aleatório. Os valores com diferenças significativas encontram-se assinalados a negrito.

Variável	β	Erro padrão (β)	df	Valor-t	Valor-p
Efeitos fixos					
Intercept	13.314	1.159	182.457	11.486	<0.001
Região corporal					
Cervical dorsal	-1.546	1.448	142.905	-1.067	0.288
Cauda	-4.141	1.934	164.645	-2.141	0.034
Tórax ventral	-4.491	1.959	165.008	-2.293	0.023

Efeitos Aleatórios

Variância	20.03
Desvio-padrão	4.475
N lobos	70
N amostras	198

O modelo inicial aplicado apenas às amostras da região lombar demonstrou diferenças significativas com a causa de morte, sendo que lobos com doenças crônicas anteriores apresentaram maior concentração de cortisol ($p < 0.001$) (Fig.13). Devido a isto, as análises posteriores foram realizadas sem esta causa de morte, o que mostrou remover o fator de confusão.

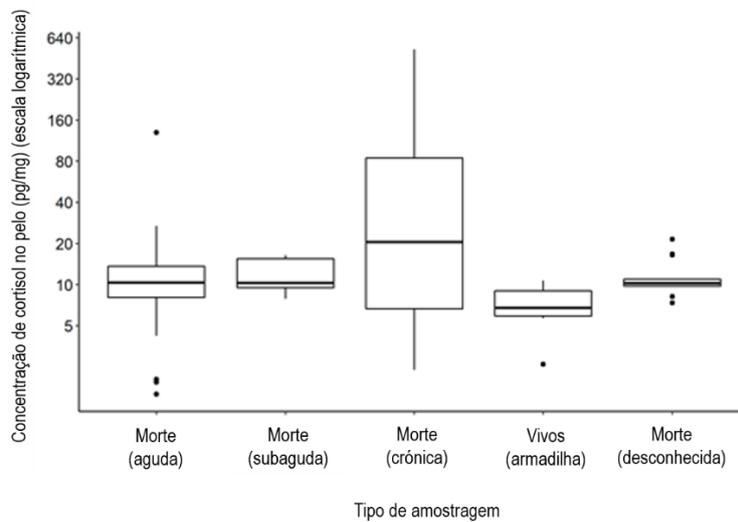


Figura 13 - Concentração de cortisol no pelo de lobo, divididas por classes de causa de morte ou captura.

Após controlar para o fator de confusão causado pela cause de morte, o peso do pelo usado na extração de cortisol mostrou uma tendência negativa com a CCP (Fig.14). Considerando amostras em que apenas foi utilizado um peso superior a 20mg, o fator de confusão foi removido. Consequentemente, nos modelos posteriores apenas foram consideradas amostras em que o peso do pelo utilizado para a extração de cortisol foi superior a 20mg.

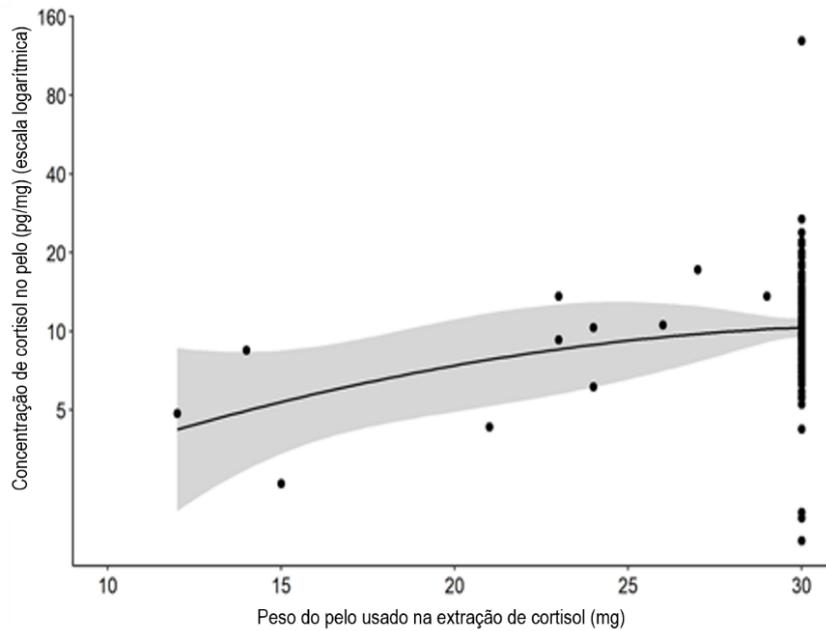


Figura 14 - Concentração de cortisol no pelo de lobo, por peso do pelo usado na extração de cortisol. A faixa cinzenta corresponde ao desvio-padrão da relação quadrática entre o peso do pelo e a CCP

Nos modelos conseguintes, o protocolo de extração de metanol e o tempo de armazenamento (Fig.15) não tiveram diferenças significativas na CCP e foram excluídos do modelo. Portanto, no modelo final ($\Delta AIC=5.60$) a única variável de confusão restante foi o comprimento do pelo usado para a extração de cortisol. Apesar desta apresentar um efeito não significativo na CCP ($p=0.348$), a sua exclusão resultaria num modelo menos apropriado.

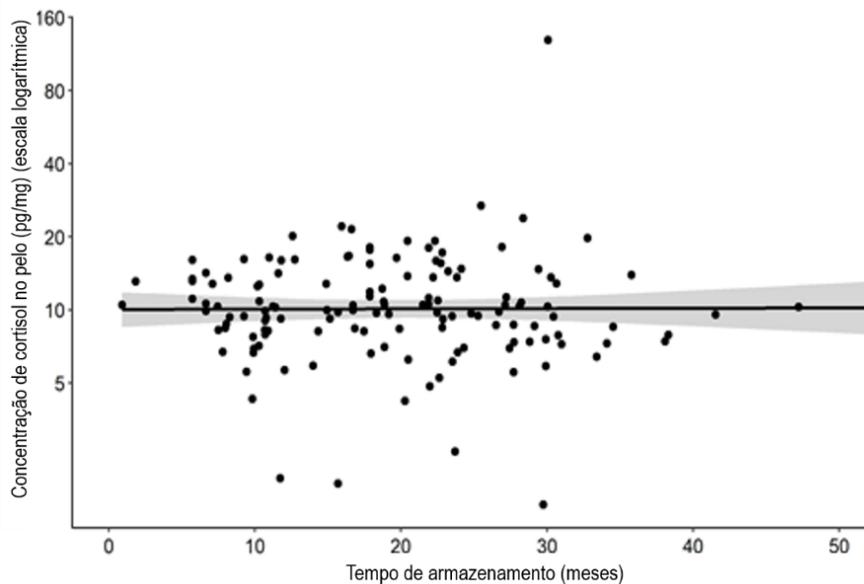


Figura 15 - Concentração de cortisol no pelo de lobo, por tempo de armazenamento

Depois dos fatores de confusão das variáveis metodológicas estarem controlados, os níveis de cortisol não apresentaram diferenças significativas na idade, género, comprimento do corpo, populações, SMI, comprimento do pelo ou mês de amostragem (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo dos resultados do modelo linear misto final dos fatores determinantes intrínsecos e metodológicos da concentração de cortisol no pelo de lobo para as populações europeias. Os valores com diferenças significativas (<0,05) encontram-se assinalados a negrito e os valores próximos de 0,05 encontram-se a sublinado.

Variáveis	β	Erro Padrão (β)	df	Valor-t	Valor-p
Efeitos Fixos					
Intercept	15.260	2.453	68.686	6.221	<0.001
Sexo					
Machos	-1.707	2.408	109.069	-0.709	0.480
Desconhecido	-1.264	12.591	109.578	0.100	0.920
Idade					
Subadultos	-3.834	2.617	106.163	-1.465	0.146
Juvenis	-4.261	4.962	109.612	-0.859	0.392
Desconhecidos	-3.415	7.150	109.650	-0.478	0.634
Comprimento corporal	-0.211	0.160	109.203	-1.317	0.191
Scaled Mass Index	-0.113	0.150	109.864	-0.752	0.454
População					
Alpina	0.952	4.483	14.206	0.212	0.835
Dinárica-Balcã	1.773	4.891	106.963	0.362	0.718
Escandinávia	0.014	3.476	72.570	0.004	0.997
Comprimento do pelo	1.375	1.458	109.787	0.943	0.348
Efeitos Aleatórios					
Mês					
Variância			4.041		
Desvio-padrão			2.01		
N amostras			122		
N meses			12		

Os valores de CCP preditos pelo modelo nos lobos fêmea da população ibérica revelam valores mais elevados em março, seguidos de uma diminuição até maio, e um novo aumento até outubro (Fig.16).

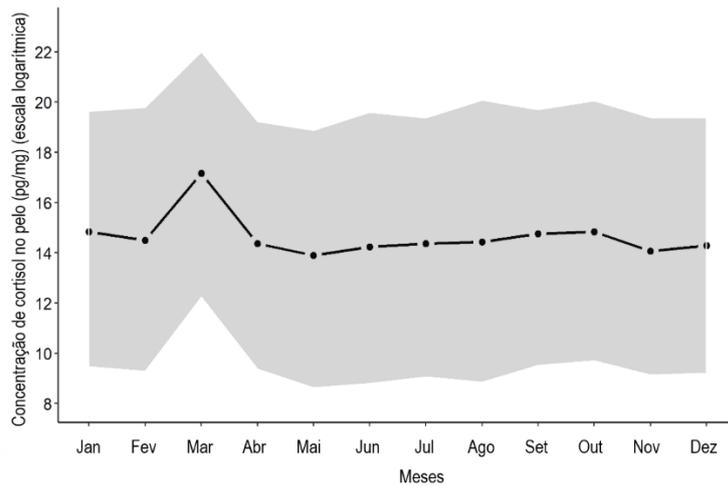


Figura 16 - Variação mensal da concentração de cortisol no pelo de lobos fêmea da população Ibérica preditos pelo modelo linear misto. Em cinzento encontra-se o intervalo de confiança a 95% dos efeitos fixos e aleatórios

As populações Alpinas e Dináricas-Balcãs apresentaram valores ligeiramente mais elevados não significativos de CCP quando compradas com as populações Ibéricas e Escandinavas (Fig.17).

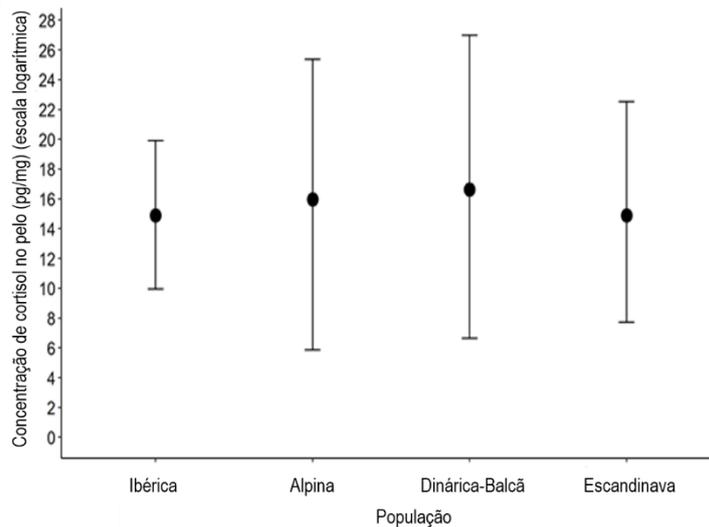


Figura 17 - Concentração de cortisol no pelo de lobo prevista pelo modelo linear misto, em cada uma das populações europeias e utilizando lobos fêmea em janeiro. O intervalo de confiança a 95% para os efeitos fixos e aleatórios encontra-se representado pelas barras verticais

3.2. Níveis de cortisol nas sub-populações Ibéricas de lobo

O primeiro modelo realizado para avaliar os efeitos das variáveis intrínsecas e ambientais a uma escala temporal nas amostras ibéricas, revelou que as subpopulações

contemporâneas da Galiza ($p=0.2347$) e históricas, quer a Norte ($p=0.1152$) quer a Sul do Tejo ($p=0.2744$) apresentaram níveis mais baixos de CCP em comparação com as restantes populações (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo dos resultados do modelo linear misto final dos fatores determinantes intrínsecos e metodológicos na concentração de cortisol no pelo de lobo para as subpopulações Ibéricas. Os valores com diferenças significativas encontram-se assinalados a negrito e os valores próximos de 0,05 encontram-se a sublinhado.

Variáveis	β	Erro Padrão (β)	df	Valor-t	Valor-p
Efeitos Fixos					
Intercept	10.273	2.860	222.974	3.592	<0.001
Sexo					
Machos	-1.279	1.174	236.877	-1.089	0.2771
Desconhecido	-0.973	2.338	237.999	-0.416	0.67
Idade					
Subadultos	-0.734	1.442	237.468	-0.509	0.6112
Juvenis	-0.106	1.806	234.842	-0.058	0.9534
Desconhecidos	-1.310	1.863	236.089	-0.703	0.4827
Subpopulação					
Cantábria	2.650	2.953	232.157	0.897	0.3705
Astúrias	-2.486	2.992	237.314	-0.831	0.4068
Históricas NT	-5.128	3.232	119.960	-1.587	0.1152
Históricas ST	-4.494	4.099	180.377	-1.096	0.2744
Galiza	-3.848	3.248	233.978	-1.184	0.2376
Castela e Leão	-2.701	4.762	236.602	-0.567	0.5711
Aragão	-2.572	9.147	237.229	-0.281	0.7788
Comprimento do pelo	-0.161	0.704	235.724	-0.228	0.8199
Efeitos Aleatórios					
Mês					
Variância			5.40e-01		
Desvio-padrão			0.734		
N amostras			252		
N meses			13		
Década					
Variância			4.393-07		
Desvio padrão			8.531		
N amostras			252		
N décadas			4		

O modelo focado na avaliação das variáveis intrínsecas, metodológicas e ambientais demonstrou uma tendência negativa dos níveis de CCP com o comprimento corporal do

individuo amostrado ($p=0.103$) (Fig.18) (Tabela 9). Os lobos subadultos apresentaram menores valores de CCP em relação aos adultos ($p=0.175$) (Fig.19). Relativamente a variáveis ambientais, a densidade de estradas revelou uma tendência negativa (Fig.20) ($p=0.054$), enquanto a densidade de alcateias revelou uma tendência positiva ($p=0.591$), apesar de não ser significativa (Fig.21).

Tabela 8 - Resumo dos resultados do modelo linear misto final dos fatores determinantes ambientais na concentração de cortisol no pelo de lobo para as subpopulações Ibéricas. Os valores com diferenças significativas encontram-se assinalados a negrito e os valores próximos de 0,05 encontram-se a sublinado.

Variável	β	Erro padrão (β)	df	Valor-t	Valor-p
Efeitos fixos					
Intercept	16.086	2.918	46.985	5.513	1.46e-06
Idade					
Subadulto	-5.081	3.710	67.520	-1.370	0.175
Juvenil	-7.888	9.194	68.942	-0.858	0.394
Desconhecido	-2.028	8.678	68.786	-0.234	0.816
Comprimento corporal	-0.3627	0.229	68.599	-1.651	0.103
SMI	-0.143	0.226	68.963	-0.634	0.528
Comprimento do pelo	1.841	2.511	68.375	0.733	0.466
Densidade de estradas	-4.374	2.233	68.998	-1.959	<u>0.054</u>
Densidade de alcateias	1.064	1.970	68.770	0.540	0.591
Efeitos Aleatórios					
Mês					
Variância			1.369		
Desvio-padrão			1.17		
N meses			12		
N amostras			78		

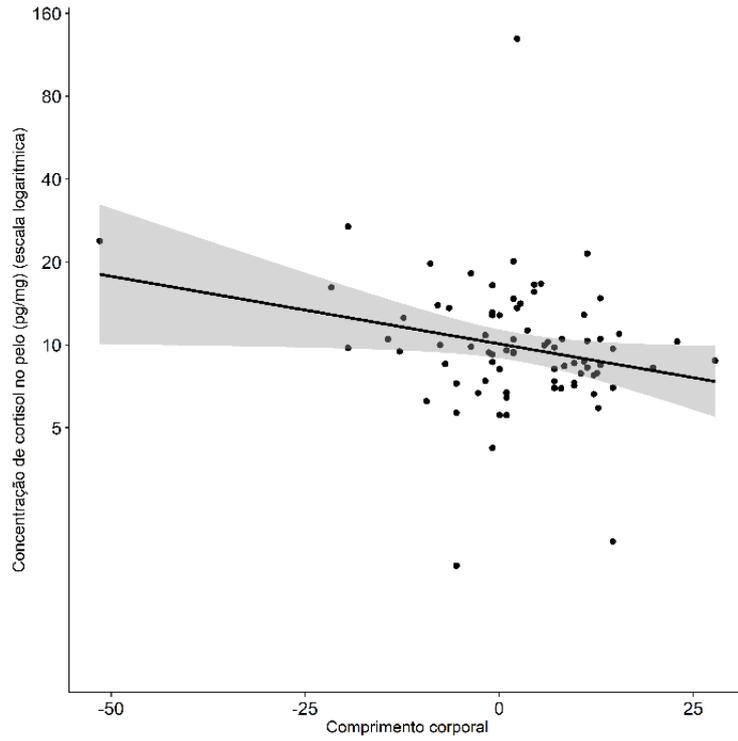


Figura 18 – Concentração de cortisol no pelo de lobos Ibéricos, por comprimento corporal do indivíduo amostrado

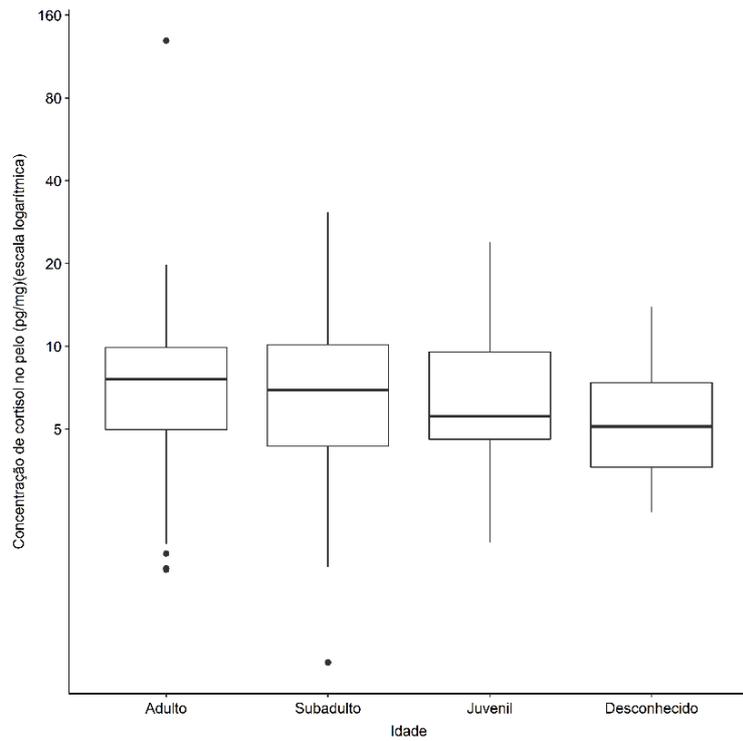


Figure 19 - Concentração de cortisol no pelo de lobos Ibérico, por idade do indivíduo amostrado

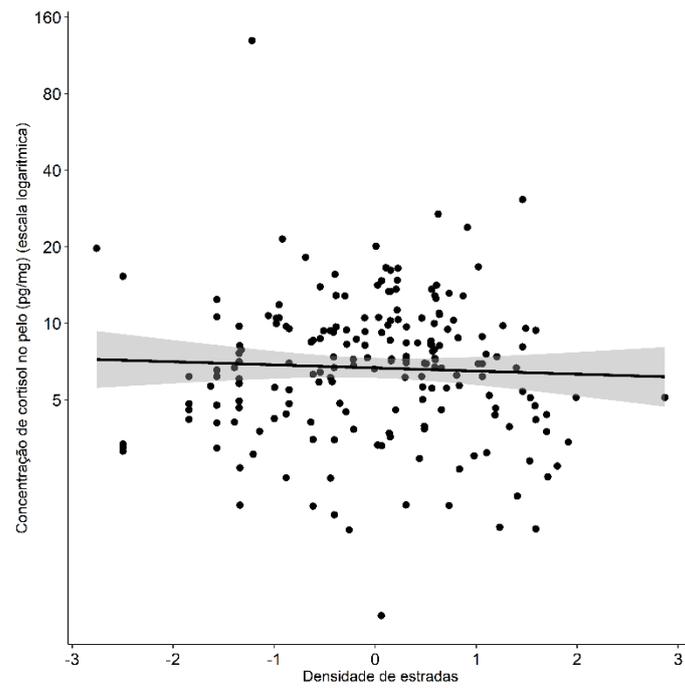


Figure 20 – Concentração de cortisol no pelo de lobos Ibéricos, por densidade de estradas

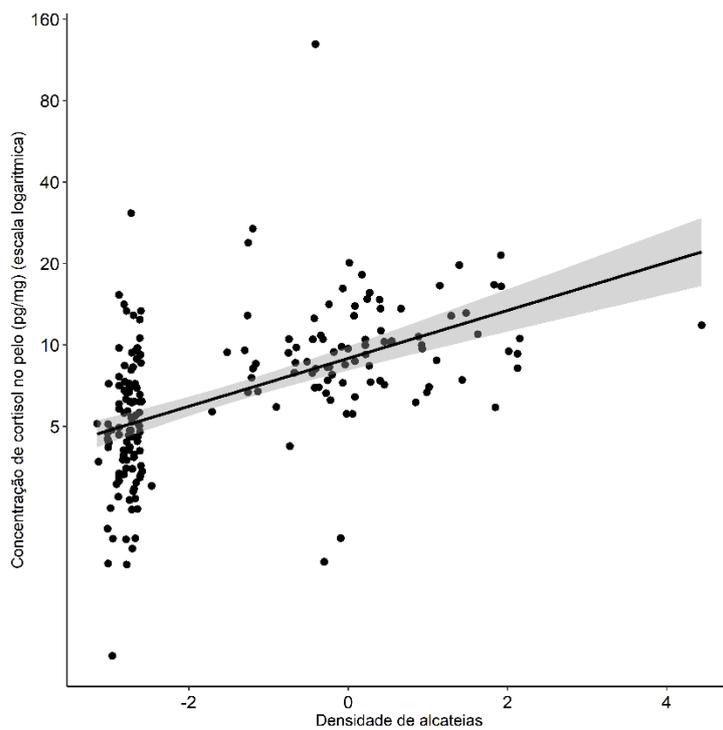


Figura 21 - Concentração de cortisol no pelo de lobos Ibéricos, por densidade de alcateias

Os valores preditos pelo modelo revelaram uma reduzida variação de CCP nos lobos amostrados ao longo das últimas décadas (Fig.22).

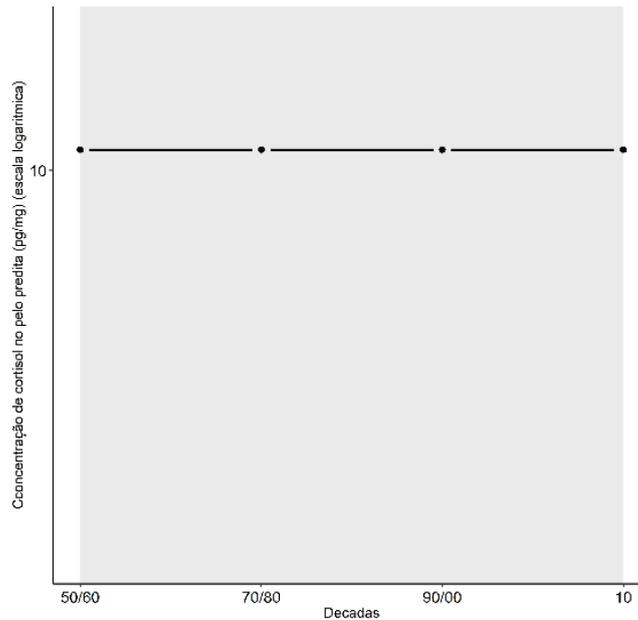


Figura 22 - Concentração de cortisol no pelo de lobos fêmea da população ibérica ao longo das últimas décadas, preditos pelo modelo linear misto. Em cinzento encontra-se o intervalo de confiança a 95% dos efeitos fixos e aleatórios

4. Discussão

4.1. Níveis de cortisol nas populações Europeias de lobo

Os resultados obtidos permitiram confirmar que a análise da concentração de cortisol (CCP) em pelos de lobo pode providenciar informação valiosa sobre o seu comportamento, fisiologia e ecologia, tal como já sugerido anteriormente (Koren *et al.*, 2019). A análise das variáveis intrínsecas e metodológicas do primeiro conjunto de dados relativos às populações europeias de lobo, revelou que diferentes regiões corporais não têm a mesma CCP. Em particular, pelos de lobo amostrados na região caudal e tórax ventral apresentaram menos CCP que a região lombar e cervical. A variação de CCP em pelos amostrados ao longo de regiões corporais é consistente com estudos aplicados a outros mamíferos, nomeadamente em cangurus (*Macropus giganteus*; Sotohira *et al.*, 2011), chimpanzés (*Pan troglodytes*; Carlitz *et al.*, 2015; Yamanashi *et al.*, 2013) e ursos pardos (*Ursus arctos*; Macbeth *et al.*, 2010).

O mecanismo mais atual aceite que explica a incorporação de componentes esteroides no pelo em crescimento é através dos vasos sanguíneos e das glândulas sebáceas e sudoríparas que rodeiam e nutrem o folículo (Bryan *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2016). A ligação do cortisol aquando dentro do pelo é um processo complexo que pode envolver melanina e queratina (Bryan *et al.*, 2013). Tipos de pelos de diferentes regiões corporais

podem apresentar diferentes períodos de crescimento ativo e, portanto, as substâncias em circulação não vão ser incorporadas igualmente ao longo do corpo (Macbeth *et al.*, 2010). Os diferentes padrões de crescimento podem ser afetados por vários fatores quer intrínsecos, quer extrínsecos (Russell *et al.*, 2012). O ciclo de crescimento do pelo é constituído por três fases: crescimento ativo (anágena), transição (catágena) e repouso (telógena), sendo o cortisol absorvido no folículo capilar, por difusão passiva, só durante a fase anágena (Heimbürge *et al.*, 2019). Uma possível explicação para diferenças na CCP entre diferentes regiões corporais pode ser por existirem proporções de folículos em diferentes fases de crescimento causados por diferentes ciclos de crescimento do pelo e ritmos de muda de pelo. Desta forma, níveis mais elevados de CCP seriam encontrados em regiões onde os folículos se encontram na fase anágena ou onde os folículos apresentam uma fase anágena mais extensa (Heimbürge *et al.*, 2019).

Macbeth *et al.*, 2010 ponderou que os níveis elevados da CCP na região do pescoço comparada com outras regiões eram devidos à sobreposição de elevações de cortisol no organismo (devido por exemplo, à falta de alimento) com o crescimento do pelo do pescoço. Acredita-se que os lobos têm uma muda longa anual, que começa na primavera tardia quando a pelagem antiga é substituída. A nova pelagem, curta, de verão começa a desenvolver-se e continua o seu crescimento durante o outono e inverno (Paquet e Carbyn, 2003). No entanto, a duração e mudança do pelo não é totalmente consensual (Mech, 2012) e portanto, relacionar amostras de pelo com períodos de tempo específicos é mais desafiante quando os padrões de muda não são sazonais ou são desconhecidos (Bryan *et al.*, 2015). É pertinente salientar que os lobos possuem um conjunto especial de pelos eréteis, a crina, que se estende desde do centro das costas (zona lombar), ao longo do pescoço, até atrás da espádua (cervical) e eriça quando o animal se encontra num estado mais agressivo (Mech, 2012). O facto de serem pelos eréteis pode significar uma maior vascularização e, portanto, maior absorção de cortisol no pelo, mas o mecanismo pelo qual isto aconteceria é desconhecido e requer maior investigação. Outra possível causa para estas discrepâncias poderá estar relacionada com diferentes cores de pelo. Acredita-se que diferenças entre os mecanismos associados com o desenvolvimento de melanócitos na taxa crescimento do pelo afeta o cortisol do pelo (Sotohira *et al.*, 2011). Isto aumenta a validação da teoria que o pelo deve ser recolhido da mesma região de modo a aumentar a precisão da análise da CCP e portanto, melhorar a qualidade dos resultados obtidos (Terwissen *et al.*, 2013).

Os nossos resultados também suportam que o peso mínimo de pelo a utilizar na extração de cortisol deve ser de 20mg, de modo que a determinação de CCP seja o mais correta possível. Apesar de ser possível quantificar cortisol com amostras de menor peso, implementar uma quantidade estandardizada de >20mg para extração de cortisol é altamente recomendado. Não foram encontradas evidências para uma diminuição de CCP com o tempo decorrido desde a morte do lobo, até 4 anos de armazenamento. Outros estudos mostraram evidências contrárias mas bastante inconsistentes, sendo que se registou um efeito negativo significativo no tempo de armazenamento no pelo de sacarrabos (*Herpestes ichneumon*; Azevedo *et al.*, 2019), mas níveis mais elevados de CCP em pelo de ursos polares (*Ursus maritimus*) armazenados por mais de 100 anos comparativamente a amostras recentes (Bechshøft *et al.*, 2012).

Atendendo às diferenças por causas de morte, animais que tinham previamente uma doença infecciosa registaram uma maior CCP. Essas doenças foram a causa de morte confirmada para alguns dos animais. Estudos anteriores mostraram que doenças crónicas podem levar a um aumento acentuado na CCP quando comparados com animais saudáveis, nomeadamente em vacas (Comin *et al.*, 2013; Braun *et al.*, 2017), cangurus (*Macropus giganteus*; Sotohira *et al.*, 2011) e cães (*Canis lupus familiaris*; Park *et al.*, 2016). Estes níveis elevados de cortisol em animais fisiologicamente comprometidos pode sugerir uma ativação repetitiva do eixo HHA (Comin *et al.*, 2013) que é um dos vários sistemas responsáveis por coordenar a resposta ao *stress* através de secreções de GCs de modo a atingir a homeostasia (Herman *et al.*, 2016). Para que se entenda os mecanismos por detrás destes resultados, teríamos de investigar cada doença separadamente, pois cada uma atua de forma particular. Alguns estudos mostraram maior *stress* oxidativo em cães com parvovirus (Elsayed *et al.*, 2020), sarna sarcótica (Beigh *et al.*, 2016), sarna demodécica (Dimri *et al.*, 2008), e dermatite (Sharma *et al.*, 2017). Apesar dos resultados terem sido obtidos através de análises ao sangue em vez de pelo, podemos supor que a CCP será também mais elevada já que este método reflete mudanças de cortisol durante dias a meses e não minutos a dias, como é o caso do sangue (Koren *et al.*, 2019), mas futura investigação é necessária. Estas doenças causadas por vírus, bactérias e ectoparasitas podem ter uma duração entre meses a anos e levar a um estado de sofrimento prolongado (Almberg *et al.*, 2016) e portanto influenciar o tipo de resposta do organismo. Níveis mais elevados de CCP foram encontrados em animais cronicamente doentes quando comparados com animais saudáveis (Braun *et al.*, 2017), o que significa que este aumento depende da duração do *stress*.

Os lobos machos mostraram uma tendência para uma menor CCP do que as fêmeas, à semelhança do que também foi registado em lobos norte-americanos e europeus (Bryan *et al.*, 2013; Molnar *et al.*, 2015). Idades mais jovens também mostraram uma relação negativa com a CCP. Curiosamente o mesmo padrão de sexo e idade foi demonstrado para níveis de cortisol de amostras fecais em lobos da América do Norte e Europa (Molnar *et al.*, 2015). Este padrão também é coincidente com os resultados da CCP face ao comprimento corporal da população ibérica. A influência do sexo na CCP e a diferença entre machos e fêmeas pode ter inúmeras causas como diferentes padrões de comportamento, condição corporal e metabolismo de esteroides (Heimbürge *et al.*, 2019).

Os valores preditos pelo modelo revelaram um aumento da CCP em março, e um aumento menor em outubro. O primeiro pico coincide notavelmente com a época de acasalamento do lobo, que decorre entre fevereiro e março (Álvares, 2011) onde os lobos cortejam e acasalam durante o estro (Mech, 1974). Durante este tempo, os níveis de hormonas sexuais estão elevados e podem influenciar a secreção de cortisol. Os lobos são uma espécie monoéstrica sazonal (Mech e Boitani, 2010) e o maior pico de CCP ocorre em março, coincidindo com a época de acasalamento na Europa (Schmidt *et al.*, 2008). Foi demonstrado que o cortisol desempenha um papel importante e pode inibir a ação do estradiol (principal hormona sexual feminina), que estimula a recetividade e o pico da hormona LH (que despoleta a ovulação), e portanto apresenta importantes implicações no sucesso de reprodução, sendo que pode levar a uma inibição da ovulação e recetividade das fêmeas ao acasalamento (Ralph *et al.*, 2016). Como a elevação crónica de GC pode diminuir a secreção de hormonas sexuais e causar falha reprodutiva, foi levantada a hipótese de que GCs elevados podem explicar a falha reprodutiva em reprodutores cooperativos socialmente subordinados (Sands e Creel, 2004). Desta forma, o aumento de cortisol em março pode contribuir para explicar o mecanismo que regula a reprodução dentro das alcateias, onde, normalmente, apenas um par de lobos com hierarquias mais elevadas acasalam, mesmo havendo vários potenciais reprodutores presentes (Mech e Boitani, 2010). Nos lobos, as fêmeas não reprodutoras apresentam um ciclo reprodutivo hormonal similar às fêmeas reprodutoras (Mech e Boitani, 2010), portanto a inibição dos efeitos das hormonas reprodutoras causado pelo cortisol pode explicar a razão pela qual estas não produzem ninhadas. Contudo, não pode ser descartada a hipótese de que a elevada CCP na época de acasalamento se dever ao aumento de comportamentos sexuais e interações intraespecíficas agressivas (Heimbürge *et al.*, 2019). A menor CCP foi registada em Maio que coincide com a altura dos partos no lobo (Schmidt *et al.*, 2008; Rio-Maior *et*

al., 2018). Os níveis de CCP voltam a subir ligeiramente até outubro, altura em que os juvenis abandonam os locais de reprodução e começam a movimentar-se com a alcateia por todo o território (Rio-Maior *et al.*, 2018). Apesar deste padrão poder estar associado com o final da época de dependência das crias, foi também demonstrado que os níveis de CCP têm um pico no inverno que indica que a produção de cortisol poderá ser um mecanismo de adaptação a condições ambientais agrestes (Huber *et al.*, 2003).

4.2. Níveis de cortisol nas populações Ibéricas de lobo

Neste conjunto de dados foi possível avaliar o efeito das variáveis intrínsecas, metodológicas e ambientais (extrínsecas) para a população Ibérica de lobo, revelando resultados surpreendentes.

As populações contemporâneas da Galiza apresentaram uma menor CCP que as restantes populações. A Espanha é um país descentralizado, onde a gestão da vida selvagem está sob a jurisdição de cada região autónoma. O Ministério do Meio Ambiente tem a função de coordenar as regiões autónomas, contudo a sua influência tem vindo a diminuir (Blanco e Cortés, 2012). A maioria dos lobos espanhóis vive a norte do rio Douro, por isso estão incluídos no Anexo V da Diretiva Habitats e podem ser caçados com cotas estabelecidas pelas regiões autónomas (Blanco e Cortés, 2012), ao contrário dos lobos a sul do rio Douro que estão totalmente protegidos (Blanco e Cortés, 2007) pelos Anexos II e IV da Diretiva Habitats e só podem ser abatidos em condições excecionais (Blanco e Cortés, 2012). No entanto, a caça furtiva é comum em ambos os lados do rio (Blanco e Cortés, 2007). Seria então de esperar que os lobos que podem ser caçados legalmente apresentassem níveis mais elevados de CCP, no entanto isto não se verificou com base nos nossos resultados.

A Galiza apresenta altos níveis de densidade e atividade humana, com cerca de 80–90 habitantes km² durante as últimas cinco décadas, e 93 habitantes km² e 1 povoamento por km² na última década (Llaneza *et al.*, 2012). No entanto, nesta região o lobo persiste há décadas numa paisagem dominada pelos humanos e seleciona locais de refúgio bastante próximo de núcleos urbanos (Llaneza *et al.*, 2012, 2016), o que sugere uma adaptação deste carnívoro aos elevados níveis de presença e perturbação humana que se verificam na Galiza. Contudo, as amostras recolhidas na Galiza apresentam menor CCP que as recolhidas em Portugal, onde o lobo também persiste em áreas bastante humanizadas (Grilo *et al.*, 2019; Rio-Maior *et al.*, 2019). A complexidade do comportamento dos lobos e o facto desta espécie ser altamente resiliente e com uma

elevada capacidade de adaptação a uma ampla gama de ambientes, desde que haja alimento e refúgio disponíveis pode explicar estas diferenças (Llaneza *et al.*, 2012; Grilo *et al.*, 2019; Rio-Maior *et al.*, 2019). Nas montanhas da Cantábria e restante área de distribuição do lobo em Espanha, situada a leste da Galiza, os lobos alimentam-se principalmente de ungulados selvagens (Lagos and Bárcena, 2018). Porém, no oeste da Galiza e no noroeste de Portugal, os lobos coexistem com as populações tradicionais de pôneis em regime de liberdade, denominados garranos (Álvares, 2011; Lagos e Bárcena, 2018). Nestas regiões, a probabilidade de ocorrência do lobo está relacionada com a densidade de garranos e portanto, estes equídeos desempenham o papel ecológico de principal presa do lobo, o qual é exercido pelo corço, veado ou javali no leste da Galiza e noutras partes da Europa (Álvares, 2011; Newsome *et al.*, 2016; Lagos e Bárcena, 2018). A existência de uma grande população de garranos nas paisagens montanhosas da Galiza e norte de Portugal pode funcionar como uma forma de atenuar a predação sobre outras espécies de gado com maior valor económico (Lagos e Bárcena, 2018). Pode também explicar o maior tamanho dos lobos ibéricos em comparação com o que se poderia esperar de acordo com a latitude da Península Ibérica (Lagos e Bárcena, 2018). Os lobos em Portugal alimentam-se principalmente de espécies domésticas, sendo de destacar casos de 98% de frequência de ocorrência para cabras no norte de Portugal e 94-96% para gado no centro-oeste de Portugal (Vos, 2000; Álvares, 2011; Lagos e Bárcena, 2018). Embora os lobos aproveitem a disponibilidade de alimentos oferecida pela proximidade humana, pagam um elevado preço por sofrerem uma significativa mortalidade não natural. Acresce que, nas últimas décadas, verificou-se um êxodo rural dramático, com muitas aldeias a ser abandonadas em muitas regiões de Portugal, com a consequente diminuição da densidade pecuária, que constitui a principal fonte de alimento para os lobos face à reduzida disponibilidade de presas selvagens (Álvares, 2011; Torres *et al.*, 2015). Em suma, a maior densidade de presas selvagens em Espanha em comparação com Portugal, pode auxiliar a explicação dos resultados obtidos relacionado com os níveis de CCP, sendo que em Portugal, ao existir uma falta de presas selvagens leva a valores mais elevados de CCP comparativamente à região da Galiza, onde existe maior disponibilidade de presas.

A relação negativa entre os índices de condição corporal (SMI) e o comprimento corporal do lobo com a CCP demonstra que uma menor condição e comprimento corporal causa um aumento dos níveis de cortisol. Este efeito também foi verificado para ursos polares (Mislán *et al.*, 2016). A condição corporal pode ser definida como uma medida do estado energético (ou nutricional) de um animal, especialmente o tamanho relativo das reservas de energia, como gordura e proteína (Peig e Green, 2009). A baixa condição corporal

pode dever-se à falta de disponibilidade de alimento ou ser causada por alguma doença. Estudos anteriores revelaram que uma diminuição na disponibilidade de alimento pode levar a um aumento de cortisol, causando um *stress* nutricional (Heimbürge *et al.*, 2019), o qual pode ser interpretado como um estímulo para favorecer o comportamento de procura de alimento em adultos (Romero e Wingfield, 2016).

Os resultados também mostraram uma maior CCP com uma maior densidade de alcateias. Uma vez que as alcateias são unidades familiares, normalmente compostas por um casal reprodutor e a sua descendência de vários anos, o comportamento amigável dentro da alcateia não é surpreendente. Em contraste, as alcateias são geralmente intolerantes com seus vizinhos conespecíficos (Cassidy *et al.*, 2016). Desta forma, os resultados obtidos podem ser explicados à luz de agressões intraespecíficas entre diferentes alcateias. As agressões entre alcateias é descrita como uma interacção agressiva face a um indivíduo conespecífico intruso de uma alcateia adjacente, e a execução bem-sucedida desse comportamento serve para manter os limites territoriais, facilitando o acesso contínuo a habitat de qualidade adequado para a reprodução e aquisição de presas (Schell, 2020). Embora o conflito entre alcateias não seja raro, os lobos exibem uma variedade de comportamentos territoriais não agressivos que diminuem o risco de confronto, como seja a marcação do território (urina e excrementos) e as vocalizações por uivos, de modo a sinalizar sua localização e superioridade para as alcateias vizinhas (Cassidy *et al.*, 2016). Quando esses comportamentos falham em separar alcateias vizinhas ou uma alcateia decide desafiar outra, os confrontos que se seguem são quase sempre agressivos. Nestes casos, cada alcateia tenta afastar a outra e, se possível, ferir e matar um membro da outra alcateia (Cassidy *et al.*, 2016). Estudos comprovam que uma maior densidade de lobos leva a um aumento do número de agressões intraespecíficas com indivíduos de alcateias vizinhas (Cubaynes *et al.*, 2014), o que permite justificar os nossos resultados relativos à relação entre níveis de cortisol e a densidade de alcateias.

Os lobos dominantes apresentam níveis basais de cortisol mais elevados do que os subordinados (Sands e Creel, 2004) o que poderá estar associado ao facto de serem estes os primeiros a defender a alcateias em caso de confronto. Os lobos dominantes lutam em taxas e intensidades mais altas, e isso pode ser mais *stressante*, mesmo se uma alta proporção das lutas forem vencidas (Sands e Creel, 2004). Apesar de níveis elevados de cortisol não se encontrarem relacionados com comportamentos agressivos (Creel, 2005; Cassidy *et al.*, 2017), confrontos com alcateias vizinhas, que podem ameaçar o seu território e fonte de alimento, são situações potencialmente *stressantes*

(Cubaynes *et al.*, 2014) e causadoras de um aumento do nível de CCP. Estes resultados podem também explicar que os subadultos possuam menos CCP quando comparados com os adultos. Pode-se esperar uma forte relação entre idade e hierarquia ao comparar subadultos a animais mais velhos, porque o tamanho (e, conseqüentemente, a habilidade de luta) ainda está em desenvolvimento (Creel, 2005), logo estes não se envolverão em tantos conflitos e confrontos com outros lobos quando comparados com os membros adultos da alcateia.

Relativamente às populações históricas, os resultados também foram inesperados. Vários estudos que se focam na comparação de cortisol em populações históricas e contemporâneas relataram que as populações históricas apresentam maiores níveis de CCP, como no caso de ursos polares (Bechshøft *et al.*, 2012). Como já foi referido anteriormente, o lobo ibérico foi extremamente perseguido e caçado quase até à extinção (Blanco e Cortez, 2002). Contudo, no nosso estudo as amostras históricas apresentam um menor nível de CCP do que as amostras atuais. Visto que uma maior densidade de alcateias leva a um aumento da CCP, isto pode explicar os resultados das populações históricas, uma vez que a partir da década de 1960 a população de lobos experienciou um decréscimo drástico (Álvares, 2011), que terá resultado numa diminuição da densidade de alcateias. À luz da explicação acima, uma menor densidade de lobos e conseqüentemente densidade de alcateias, leva a um decréscimo da probabilidade de estes entrarem em conflitos intraespecíficos. Atualmente a população Ibérica encontra-se a recuperar com tendência positiva, no entanto a sua abrangência territorial diminui consideravelmente em comparação com a década de 1950. Pode-se então sugerir que as populações históricas apresentem menor CCP do que as contemporâneas devido ao facto da densidade de alcateias ter diminuído durante a intensa perseguição humana no século XX.

As estradas são uma característica omnipresente e em constante expansão em todas as paisagens modificadas pelo homem. Estradas de alto tráfego afetam profundamente os ecossistemas, aumentando a mortalidade da vida selvagem, mudando a abundância e o comportamento dos animais e modificando os habitats naturais (Bojarska *et al.*, 2020). No entanto, surpreendentemente o presente estudo revelou uma menor CCP com uma maior densidade de estradas. A densidade da estrada (km/km²) é uma métrica que os gestores de terreno usam para prever a adequação do habitat para lobos, direcionar esforços para prevenir depredações no gado e cães, e para estabelecer objetivos populacionais para planos de recuperação de lobos sob a Lei de Espécies Ameaçadas (Millbrand, 2019). Vários estudos realizados na América do Norte na

década de 1980 sugeriram que as populações de lobos não poderiam sobreviver em áreas com densidades rodoviárias superiores a $0,58\text{km}/\text{km}^2$ (Blanco e Cortés, 2007). No entanto, uma análise das variáveis relacionadas com a distribuição dos lobos na Galiza revelou que os lobos, quando legalmente protegidos e com acesso livre a refúgios seguros, podem sobreviver em áreas com densidades notavelmente mais altas de estradas pavimentadas (até $3,7\text{ km}/\text{km}^2$) (Llaneza *et al.*, 2012) sendo que densidade média de estradas a norte do rio Douro é de $1,53\text{ km}/\text{km}^2$ (Blanco e Cortés, 2007). No entanto, as estradas continuam a ser estruturas antropogénicas e a tendência do lobo é evitá-las de modo a minimizar o conflito com o homem e portanto de um modo geral, os lobos tendem a evitar zonas com uma alta densidade de estradas (Zlatanova e Popova, 2013). Este padrão poderá ajudar a explicar a menor CCP em zonas com maior densidade rodoviária, visto que o conflito entre alcateias irá ser mais reduzido devido à menor densidade de lobos. A nível Ibérico, os lobos também podem utilizar as estradas secundárias asfaltadas para facilitar as suas deslocações durante a noite (Carricondo-Sanchez *et al.*, 2020), o que poderá reflectir uma tolerância a estas infraestruturas lineares, e consequentemente, justificando a ausência de relação positiva com os níveis de cortisol que foi obtida.

5. Considerações finais

Estudos de análise de CCP podem fornecer uma ferramenta importante para compreender melhor as ligações entre o *stress* a longo prazo e a saúde e o desempenho de populações. Nesta investigação, identificámos uma série de fatores importantes e inesperados que podem influenciar os níveis de cortisol no lobo. Os nossos resultados sugerem que o principal causador de *stress* no lobo é a presença e interação com alcateias rivais. Apesar dos fatores antropogénicos, como a perseguição e rede viária, não terem tido efeitos significativos diretos no aumento de *stress* do lobo, a pressão humana contribui indiretamente para a fragilização e destabilização das alcateias. A constante destruição de habitat e aumento da densidade humana reduz em grande parte as zonas que oferecem as condições ideais para a sobrevivência do lobo.

É, portanto, de extrema importância garantir que existem locais longe da perturbação humana e que permitam um espaçamento moderado entre alcateias. Assim, à luz deste estudo, é evidente a necessidade de criação de mais áreas protegidas que confirmem locais de refúgio seguro aos lobos. Para além disto, um investimento em educação

ambiental e medidas de compensação mais eficazes seriam benéficas para reduzir o conflito entre humanos e lobos.

6. Referências Bibliográficas

Almberg, E. S. *et al.* (2016) 'The invasion, dynamics, and impacts of infectious disease in Yellowstone's wolf population', *Yellowstone Science*, 24(1). Available at: <http://pubs.er.usgs.gov/publication/70174569>.

Álvares, F. J. (2011) 'Ecologia e conservação do lobo (*Canis lupus*, L.) no Noroeste de Portugal. PhD thesis', p. 191. Available at: North-western Portugal is characterized by increased habitat heterogeneity and high levels of human pressure, which pose a challenge to wolf conservation. This study aimed at providing a thorough account of wolf demographic and ecological parameters in th.

Azevedo, A. *et al.* (2019) 'Correction: Age, sex and storage time influence hair cortisol levels in a wild mammal population', *Plos One*, 14(9), p. e0222963. doi: 10.1371/journal.pone.0222963.

Barton, K. and Barton, M. K. (2015) 'Package "MuMin". Version 1.9. 18', See <https://cran.r-project.org/web/packages/MuMIn/MuMIn.pdf>.

Bates, D. *et al.* (2007) 'The lme4 package. R Package Version 2: 74'.

Bautista, C. *et al.* (2019) 'Large carnivore damage in Europe: Analysis of compensation and prevention programs', *Biological Conservation*, 235(May), pp. 308–316. doi: 10.1016/j.biocon.2019.04.019.

Bechshøft, T. *et al.* (2012) 'Measuring environmental stress in East Greenland polar bears, 1892-1927 and 1988-2009: What does hair cortisol tell us?', *Environment International*, 45(1), pp. 15–21. doi: 10.1016/j.envint.2012.04.005.

Beigh, S. A., Soodan, J. S. and Bhat, A. M. (2016) 'Sarcoptic mange in dogs: Its effect on liver, oxidative stress, trace minerals and vitamins', *Veterinary Parasitology*, 227, pp. 30–34. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.07.013.

Bencatel, J. and Sabino-marques, H. (2019) *Mamíferos Portugal*.

Blanco, J. C. (2019) 'Aspectos esenciales del lobo y su gestión', (January). Available at: www.lifelobo.es.

Blanco, J. C. and Cortés, Y. (2002) 'Ecología, censos, percepción y evolución del lobo en España: Análisis de un conflicto', (July 2014).

Blanco, J. C. and Cortés, Y. (2007) 'Dispersal patterns, social structure and mortality of wolves living in agricultural habitats in Spain', *Journal of Zoology*, 273(1), pp. 114–124.

doi: 10.1111/j.1469-7998.2007.00305.x.

Blanco, J. and Cortés, Y. (2012) 'Surveying wolves without snow: A critical review of the methods used in Spain', *Hystrix*, 23, pp. 35–48.

Boitani, L. (2000) 'Action Plan for the conservation of the wolves (*Canis lupus*) in Europe', *Nature and environment*, 113(113), pp. 1–85.

Bojarska, K. *et al.* (2020) 'Opportunity and peril: how wolves use a dense network of forest roads', *Mammalian Biology*, 100(2), pp. 203–211. doi: 10.1007/s42991-020-00014-0.

Braun, U. *et al.* (2017) 'Hair cortisol concentration and adrenal gland weight in healthy and ill cows', 159, pp. 493–495.

Bryan, H. M. *et al.* (2013) 'Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs.', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 52(2), pp. 189–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562104><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3624789>.

Bryan, H. M. *et al.* (2015) 'Heavily hunted wolves have higher stress and reproductive steroids than wolves with lower hunting pressure', *Functional Ecology*, 29(3), pp. 347–356. doi: 10.1111/1365-2435.12354.

Burnham, K. P. and Anderson, D. R. (2002) 'A practical information-theoretic approach', *Model selection and multimodel inference, 2nd ed. Springer, New York*, 2.

Carlitz, E. H. D. *et al.* (2015) 'Effects of body region and time on hair cortisol concentrations in chimpanzees (*Pan troglodytes*)', *General and Comparative Endocrinology*, 223, pp. 9–15. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.09.022.

Carricondo-Sanchez, D. *et al.* (2020) 'Wolves at the door? Factors influencing the individual behavior of wolves in relation to anthropogenic features', *Biological Conservation*, 244(November 2019), p. 108514. doi: 10.1016/j.biocon.2020.108514.

Cassidy, K. A. *et al.* (2016) 'Territoriality and inter-pack aggression in gray wolves: Shaping a social carnivore's life history Rudyard Kipling 's Law of the Jungle meets Yellowstone's Law of the Mountains', *Yellowstone Science*, p. 328.

Cassidy, K. A. *et al.* (2017) 'Sexually dimorphic aggression indicates male gray wolves specialize in pack defense against conspecific groups', *Behavioural Processes*, 136,

pp. 64–72. doi: 10.1016/j.beproc.2017.01.011.

Chapron, G. *et al.* (2014) 'Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes', *Science*, 346(6216), pp. 1517–1519. doi: 10.1126/science.1257553.

Ciucci, P. *et al.* (2009) 'Long-Distance Dispersal of a Rescued Wolf From the Northern Apennines to the Western Alps', *Journal of Wildlife Management*, 73(8), pp. 1300–1306. doi: 10.2193/2008-510.

Ciucci, P. *et al.* (2018) 'Hierarchical, multi-grain rendezvous site selection by wolves in southern Italy', *Journal of Wildlife Management*, 82(5), pp. 1049–1061. doi: 10.1002/jwmg.21440.

Ciucci, P. *et al.* (2020) 'Anthropogenic food subsidies hinder the ecological role of wolves: Insights for conservation of apex predators in human-modified landscapes', *Global Ecology and Conservation*, 21, p. e00841. doi: 10.1016/j.gecco.2019.e00841.

Comin, A. *et al.* (2013) 'Hair cortisol as a marker of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in Friesian dairy cows clinically or physiologically compromised', *Livestock Science*, 152(1), pp. 36–41. doi: 10.1016/j.livsci.2012.11.021.

Cooke, S. J. and O'Connor, C. M. (2010) 'Making conservation physiology relevant to policy makers and conservation practitioners', *Conservation Letters*, 3(3), pp. 159–166. doi: 10.1111/j.1755-263X.2010.00109.x.

Copernicus Land Monitoring Service (2020) *EU-DEM v1.0 and Derived Products — Copernicus Land Monitoring Service*. Available at: <https://land.copernicus.eu/imagery-in-situ/eu-dem/eu-dem-v1-0-and-derived-products> (Accessed: 18 September 2020).

Coristine, L. E. *et al.* (2014) 'A conceptual framework for the emerging discipline of conservation physiology', *Conservation Physiology*, 2(1). doi: 10.1093/conphys/cou033.

Corsi, F., Duprè, E. and Boitani, L. (1999) 'A large-scale model of wolf distribution in Italy for conservation planning', *Conservation Biology*, 13(1), pp. 150–159. doi: 10.1046/j.1523-1739.1999.97269.x.

Creel, S. *et al.* (2002) 'Snowmobile Activity and Glucocorticoid Stress Responses in Wolves and Elk', *Conservation Biology*, 16(3), pp. 809–814. doi: 10.1046/j.1523-1739.2002.00554.x.

- Creel, S. (2005) 'Dominance, aggression, and glucocorticoid levels in social carnivores', *Journal of Mammalogy*, 86(2), pp. 255–264. doi: 10.1644/BHE-002.1.
- Cruz, T. *et al.* (2014) 'Roe deer reintroduction in central Portugal: a tool for Iberian wolf conservation.', *Galemys, Spanish Journal of Mammalogy*, 22(June), pp. 31–40. doi: 10.7325/galemys.2014.a3.
- Cubaynes, S. *et al.* (2014) 'Density-dependent intraspecific aggression regulates survival in northern Yellowstone wolves (*Canis lupus*)', *Journal of Animal Ecology*, 83(6), pp. 1344–1356. doi: 10.1111/1365-2656.12238.
- Dantzer, B. *et al.* (2014) 'Measures of physiological stress: A transparent or opaque window into the status, management and conservation of species?', *Conservation Physiology*, 2(1), pp. 1–18. doi: 10.1093/conphys/cou023.
- Dimri, U. *et al.* (2008) 'Changes in oxidative stress indices, zinc and copper concentrations in blood in canine demodicosis', *Veterinary Parasitology*, 154(1–2), pp. 98–102. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.03.001.
- Echegaray, J. and Vilà, C. (2010) 'Noninvasive monitoring of wolves at the edge of their distribution and the cost of their conservation', *Animal Conservation*, 13(2), pp. 157–161. doi: 10.1111/j.1469-1795.2009.00315.x.
- Elsayed, N. M., Kubesy, A. A. and Salem, N. Y. (2020) 'Altered blood oxidative stress biomarkers in association with canine parvovirus enteritis', *Comparative Clinical Pathology*, 29(2), pp. 355–359. doi: 10.1007/s00580-019-03067-x.
- Figueiredo, A. M. *et al.* (2020) 'What does the wolf eat? Assessing the diet of the endangered Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in northeast Portugal', *Plos One*, 15(3), p. e0230433. doi: 10.1371/journal.pone.0230433.
- Findlay, J. W. A. and Dillard, R. F. (2007) 'Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays', *AAPS Journal*, 9(2), pp. E260–E267. doi: 10.1208/aapsj0902029.
- Geffen, E., Anderson, M. J. and Wayne, R. K. (2004) 'Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf', *Molecular Ecology*, 13(8), pp. 2481–2490. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02244.x.
- Gipson, P. S. *et al.* (2000) 'Accuracy and Precision of Estimating Age of Gray Wolves by Tooth Wear', *The Journal of Wildlife Management*, 64(3), p. 752. doi: 10.2307/3802745.

- Gómez-Sánchez, D. *et al.* (2018) *On the path to extinction: Inbreeding and admixture in a declining grey wolf population*, *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/mec.14824.
- Grilo, C. *et al.* (2019) 'Refuge as major habitat driver for wolf presence in human-modified landscapes', *Animal Conservation*, 22(1), pp. 59–71. doi: 10.1111/acv.12435.
- Heimbürge, S., Kanitz, E. and Otten, W. (2019) 'The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals', *General and Comparative Endocrinology*, 270(October 2018), pp. 10–17. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.09.016.
- Herman, J. P. *et al.* (2016) 'Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. Comprehensive Physiology', *Comprehensive Physiology*, 6(2), pp. 603–621. doi: 10.1002/cphy.c150015.Regulation.
- Hindrikson, M. *et al.* (2012) 'Bucking the Trend in Wolf-Dog Hybridization: First Evidence from Europe of Hybridization between Female Dogs and Male Wolves', *PLoS ONE*, 7(10), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0046465.
- Huber, S., Palme, R. and Arnold, W. (2003) 'Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*)', *General and Comparative Endocrinology*, 130(1), pp. 48–54. doi: 10.1016/S0016-6480(02)00535-X.
- Instituto Nacional de Estadística (2009) 'Censo Agrario 2009. Proyecto'. Available at: <https://www.ine.es/CA/Wizard.do> (Accessed: 5 October 2020).
- Instituto Nacional de Estatística (2009) *Recenseamentos*. Available at: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_main (Accessed: 30 September 2020).
- Jedrzejewski, W. *et al.* (2007) 'Territory size of wolves *Canis lupus*: Linking local (Białowieża Primeval Forest, Poland) and Holarctic-scale patterns', *Ecography*, 30(1), pp. 66–76. doi: 10.1111/j.2006.0906-7590.04826.x.
- Kersey, D. C. and Dehnhard, M. (2014) 'The use of noninvasive and minimally invasive methods in endocrinology for threatened mammalian species conservation', *General and Comparative Endocrinology*, 203, pp. 296–306. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.04.022.
- Koren, L. *et al.* (2019) 'Towards the validation of endogenous steroid testing in wildlife hair', *Journal of Applied Ecology*, 56(3), pp. 547–561. doi: 10.1111/1365-2664.13306.
- Lagos, L. and Bárcena, F. (2018) 'Spatial variability in wolf diet and prey selection in

Galicia (NW Spain)', *Mammal Research*, 63(2), pp. 125–139. doi: 10.1007/s13364-018-0352-6.

Linnell, J. D. C. *et al.* (2020) 'The challenges and opportunities of coexisting with wild ungulates in the human-dominated landscapes of Europe's Anthropocene', *Biological Conservation*, 244(March), p. 108500. doi: 10.1016/j.biocon.2020.108500.

Linnell, J. D. C., Trouwborst, A. and Fleurke, F. M. (2017) 'When is it acceptable to kill a strictly protected carnivore? Exploring the legal constraints on wildlife management within Europe's Bern Convention', *Nature Conservation*, 21, pp. 129–157. doi: 10.3897/natureconservation.21.12836.

Llaneza, L. *et al.* (2016) 'Resting in risky environments: the importance of cover for wolves to cope with exposure risk in human-dominated landscapes', *Biodiversity and Conservation*, 25(8), pp. 1515–1528. doi: 10.1007/s10531-016-1134-6.

Llaneza, L., López-Bao, J. V. and Sazatornil, V. (2012) 'Insights into wolf presence in human-dominated landscapes: The relative role of food availability, humans and landscape attributes', *Diversity and Distributions*, 18(5), pp. 459–469. doi: 10.1111/j.1472-4642.2011.00869.x.

Macbeth, B. J. *et al.* (2010) 'Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging grizzly bears (*Ursus arctos*): Considerations with implications for other wildlife', *Canadian Journal of Zoology*, 88(10), pp. 935–949. doi: 10.1139/Z10-057.

Madliger, C. L. *et al.* (2016) 'Success stories and emerging themes in conservation physiology', *Conservation Physiology*, 4(1), pp. 1–17. doi: 10.1093/conphys/cov057.

Madliger, C. L. and Love, O. P. (2014) 'The Need for a Predictive, Context-Dependent Approach to the Application of Stress Hormones in Conservation', *Conservation Biology*, 28(1), pp. 283–287. doi: 10.1111/cobi.12185.

Mech, L. D. (1974) 'American Society of Mammalogists (*Canis lupus*) L. David Mech', *American Society of Mammalogists (Canis lupus)*, 37(4), pp. 773–777.

Mech, L. D. (2012) *Wolf*. Knopf Doubleday Publishing Group. Available at: <https://books.google.com.br/books?id=KOQZrXvczGMC>.

Mech, L. D. and Boitani, L. (2010) *Wolves: behavior, ecology, and conservation*. University of Chicago Press.

Meyer, J. S. and Novak, M. A. (2012) 'Minireview: Hair cortisol: A novel biomarker of hypothalamic-pituitary- adrenocortical activity', *Endocrinology*, 153(9), pp. 4120–4127. doi: 10.1210/en.2012-1226.

Millbrand, Z. (2019) 'Raods, trails and grey wolf habitat selection in Michigan's upper peninsula', (April).

Mislan, P. *et al.* (2016) 'Assessing stress in Western Hudson Bay polar bears using hair cortisol concentration as a biomarker', *Ecological Indicators*, 71, pp. 47–54.

Molnar, B. *et al.* (2015) 'Environmental and intrinsic correlates of stress in free-ranging wolves', *PLoS One*, 10(9), p. e0137378.

Nakagawa, S. and Schielzeth, H. (2013) 'A general and simple method for obtaining R² from generalized linear mixed-effects models', *Methods in ecology and evolution*, 4(2), pp. 133–142.

Newsome, T. M. *et al.* (2016) 'Food habits of the world's grey wolves', *Mammal Review*, 46(4), pp. 255–269. doi: 10.1111/mam.12067.

Nowak, S. and Myslajek, R. W. (2017) 'Response of the wolf (*Canis lupus* linnaeus, 1758) population to various management regimes at the edge of its distribution range in western Poland, 1951-2012', *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(3), pp. 187–203. doi: 10.15666/aeer/1503_187203.

Paquet, P. C. and Carbyn, L. N. (2003) 'Gray Wolf: *Canis lupus* and Allies', *Wild Mammals of North America: Biology, Management, and Conservation*, pp. 482–510.

Park, S.-H. *et al.* (2016) 'Elevated cortisol content in dog hair with atopic dermatitis', *Japanese Journal of Veterinary Research*, 64(2), pp. 123–129. doi: 10.14943/jjvr.64.2.123.

Pearce-Higgins, J. W. and Yalden, D. W. (2004) 'Habitat selection, diet, arthropod availability and growth of a moorland wader: The ecology of European Golden Plover *Pluvialis apricaria* chicks', *Ibis*, 146(2), pp. 335–346. doi: 10.1111/j.1474-919X.2004.00278.x.

Peig, J. and Green, A. J. (2009) 'New perspectives for estimating body condition from mass/length data: The scaled mass index as an alternative method', *Oikos*, 118(12), pp. 1883–1891. doi: 10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x.

Pimenta, V. *et al.* (2005) 'Situação Populacional do Lobo em Portugal, resultados do

Censo Nacional 2002/2003’.

Pimenta, V. *et al.* (2017) ‘Wolf predation on cattle in Portugal: Assessing the effects of husbandry systems’, *Biological Conservation*, 207, pp. 17–26. doi: 10.1016/j.biocon.2017.01.008.

R Core Team (2019) ‘A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2012’, URL <https://www.R-project.org>.

Ralph, C. R. *et al.* (2016) ‘Impact of psychosocial stress on gonadotrophins and sexual behaviour in females: Role for cortisol?’, *Reproduction*, 152(1), pp. R1–R14. doi: 10.1530/REP-15-0604.

Randi, E. *et al.* (2014) ‘Multilocus detection of wolf x dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection’, *PLoS ONE*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0086409.

Rio-Maior, H. *et al.* (2018) ‘Use of space and homesite attendance by Iberian wolves during the breeding season’, *Mammalian Biology*, 92, pp. 1–10.

Rio-Maior, H. *et al.* (2019) ‘Designing the landscape of coexistence: Integrating risk avoidance, habitat selection and functional connectivity to inform large carnivore conservation’, *Biological Conservation*, 235(April), pp. 178–188. doi: 10.1016/j.biocon.2019.04.021.

Romero, L. M. and Wingfield, J. C. (2016) *Tempests, poxes, predators, and people: stress in wild animals and how they cope*. Oxford University Press.

Russell, E. *et al.* (2012) ‘Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions’, *Psychoneuroendocrinology*, 37(5), pp. 589–601. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.09.009.

Salvatori, V. *et al.* (2019) ‘High levels of recent wolf × dog introgressive hybridization in agricultural landscapes of central Italy’, *European Journal of Wildlife Research*, 65(5). doi: 10.1007/s10344-019-1313-3.

Salvatori, V. and Linnell, J. (2005) ‘Report on the conservation status and threats for wolf (*Canis lupus*) in Europe’, *Council of Europe. PVS/Inf (2005)*, (1), p. 27. doi: <http://www.lcie.org/Docs/COE/Salvatori%20COE%20Status%20of%20the%20wolf%20in%20Europe.pdf>.

Sands, J. and Creel, S. (2004) ‘Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid

levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*', *Animal Behaviour*, 67(3), pp. 387–396. doi: 10.1016/j.anbehav.2003.03.019.

Schell, C. J. *et al.* (2017) 'Investigation of techniques to measure cortisol and testosterone concentrations in coyote hair', *Zoo biology*, 36(3), pp. 220–225.

Schell, C. J. (2020) 'Investigating the genetic and environmental architecture of interpack aggression in North American grey wolves', *Molecular ecology*, 29(10), pp. 1757–1760. doi: 10.1111/mec.15453.

Schmidt, K. *et al.* (2008) 'Reproductive behaviour of wild-living wolves in Białowieża Primeval Forest (Poland)', *Journal of Ethology*, 26(1), pp. 69–78.

Sharma, R. *et al.* (2017) 'Biomarkers of Oxidative Stress in Canine Dermatitis', *Journal of Animal Research*, 7(3), p. 567. doi: 10.5958/2277-940x.2017.00084.5.

Silva, P. *et al.* (2018) 'Cryptic population structure reveals low dispersal in Iberian wolves', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-32369-3.

Sotohira, Y. *et al.* (2011) 'Stress assessment using hair cortisol of kangaroos affected by the lumpy jaw disease', *Cell*.

Suutarinen, J. and Kojola, I. (2017) 'Poaching regulates the legally hunted wolf population in Finland', *Biological Conservation*, 215, pp. 11–18.

Terwissen, C. V., Mastromonaco, G. F. and Murray, D. L. (2013) 'Influence of adrenocorticotrophin hormone challenge and external factors (age, sex, and body region) on hair cortisol concentration in Canada lynx (*Lynx canadensis*)', *General and Comparative Endocrinology*, 194, pp. 162–167. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.09.010.

Torres, R. T. *et al.* (2015) 'To eat or not to eat? The diet of the endangered Iberian Wolf (*Canis lupus signatus*) in a human-dominated landscape in central Portugal', *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0129379.

Torres, R. T. and Fonseca, C. (2016) 'Perspectives on the Iberian wolf in Portugal: population trends and conservation threats', *Biodiversity and Conservation*, 25Torres,(3), pp. 411–425. doi: 10.1007/s10531-016-1061-6.

Trouwborst, A. (2010) 'Managing the Carnivore Comeback : International and EU Species Protection Law and the Return of Lynx , Wolf and Bear to Western Europe', (August 2010). doi: 10.1093/jel/eqq013.

Trouwborst, A. (2014) 'The EU Habitats Directive and wolf conservation and

management on the Iberian Peninsula: a legal perspective.’, *Galemys, Spanish Journal of Mammalogy*, 22, pp. 15–30. doi: 10.7325/galemys.2014.a2.

Trouwborst, A., Krofel, M. and Linnell, J. D. C. (2015) ‘Recovery of large carnivores in Europe’s modern human-dominated landscapes.’, *Biodiversity and conservation*, 24(10), pp. 1517–1519. doi: 10.1016/S0169-5347(01)02290-X.

Venter, O. *et al.* (2016) ‘Global terrestrial Human Footprint maps for 1993 and 2009’, *Scientific Data*, 3, pp. 1–10. doi: 10.1038/sdata.2016.67.

Verardi, A., Lucchini, V. and Randi, E. (2006) ‘Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis’, *Molecular Ecology*, 15(10), pp. 2845–2855. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x.

Veronesi, M. C. *et al.* (2015) ‘Coat and claws as new matrices for noninvasive long-term cortisol assessment in dogs from birth up to 30 days of age’, *Theriogenology*, 84(5), pp. 791–796.

Webb, E. *et al.* (2010) ‘Assessing individual systemic stress through cortisol analysis of archaeological hair’, *Journal of Archaeological Science*, 37(4), pp. 807–812. doi: 10.1016/j.jas.2009.11.010.

Wickham, H. (2016) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. springer.

Wingfield, J. C., Kelley, J. P. and Angelier, F. (2011) ‘What are extreme environmental conditions and how do organisms cope with them?’, *Current Zoology*, 57(3), pp. 363–374. doi: 10.1093/czoolo/57.3.363.

Yamanashi, Y. *et al.* (2013) ‘Cortisol analysis of hair of captive chimpanzees (*Pan troglodytes*)’.

Zlatanova, D. *et al.* (2014) ‘Adaptive diet strategy of the wolf (*Canis lupus L.*) in Europe: A review’, *Acta Zoologica Bulgarica*, 66(4), pp. 439–452.

Zlatanova, D. and Popova, E. (2013) ‘Habitat variables associated with wolf (*Canis lupus L.*) distribution and abundance in Bulgaria’, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(SUPPL. 2), pp. 262–266.

7. Anexos

Tabela 9 - Resumo do LMM com eliminação backwards stepwise das variáveis intrínsecas e metodológicas analisadas no conjunto de amostras de pelos de lobo Europeia

Modelo	Fórmula	Dados	AIC
completo	HCC ~ gender + age + body length + smi + population + (1 month) + death + hair length + weight hair + protocol + storage	Apenas amostras da região lombar	669.34
1	HCC ~ gender + age + body length + smi + population + (1 month) + death + hair length + weight hair + protocol + storage	Apenas amostras da região lombar, excluindo morte por doença crónica	558.57
2	HCC ~ gender + age + body length + smi + population + (1 month) + hair length + weight hair + protocol+ storage	Apenas amostras da região lombar, excluindo morte por doença crónica	554.32
3	HCC ~ gender + age + body length + smi + population + (1 month) + hair length + weight hair + protocol + storage	Apenas amostras da região lombar, excluindo morte por doença crónica e peso do pelo <20mg	547.25
4	HCC ~gender + age + body length + smi + population + (1 month) + hair length + protocol + storage	Apenas amostras da região lombar, excluindo morte por doença crónica e peso do pelo <20mg	546.37
5	HCC ~ gender + age + body length + smi + population + (1 month) + hair length + protocol	Apenas amostras da região lombar, excluindo morte por doença crónica e peso do pelo <20mg	544.96
6	HCC ~ gender + age + body length + smi + population + (1 month) + hair length	Apenas amostras da região lombar, excluindo morte por doença crónica e peso do pelo <20mg	544.43
7	HCC ~ gender + age + body length + smi + population + (1 month)	Apenas amostras da região lombar, excluindo morte por doença crónica e peso do pelo <20mg	548.51

Modelo	Fórmula	Dados	AIC
--------	---------	-------	-----

Anterior + (1 década)	HCC ~ gender + age + sub-population (1 month) + (1 decada)	Apenas amostras ibéricas, da região lombar, excluindo morte por doença crónica e peso do pelo <20mg	1104.034
-----------------------	--	---	----------

Tabela 10 - Resumo do LMM com eliminação backwards stepwise das variáveis intrínsecas e metodológicas analisadas no conjunto de amostras de pelos de lobos Ibéricos

Tabela 11 - Resumo do LMM com eliminação backwards stepwise das variáveis intrínsecas, metodológicas e ambientais analisadas no conjunto de amostras de pelos de lobos Ibéricos

Modelo	Fórmula	Dados	AIC
completo	HCC ~ gender + age + body length + smi + sub-population + (1 month) + hair length + built + crop + lights + water + pasture + popdens + rails + roads + alc + cn + cn_expl+ ruged + ung	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	403.41
1	HCC ~ gender + age + body length + smi + sub-population + (1 month) + hair length + built + crop + lights + water + pasture + popdens + rails + roads + alc + cn + cn_expl+ ruged	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	401.42
2	HCC ~ gender + age + body length + smi + sub-population + (1 month) + hair length + built + crop + lights + pasture + popdens + rails + roads + alc + cn + cn_expl+ ruged	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	397.50
3	HCC ~ age + body length + smi + sub-population + (1 month) + hair length + built + crop + lights + pasture + popdens + rails + roads + alc + cn + cn_expl+ ruged	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	395.50
4	HCC ~ age + body length + smi + sub-population + (1 month) + hair length + built + crop + lights + pasture + popdens + roads + alc + cn + cn_expl+ ruged	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	393.62
5	HCC ~ age + body length + smi + sub-population + (1 month) + hair length + built + crop + lights + pasture + popdens + roads + alc + cn + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	391.79
6	HCC ~ age + body length + smi + (1 month) + hair length + built + crop + lights + pasture + popdens + roads + alc + cn + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	389.15
7	HCC ~ age + body length + smi + (1 month) + hair length + built + crop + lights + pasture + popdens + roads + alc + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	387.16
8	HCC ~ age + body length + smi + (1 month) + hair length + built + crop + lights + pasture + roads + alc + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão	385.43

		conforme os resultados anteriores	
9	HCC ~ age + body length + smi + (1 month) + hair length + built + crop + lights + roads + alc + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	384.11
10	HCC ~ age + body length + smi + (1 month) + hair length + + crop + lights + roads + alc + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	382.67
11	HCC ~ age + body length + smi + (1 month) + hair length + lights + roads + alc + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	380.74
12	HCC ~ age + body length + smi + (1 month) + hair length + roads + alc + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	378.97
13	HCC ~ age + body length + smi + (1 month) + hair length + roads + alc	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	378.66
14	HCC ~ age + body length + (1 month) + hair length + roads + alc + cn_expl	Amostras ibéricas contemporâneas controladas para os fatores de confusão conforme os resultados anteriores	381.27