

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

- I. Uso de Gonadotropina Recombinante Aviária na estimulação gonadal de Tartaruga Comum (*Caretta caretta*)**
- II. Maneio Veterinário de Gravidez e Parto de Golfinhos Roaz (*Tursiops truncatus*)**

Inês Simões Gonçalves Perdigão Fernandes

Orientador

Prof.^a Alexandra Müller, PhD

Co-Orientadores

Dr. Daniel García Párraga (Oceanogràfic)

Dr. Francesco Grande (Zoomarine Italia S.p.A.)

Porto 2014

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

- I. Uso de Gonadotropina Recombinante Aviária na estimulação gonadal de Tartaruga Comum (*Caretta caretta*)**
- II. Maneio Veterinário de Gravidez e Parto de Golfinhos Roaz (*Tursiops truncatus*)**

Inês Simões Gonçalves Perdigão Fernandes

Orientador

Prof.^a Alexandra Müller, PhD

Co-Orientadores

Dr. Daniel García Párraga (Oceanogràfic)

Dr. Francesco Grande (Zoomarine Italia S.p.A.)

Porto 2014

RESUMO

O presente relatório insere-se no âmbito do estágio que decorreu no ano de 2014 entre os meses de Janeiro e Maio, tendo sido efetuado em dois locais distintos ao longo de dezasseis semanas.

O primeiro segmento realizou-se no Oceanogràfic, na Cidade das Artes e das Ciências em Valência, Espanha. Durante oito semanas foi possível integrar a equipa Veterinária que dá assistência aos mamíferos marinhos, aves aquáticas, répteis, e peixes (teleósteos e elasmobrânquios) do parque em todas as áreas relativas à saúde e bem-estar animal. Nesta instituição foi possível auxiliar os Médicos Veterinários nos variados procedimentos levados a cabo no dia-a-dia como rondas pelo parque para assessorar o estado de saúde dos animais, recolha de amostras biológicas para análise externa ou no laboratório do parque, terapêutica de animais enfermos, realização de necrópsias e preparação de medicações.

O segundo segmento realizou-se no Zoomarine Italia em Torvaianica, Roma, Itália. Num período de igualmente oito semanas foram desenvolvidas actividades semelhantes às anteriores embora fazendo uso de ferramentas e materiais diferentes. Para além de visitas às diversas áreas onde se encontram os animais, foram também efectuadas colheitas de amostras biológicas e desenvolvidas actividades no laboratório da clínica veterinária. Os animais do parque compreendiam mamíferos marinhos, aves de rapina, psitaciformes, e aves aquáticas.

Ambas as partes do estágio contribuíram para aumentar os conhecimentos de fisiologia, patologia médica, doenças parasitárias e infecciosas, farmacologia e terapêutica, manejo e profilaxia de espécies marinhas, aves e répteis. Também permitiram a observação de medidas que constituem os protocolos de prevenção de doenças mais utilizados em aquários/ parques aquáticos e os comportamentos médicos, para os quais os animais estão treinados, que permitem que os primeiros sejam eficazes.

ABREVIATURAS

- % - por cento
- $\mu\text{g/dl}$ – micrograma por decilitro
- EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético
- FSH – hormona foliculo-estimulante
- GnRH – hormona libertadora de gonadotrofina
- IUCN – International Unit for Conservation of Nature
- LH – hormona luteinizante
- mg/dl – miligrama por decilitro
- mg/kg – miligrama por kilograma
- mm/h – milímetro por hora
- ng/ml – nanograma por mililitro
- UFC – unidade formadora de colónia

ÍNDICE GERAL

I - Oceanogràfic.....	1
1. Introdução	1
2. Tartaruga comum	1
2.1. Ciclo de Vida	2
2.2. Anatomia do Sistema Reprodutivo	4
2.3. Fisiologia e Endocrinologia Reprodutiva	5
2.3.1. Fêmeas	5
2.3.2. Machos.....	7
3. Uso de Gonadotropina Recombinante Aviária na estimulação gonadal de tartaruga comum (<i>Caretta caretta</i>).....	7
3.1. Âmbito e Objetivos	7
3.2. Apresentação do Caso.....	8
3.3. Protocolo experimental	10
3.4. Resultados e seguimento.....	11
3.5. Discussão	13
4. Conclusão.....	14
II. ZOOMARINE ITALIA	15
1. Introdução	15
2. Golfinho-roaz	15
2.1. Anatomia do Sistema Reprodutivo	16
2.2. Fisiologia e Endocrinologia Reprodutiva	17
2.2.1. Fêmeas	17
2.2.2. Machos.....	18
3. Maneio Veterinário de gravidez e parto de Golfinhos Roaz (<i>Tursiops truncatus</i>) no Zoomarine Italia.....	19
3.1. Âmbito e Objetivos	19
3.2. Apresentação do Caso.....	19
3.3. Protocolo de seguimento de gravidez de <i>Tursiops truncatus</i> no Zoomarine Italia....	20
3.4. Resultados e Seguimento	23
3.5. Discussão	25
4. Conclusão.....	27
III. BIBLIOGRAFIA	28
IV. ANEXO.....	31

I - OCEANOGRÀFIC

1. INTRODUÇÃO

O Oceanogràfic, pertencente à Cidade das Artes e das Ciências de Valência, e concessionado à empresa Parques Reunidos é o maior aquário da Europa. Está dividido em três plantas, duas de acesso ao público e uma mais inferior onde circulam os funcionários do aquário e onde se situa a Quarentena de peixes e a Clínica Veterinária.

O Oceanogràfic é composto por sete edifícios distintos, nos quais estão representados alguns dos mais importantes ecossistemas do planeta: Mediterrâneo, Zonas húmidas, Mares Temperados e Tropicais, Oceanos, Antártico, Ártico, Ilhas e Mar Vermelho. Contém também o maior delfinário da Europa e um centro de recuperação de animais marinhos, a Área de Recuperación y Conservación de los Animales del Mar (ARCA del Mar).

Os seus edifícios contemporâneos, bem como a sua distribuição e grandiosidade estão pensados para que os visitantes vivam uma experiência única de íntimo contacto com a biodiversidade marinha existente nos nossos mares. Este aspeto arquitetónico juntamente com as atividades desenvolvidas no âmbito da conservação e proteção da fauna marinha têm como objetivo sensibilizar visitantes de todas as idades para a importância da sobrevivência destes ecossistemas.

No Oceanogràfic são efetuadas atividades educativas com alunos de diversas escolas no âmbito da preservação da flora e da fauna marinhas e executam-se palestras e exposições de variados temas. São ainda desenvolvidos projetos de investigação em colaboração com universidades e entidades nacionais e internacionais, bem como programas de reprodução de animais ameaçados.

Um dos projetos de investigação atualmente em desenvolvimento pela equipa Veterinária refere-se à reprodução de tartarugas marinhas *Caretta caretta* em cativeiro mediante estimulação hormonal, que será o tema central deste segmento do relatório de estágio.

2. TARTARUGA COMUM

Atualmente existem sete espécies de tartarugas marinhas, das quais quatro estão ameaçadas - Tartaruga Comum (*Caretta caretta*), Tartaruga-de-kemp (*Lepidochelys kempii*), Tartaruga de pente (*Eretmochelys imbricata*), e Tartaruga verde (*Chelonia mydas*) - duas são consideradas vulneráveis - Tartaruga-de-couro (*Dermochelys*

coriacea), e Tartaruga oliva (*Lepidochelys olivacea*), sendo que atualmente não há dados suficientes para definir o estatuto da Tartaruga de Carapaça Achatada (*Natator depressus*) que anteriormente era vulnerável (www.iucnredlist.org).

A tartaruga comum, *Caretta caretta* (Linnaeus 1758), tem uma grande cabeça com dois pares de escamas pré frontais. Possui duas garras em cada membro, e uma carapaça castanha que pode ser mais ou menos escura, com cinco ou por vezes quatro escamas laterais e na qual a escama nugal contacta com a primeira escama lateral (Figura 1). As características físicas das *Caretta caretta* vão-se alterando com a idade. Aquando da eclosão, estes animais têm a carapaça castanha com vários tons de cinzento e o plastrão amarelo pálido a castanho (Figura 1). Quando são juvenis observa-se uma



Figura 1. Tartaruga *Caretta caretta* recém eclodida e adulta (Wyneken et al. 2006)

sobreposição de escamas da carapaça que formam cristas e em adultas têm o aspeto inicialmente descrito neste parágrafo (Wyneken 2001). A sua distribuição engloba a zona tropical e subtropical dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico e do mar Mediterrânico (Wyneken *et al.* 2006).

2.1. CICLO DE VIDA

As tartarugas marinhas eclodem ao final da tarde ou durante a noite pois enquanto se mantiver o mecanismo de respiração anaeróbia e o estrato de areia que as cobre estiver mais quente do que aquele em que se encontram, a escavação é inibida. Quando começam a eclodir verifica-se uma estimulação mútua conhecida como facilitação social, em que a atividade exercida pelas tartarugas recém-eclodidas para saírem do ninho estimula a escavação e subida até à superfície pelas restantes (Miller 1997). Após a saída do ninho as tartarugas seguem em direção ao mar. Uma vez na água continuam a afastar-se do litoral durante um ou mais dias, podendo fixar-se em zonas de forrageamento de baixa profundidade ou ser arrastadas por correntes para alto mar (Dood 1988 cit. por Valente 2007) onde residem de cinco a vinte anos – “the lost years” (Miller 1997).

A idade à puberdade difere entre espécies mas calcula-se que seja entre quinze a vinte anos (Wyneken *et al.* 2006) e que tenha a duração de dez anos (Miller & Limpus 2003), podendo considerar-se vinte e cinco a cinquenta anos como a idade em que atingem a maturidade sexual. Os anos de vida de uma tartaruga marinha podem ser estimados através do seu peso e das medidas da sua carapaça (Wyneken *et al.* 2006), no entanto estas não são totalmente fiáveis pois os indivíduos não maturam todos com o mesmo tamanho (Hamann *et al.* 2003). Assim, pode-se fazer uso da laparoscopia para observar os órgãos internos e avaliar a maturidade e o estado reprodutivo dos animais (Limpus 1992 cit. por Miller & Limpus 2003).

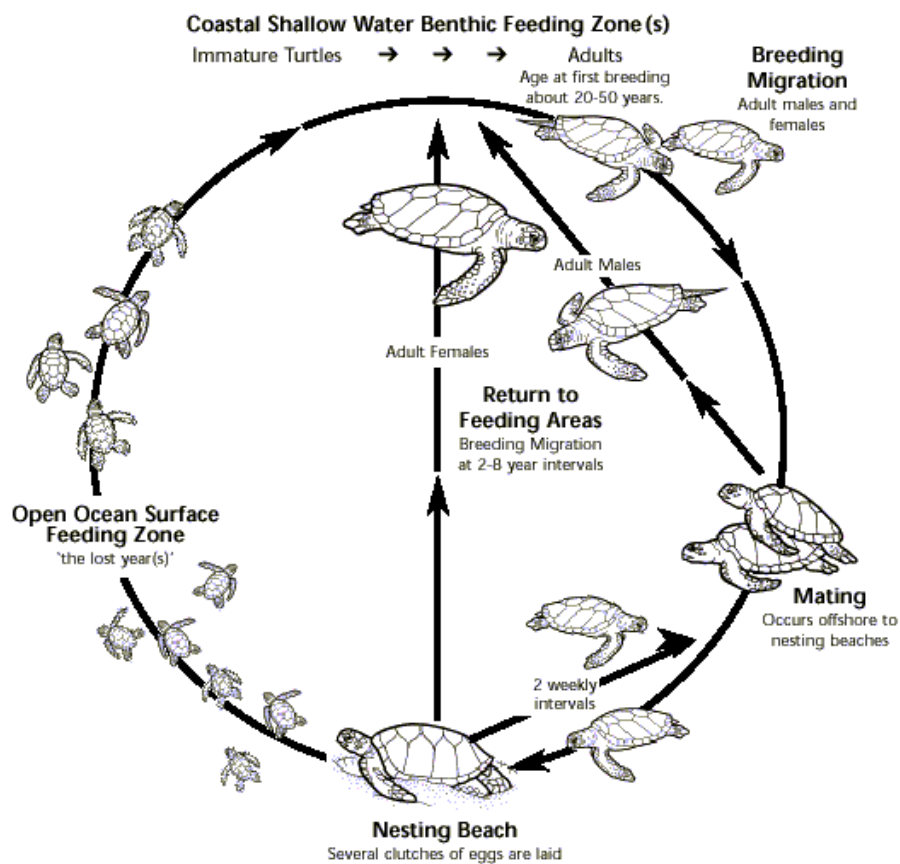


Figura 2: Ciclo de vida das Tartarugas Marinhas (www.gbrmpa.gov.au).

Quando atingem a maturidade sexual e chega a primavera, as tartarugas comuns do Mediterrâneo adultas migram da sua área de forrageamento para a área de acasalamento (Miller 1997). A área de acasalamento é geralmente na vizinhança dos locais de postura e é onde várias fêmeas copulam com diversos machos, durante uma média de vinte e cinco horas (Hamann *et al.* 2003). No final do período de acasalamento, que se verifica um a dois meses antes da primeira postura, os machos retornam à área de forrageamento e as fêmeas seguem para a área de cria na região da praia onde nasceram (Figura 2). Aí efetuam várias posturas durante a noite com

intervalos de dez a quinze dias. O número estimado de posturas durante uma época reprodutiva é de quatro, sendo postos em média cento e doze ovos em cada uma delas. As diversas posturas são efetuadas em locais próximos (até cinco quilômetros). Os ovos são depositados em praias com areia relativamente solta e com poucos detritos, onde podem ser incubados entre seis e treze semanas num ambiente com baixa salinidade, alta humidade, boa ventilação e onde não corram o risco de serem inundados.

No final da época de postura as fêmeas voltam para a área de forrageamento e começam a preparar-se para a sua próxima época reprodutiva, que poderá ocorrer dois a nove anos depois – reprodução iterópara. Este período entre épocas de postura depende do tempo necessário ao indivíduo para recuperar a energia despendida na última época reprodutiva e armazenar reservas energéticas que irão posteriormente ser utilizadas na vitelogénese e em todo o processo de migração, corte e acasalamento. Por terem menores gastos energéticos que as fêmeas, os machos têm maior probabilidade de se reproduzir todos os anos ou a cada dois. O referido intervalo de tempo pode ainda estar regulado pela quantidade e qualidade de comida disponível na área de forrageamento (Miller 1997).

2.2. ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTIVO

As gónadas de ambos os sexos são pares e estão localizadas dorsalmente na cavidade celómica, imediatamente caudais aos pulmões e ventrais aos rins.

As fêmeas possuem ovários (Figura 3), ovidutos que correm lateralmente aos ovários e que não estão fisicamente conectados aos mesmos e duas papilas genitais que se localizam na cloaca. Estruturalmente os ovidutos podem ser segmentados em cinco regiões: o óstio ou infundíbulo (abertura em forma de funil), o segmento aglandular, o magnum, o segmento de deposição da casca e a porção final do oviduto. O aspeto e a organização estrutural dos ovários e dos ovidutos diferem consoante a idade do animal e se está em época reprodutiva. Se as fêmeas maduras estiverem sexualmente inativas o oviduto aparece enrolado, enquanto se estiverem ativas está desenrolado e possuem nos ovários folículos aumentados de tamanho com deposição de gema.



Figura 3: Ovários de tartaruga verde imatura (Wyneken 2001).

Os machos possuem testículos fusiformes, epidídimos que correm lateralmente aos testículos (Figura 4) e canais deferentes que conduzem os espermatozoides desde os



Figura 4: Testículos e epidídimos de tartaruga verde imatura (Wyneken 2001).

epidídimos até à base do pénis. O pénis não faz parte do sistema urinário e pode ter um gancho distalmente (Hamann *et al.* 2003). Quando ereto, o pénis preenche os seus dois corpos cavernosos com sangue, formando o sulco uretral, um tubo que permite a passagem do esperma e fluidos adjacentes. Em machos sexualmente ativos os testículos têm de comprimento duas vezes o valor do seu diâmetro e estão preenchidos com esperma. O pénis está sempre retraído na cloaca exceto durante a cópula.

2.3. FISIOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA

2.3.1. FÊMEAS

Época não Reprodutiva

Estima-se que, sete a nove meses antes da época reprodutiva, fatores exógenos como o aumento do fotoperíodo e da temperatura (Valente 2011) e endógenos, como o limiar energético determinado geneticamente, que estipula o acúmulo de energia a partir da alimentação (Hamann *et al.* 2003), levem ao aumento de estrogénio na corrente sanguínea (Valente 2011), hormona que estimula a vitelogénese (Wibbels 1990). Infere-se também que a testosterona e a corticosterona podem ter um papel na mobilização de lípidos, hidratos de carbono e proteínas, para deposição na gema, e que a corticosterona pode atuar como co-hormona do estrogénio (Whittier 1997).

A vitelogénese é o processo de deposição de proteínas e lípidos em oócitos em crescimento para formar a gema do ovo (Guraya 1989 cit. por Hamann *et al.* 2003). Durante este processo, o estrogénio produzido pelos folículos ováricos estimula a produção de vitelogenina (Ho 1987 cit. por Hamann *et al.* 2003), uma proteína produzida no fígado, que faz parte de um complexo lipoproteico, cuja função é transportar lípidos pelo plasma até ao ovário (Heck *et al.* 1997 cit. por Hamann *et al.* 2003). Neste período de vitelogénese além da elevação do estrogénio verificaram-se valores superiores de corticosterona, testosterona, adrenalina, triglicerídeos, (Hamann *et al.* 2003), colesterol total, proteínas totais, albumina, e do rácio cálcio/fósforo (Kakizoe 2013).

Migração, Corte e Acasalamento

Quatro a seis semanas antes da migração os níveis circulantes de testosterona aumentam, o valor mínimo de testosterona reportado é 8×10^{-3} ng/ml e o máximo

32×10^{-2} ng/ml (Wibbels 1990). Os níveis de estrogénio estão elevados desde o início da vitelogenese, mas só quando se verifica uma diminuição do estrogénio circulante e um maior aumento de testosterona é que se inicia a migração (Wibbels 1990).

A corte e o acasalamento iniciam-se quando há um pico de testosterona, que depois vai diminuindo ao longo da época de postura (Wibbels 1990). No início da época de acasalamento verificou-se também um aumento dos níveis de tiroxina em machos e fêmeas (Valente 2011).

No final do acasalamento a concentração de estrogénio e de vitelogenina diminui e estão presentes elevados valores de testosterona, corticosterona, adrenalina e triglicéridos. Nesta altura observam-se folículos de tamanho e desenvolvimento máximos (Hamann *et al.* 2003).

Ovulação e Postura

A primeira ovulação ocorre aproximadamente catorze dias antes da primeira postura. A ovulação seguinte ocorre quarenta e oito horas após a postura, e assim sucessivamente durante toda a época de cria (Owens 1997). A ovulação coincide com picos de LH e FSH e com simultâneos decréscimos de testosterona plasmática (Wibbels 1992). Os valores de testosterona vão diminuindo ao longo da época de postura atingindo valores basais na última deposição da temporada. Por este motivo pensa-se que a testosterona é produzida pelos folículos maduros (Owens 1997).

Após a ovulação, o corpo lúteo, em resposta à LH, produz progesterona. Considera-se que a progesterona estimula a produção e deposição de albumina e que inibe temporariamente o desenvolvimento folicular e a ovulação do conjunto de folículos que irão constituir a ninhada seguinte (Hamann *et al.* 2003 & Owens 1997). Quando o corpo lúteo cessa a produção de progesterona, designa-se *Corpus albicans*. Os vários corpos lúteos regridem durante o período de postura, de forma que no final da época reprodutiva sejam evidentes *Corpus albicans* de vários tamanhos nos ovários (Hamann *et al.* 2003).

Durante a postura, a neurohipófise liberta arginina vasotocina, e neurofisina. A primeira é uma molécula que aumenta a contractilidade do oviduto e que pode levar à síntese de prostaglandina F que tem igual função. A segunda molécula tem efeito protetor sobre a arginina vasotocina no seu trajeto desde o cérebro até ao oviduto (Owens 1997).

2.3.2. MACHOS

Época não Reprodutiva

Os machos de tartaruga comum do Mediterrâneo têm, durante o inverno e o início da primavera (Owens 1997), um aumento de testosterona com valores referidos de 0 a 8 ng/ml (Wibbels 1990), que coincide com um padrão espermatogénico pré-nupcial. O esperma é produzido e armazenado no epidídimo, até ao acasalamento (Wibbels 1990). No epidídimo os espermatozoides sofrem uma maturação final que lhes proporciona capacidade fertilizante e mobilidade (Hamann *et al.* 2003).

A espermatogénese compreende apenas um ciclo que dura nove meses, com intervalos entre ciclos de dois a três meses. Começa na época não reprodutiva e termina antes de se iniciar a corte (Hamann *et al.* 2003), tendo o seu pico de produção durante a migração (Miller & Limpus 2003).

Migração, Corte e Acasalamento

Os machos têm o pico de testosterona antes das fêmeas e por essa razão começam a migração antes destas (Owens 1997), sendo que esta hormona continua elevada durante os períodos de migração corte e acasalamento. Foi demonstrado que injeções de testosterona estimulavam a monta, sugerindo assim que esta hormona pode ter um papel nestes eventos (Owens 1956 cit. por Wibbels 1990).

A época de acasalamento termina quando há uma diminuição da condição corporal (Hamann *et al.* 2003), retornando os machos às zonas de forrageamento (Miller 1997).

3. USO DE GONADOTROPINA RECOMBINANTE AVIÁRIA NA ESTIMULAÇÃO GONADAL DE TARTARUGA COMUM (*CARETTA CARETTA*)

3.1. ÂMBITO E OBJETIVOS

Dado o estatuto de ameaça da tartaruga comum e o facto de haver vários arrojamentos desta espécie de tartarugas na costa Valenciana foi elaborado o presente projeto de investigação, desenvolvido em duas fases. O seu sucesso permitirá a introdução de novos elementos no seu habitat natural e poderá aumentar a sua probabilidade de sobrevivência, que é bastante baixa, podendo eventualmente a longo prazo reverter-se o estatuto de ameaça que esta espécie possui.

É bastante difícil reproduzir as condições ideais para que haja reprodução de tartarugas marinhas em cativeiro, tendo sido apenas conseguido no Port of Nagoya Public Aquarium, no Japão e em Antibes em França. Pensa-se que fatores exógenos

como o aumento do fotoperíodo e da temperatura (Valente 2011) e endógenos, como o limiar energético determinado geneticamente, que estipula o acúmulo de energia, a partir da alimentação (Hamann *et al.* 2003), contribuam para o início da época reprodutiva. No entanto, pode haver outros fatores como o efeito macho, a passagem por águas mais frias durante a migração ou a junção dos fatores supracitados de determinados modos que desencadeiem o início da época reprodutiva (José Luís Crespo, Oceanogràfic, comunicação pessoal).

O objetivo deste estudo é induzir e manter o ciclo reprodutivo de uma fêmea adulta de tartaruga comum, fazendo uso de gonadotropina recombinante aviária, produzida e fornecida pela empresa Rara Avis Biotec S.L, de nome comercial Rara Avis 1. Esta hormona foi previamente testada, pela empresa fornecedora, *in vitro* e *in vivo*, e conseguiu fechar com êxito os ciclos reprodutivos de diferentes espécies de aves (José Luís Crespo, Oceanogràfic, comunicação pessoal). Como pressupostos têm-se a proximidade filogenética entre aves e répteis (Chiari *et al.* 2012), poucas diferenças na estrutura da hormona folículo estimulante entre estes dois grupos de animais (Licht & Gallo 1978) e a resposta positiva em ensaios com tartarugas de orelhas vermelhas (*Trachemys scripta elegans*) conseguida pela empresa Rara Avis Biotec S.L. (José Luís Crespo, Oceanogràfic, comunicação pessoal).

3.2. APRESENTAÇÃO DO CASO

Deu entrada no centro de recuperação ARCA del Mar em 2007 uma fêmea adulta da espécie *Caretta caretta*, sem o terço posterior da carapaça possivelmente devido a trauma sofrido no seu habitat natural, que será denominada neste documento como fêmea 63. Foi posto em prática o protocolo de admissão utilizado no centro de recuperação de modo a avaliar o estado de saúde do animal. Este consiste em inspeção visual do animal, realização de radiografias uma vez que poderia ter outros sinais de trauma internos; ecografia pela razão anterior e porque muitas das tartarugas são arrastadas pelas redes de pesca a grandes velocidades e possuem sinais ecográficos de embolia gasosa; e colheita e análise de sangue – hemograma completo, perfil bioquímico renal e hepático (consultar Anexo). Os resultados da analítica sanguínea são importantes para complementar a avaliação do estado de saúde do animal, que não é fácil de efetuar apenas com exploração macroscópica. Assim, mediante as alterações observadas nos parâmetros sanguíneos poderá efetuar-se uma terapêutica adequada. Como a lesão traumática já se apresentava completamente cicatrizada e não se

verificaram alterações nos exames complementares efetuados, o animal seguiu para as instalações da ARCA del Mar, onde ficou alojado com outras tartarugas que estavam em recuperação. Em 2013 deu entrada no centro de recuperação ARCA del Mar uma outra fêmea adulta da espécie *Caretta caretta* que será denominada neste documento como fêmea 75. Foi posto em prática o protocolo de admissão utilizado no centro de recuperação e como não se verificaram alterações nos exames complementares seguiu para as instalações do centro de recuperação.

As tartarugas são mantidas num edifício parcialmente aberto nas faces laterais, se possível isoladas em tanques circulares com profundidade estimada de um metro e vinte, em que a água ronda os vinte e cinco graus Celsius e tem fluxo contínuo. Cada tanque tem a sua própria fonte de luz halogenada, que constitui a simulação da variação do fotoperíodo a que os animais estão sujeitos durante o ano (aproximadamente dez horas no inverno e catorze no verão, aumentando e decrescendo progressivamente) e também possuem meio vaso de cerâmica pousado no fundo do tanque que funciona como esconderijo (Figura 5).

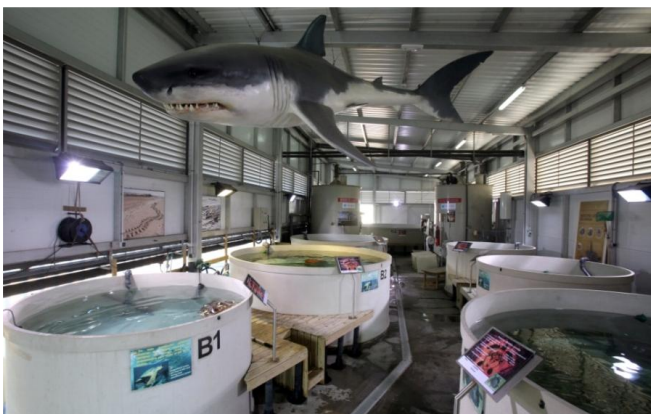


Figura 5: Instalações da ARCA. Imagem gentilmente cedida pelo Oceanográfico.

animal é maior/mais velho ou mais pequeno/jovem, respetivamente. Deste modo, a fêmea 63 e a fêmea 75 eram alimentadas com aproximadamente dois quilos e quatrocentos gramas de gelatina três vezes por semana.

A fase 1 do projeto consistiu na aplicação do protocolo experimental à fêmea 63 em Setembro de 2011 com respetiva obtenção de resultados. A fase 2 consistiu na aplicação do mesmo protocolo experimental à fêmea 75 em Novembro de 2013. A estudante participou no início da fase 2 do protocolo que consistiu no seguimento ecográfico e da analítica sanguínea, e injeção da gonadotropina recombinante aviária na fêmea 75. Como durante o estágio a fase 2 do protocolo de estimulação gonadal tinha

A sua alimentação é à base de uma gelatina constituída por arenque, lula, gambas, espinafres e cenoura e comem um caranguejo por semana como método de enriquecimento ambiental. A quantidade de alimento a fornecer varia entre dois e cinco por cento do peso do animal, consoante o

apenas sido iniciada não serão apresentados os respectivos resultados pois estes não seriam representativos da mesma.

3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Em Setembro de 2011 foi injetada durante oito meses, cada quarenta e oito horas por via intramuscular, FSH recombinante produzida e fornecida pela empresa Rara Avis Biotec S.L. de nome comercial Rara Avis 1, na fêmea 63, em diferentes concentrações não divulgadas à aluna. A concentração da hormona foi-se ajustando de acordo com os valores de colesterol, triglicéridos e estradiol sanguíneos observados, até se encontrar uma concentração mínima de hormona que estimulasse o aumento de tais parâmetros indicativos de vitelogénese (Hamann *et al.* 2003 e Kakizoe 2013).

Foram feitas recolhas de sangue, três mililitros do seio cervical dorsal, em tubos de heparina, fazendo uso de uma seringa de cinco mililitros e uma agulha de vinte e um Gauge, para efetuar medições do estradiol sanguíneo através de radioimunoensaio em laboratório externo, a partir do plasma heparinizado. As medições foram efetuadas inicialmente todas as semanas e posteriormente cada quinze dias uma vez que no intervalo de tempo de uma semana não se verificaram alterações significativas do valor de estradiol sanguíneo. Foram também efetuados a partir das mesmas amostras de sangue controlos hematológicos semelhantes aos descritos no ponto 3.2. deste documento. Os valores de analítica sanguínea permitem complementar a avaliação do estado de saúde geral do animal durante o período do estudo. Paralelamente controlou-se o bem-estar do animal, observando-se os padrões de conduta, movimento e alimentação. Estes controlos analíticos e de bem-estar do animal são bastante importantes para o projeto pois a alteração de algum ou alguns dos parâmetros avaliados poderia relacionar-se com a presença de alguma patologia que poderia alterar os resultados do estudo tornando-o inconclusivo.

Durante o mesmo período foi feito um seguimento ecográfico da cavidade celómica da fêmea 63 para examinar o desenvolvimento do seu sistema reprodutivo. No final deste período foi efetuada uma radiografia para avaliar a presença ou ausência de ovos no seu oviduto.

Com o intuito de efetuar cópula/ inseminação artificial no final do período de estimulação, foi cedido por tempo limitado um macho adulto de tartaruga comum do Zoo Aquarium de Madrid. Seguindo o mesmo método de recolha e análise sanguíneas anteriormente descritas para avaliação de estradiol na fêmea 63 mediu-se o nível de

testosterona sanguínea do macho. Foram levadas a cabo tentativas de recolha de sémen, para efetuar a sua avaliação e foi apreciada a consistência medial do plastrão. A recolha de sémen foi feita através de lavagem cloacal com solução fisiológica, resultando na externalização do pénis ereto e recolha de líquido com agregados de material branco que se identificaram ao microscópio ótico como agregados de espermatozoides. Tentou-se efetuar a fertilização dos óvulos através de monta natural, no entanto as várias tentativas de monta não foram efetivas pois não houve introdução do pénis na cloaca da fêmea 63. Posteriormente foi efetuada inseminação artificial. Esta técnica foi executada com o auxílio de um endoscópio, que permitiu a visualização das papilas genitais no interior da cloaca da fêmea 63 e deposição nesse local do material recolhido imediatamente antes do macho por lavagens cloacais (José Luís Crespo, Oceanogràfic, comunicação pessoal). Em Novembro de 2013 foi iniciada a estimulação hormonal já descrita neste documento, na fêmea 75 fazendo uso das mesmas técnicas, frequências e materiais de injeção da hormona Rara Avis 1, colheita de sangue e seguimento ecográfico.

3.4. RESULTADOS E SEGUIMENTO

Aquando da análise das amostras sanguíneas da fêmea 63, verificou-se um aumento progressivo das concentrações plasmáticas de estradiol (Figura 6) desde Setembro de 2011. Em Dezembro de 2011 houve elevação dos valores plasmáticos de triglicérides e colesterol e não foram observadas alterações patológicas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados, bem como no comportamento. As imagens ecográficas, do mesmo animal apresentavam em Janeiro de 2012 os ovários em forma

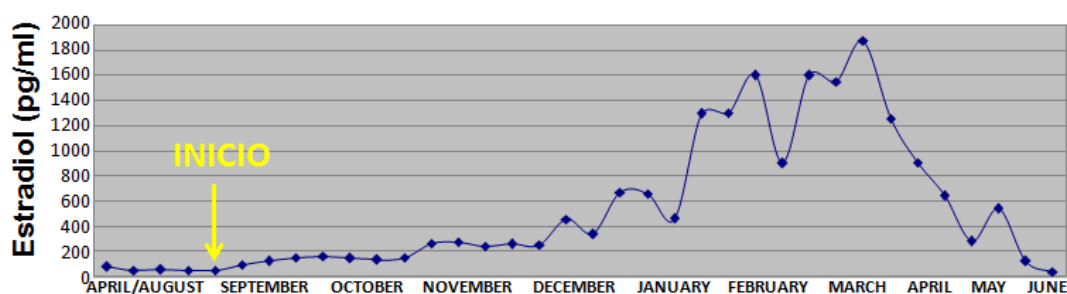


Figura 6: Valor de estradiol sanguíneo avaliado durante os oito meses. Imagem gentilmente cedida pelo Oceanogràfic.

de cacho de uva com óvulos de estrutura normal, crescimento folicular regular em diferentes grupos de folículos, folículos de maior tamanho com bandas ovulatórias,

ovulação em grupo de folículos de maiores dimensões e oviduto desenrolado (Figura 7). Na radiografia efetuada não se verificou a presença de ovos no oviduto do animal.

No macho visualizaram-se por ecografia os testículos com comprimento aproximado de 8 centímetros (Figura 8) e verificaram-se elevados níveis sanguíneos de testosterona, não divulgados à estudante, morfologia espermática normal e amolecimento medial do plastrão.



Figura 7: Achados ecográficos descritos na fêmea *C. caretta*. Imagens gentilmente cedidas pelo Oceanográfico.

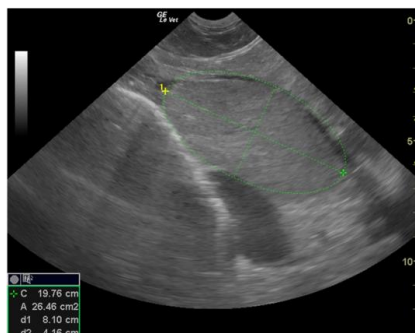


Figura 8: Dimensões testiculares do macho *C. caretta*. Imagem gentilmente cedida pelo Oceanográfico

Em Outubro de 2012, três meses após a conclusão do estudo, a tartaruga 63 desenvolveu sinais de septicemia severa como prostração, anorexia, anemia, leucocitose severa e apresentava heterófilos com sinais de citotoxicidade no esfregaço sanguíneo. Dada a gravidade do processo e tendo em conta que o animal já tinha sofrido um trauma que

levou a sequelas significativas optou-se por efetuar eutanásia. Quando se fez a necropsia do animal verificaram-se aderências do oviduto às estruturas adjacentes e a presença de centenas de folículos desenvolvidos nos ovários.

3.5. DISCUSSÃO

O aumento de estradiol, triglicerídeos e colesterol plasmáticos da fêmea 63 foram concordantes com o esperado durante a vitelogénese (Hamann *et al.* 2003 & Kakizoe 2013). Os valores da analítica sanguínea indicam que o animal era saudável. Assim consideram-se os resultados analíticos indicativos de vitelogénese reais pois não sofreram influência de patologias concomitantes.

As imagens ecográficas da cavidade celômica da fêmea 63 foram compatíveis com folículos em fase de crescimento pois apresentavam os ovários em forma de cacho de uva com óvulos de estrutura normal e crescimento folicular regular em diferentes grupos de folículos; e também com fenómenos de ovulação, uma vez que se apresentavam folículos de maior tamanho com bandas ovulatórias que indicam ovulação de folículos de maiores dimensões e oviduto desenrolado. Estes resultados ecográficos eram esperados tendo em conta os elevados valores de estrogénio plasmático – hormona que estimula a foliculogénese - e apoiam fortemente a hipótese de haver suscetibilidade das tartarugas marinhas *Caretta caretta* à estimulação gonadal utilizando a hormona folículo estimulante recombinante Rara Avis 1.

Na radiografia efetuada no final do período de estimulação não se visualizaram ovos no oviduto e posteriormente não se presenciou a deposição de ovos devido a aderências no lúmen do oviduto. As aderências no oviduto não foram observadas por ecografia possivelmente devido à grande extensão do órgão, entre 4 e 5 metros (Hamman *et al.* 2003) e ao limitado alcance de profundidade do equipamento ecográfico. Estas aderências foram apenas visualizadas durante a necropsia e provavelmente tiveram origem na lesão traumática que a tartaruga sofreu no seu habitat natural. Devido à falta de produção e postura de ovos não foi possível tirar conclusões acerca do sucesso das tentativas de fertilização efetuadas. As montas naturais visualizadas não foram efetivas devido à alteração da funcionalidade da cloaca - sequela do trauma sofrido na Natureza. A técnica de inseminação artificial utilizada foi semelhante à utilizada para outros répteis (Zacariotti 2008), uma vez que não está descrita para tartarugas marinhas. Relativamente ao seguimento da fêmea 63, pensa-se que durante a estimulação hormonal e a consequente ovulação possa ter havido rutura

de adesões do oviduto e de abscessos aí localizados desde o trauma sofrido no terço posterior do corpo, no estado selvagem. Assim, dada a impossibilidade de formar os ovos, a gema seria o meio para o crescimento bacteriano que culminaria em septicemia. Esta fêmea de tartaruga comum não seria a candidata ideal para aplicar o protocolo de estimulação hormonal anteriormente descrito pela razão supracitada, no entanto foi a fêmea escolhida pois não se sabia da existência das adesões e era o único animal irrecuperável no centro, que por essa razão permaneceria aí tempo indeterminado.

No macho visualizaram-se por ecografia os testículos com dimensões indicativas de maturidade reprodutiva (Pease *et al.* 2010). Foram observados elevados níveis de testosterona (José Luís Crespo, Oceanográfico, comunicação pessoal) não divulgados à estudante, que eram esperados devido à faixa etária do animal e ao crescente fotoperíodo (Owens 1997), e que levam ao aparecimento de caracteres sexuais secundários como o amolecimento medial do plastrão que também foi verificado. Estas características juntamente com a morfologia espermática normal observada corroboram a ideia de que o macho se encontrava em época reprodutiva. O método utilizado para a recolha de sémen apesar de não estar descrito, foi o utilizado uma vez que a única técnica descrita de recolha de sémen em tartarugas marinhas é a eletroejaculação (Manita *et al.* 2009) que não foi efetuada neste estudo devido à falta da sonda rectal.

O protocolo de estimulação hormonal utilizado obteve os resultados esperados, podendo concluir-se que a metodologia foi bem-sucedida. No entanto, os aspetos que se poderiam melhorar são a utilização de eletroejaculação como método padrão de recolha de sémen; descrição dos parâmetros e respetivos valores obtidos ao longo do tempo na avaliação do sémen dos indivíduos que participem no estudo; avaliação mais exaustiva do trato reprodutivo das fêmeas de modo a identificar possíveis alterações anatómicas; e a utilização de um maior número de exemplares nos quais aplicar o protocolo de estimulação hormonal.

4. CONCLUSÃO

Apesar de não ter havido postura de ovos devido a lesões no oviduto resultantes do trauma sofrido pelo animal no seu habitat natural considera-se que o protocolo de estimulação com gonadotropina recombinante aviária utilizado na fêmea 63 foi efetivo uma vez que houve crescimento e ovulação de folículos maduros. Assim, será necessário efetuar um novo estudo em animais sem alterações anatómicas estruturais de modo a

que se possa confirmar o encerramento do seu ciclo reprodutivo em cativeiro, que será uma importante ferramenta de apoio em programas de conservação.

Em termos gerais serão necessários estudos no âmbito da reprodução em cativeiro de *Caretta caretta*. Deverão aprofundar-se conhecimentos na área de colheita e avaliação de sémen de tartarugas marinhas, e na área de fertilização.

II. ZOOMARINE ITALIA

1. INTRODUÇÃO

O Zoomarine Italia é um parque temático de entretenimento educativo situado em Torvaianica, Roma, Itália. Nele existem áreas de entretenimento como o cinema 4D, piscinas, aquaparque e áreas zoológicas como a Ilha dos Golfinhos, a Baía dos Pinípedes, a Floresta dos Papagaios, a Planície das Aves de Rapina e a Caminhada pelos Lagos onde residem as aves aquáticas. As áreas zoológicas estão inseridas num contexto paisagístico característico da zona Mediterrânica, o que contribui para a disposição e inserção harmoniosa dos habitats no parque. O Zoomarine Italia também possui, numa zona de acesso restrito ao público o edifício administrativo e a Clínica Veterinária.

No parque são desenvolvidas atividades de educação ambiental de modo a alertar os visitantes para a biodiversidade de espécies e ameaças existentes à sua conservação, fomentando nos mesmos uma postura de respeito e proteção dos animais. Também se realizam projetos de investigação e divulgação científica em colaboração com diversas universidades. Todos os animais do parque nasceram noutros parques em ambiente controlado, o que permite obter informações exatas a seu respeito e consequentemente chegar a conclusões isentas de influências externas nos trabalhos de investigação levados a cabo.

2. GOLFINHO-ROAZ

O Golfinho-roaz (*Tursiops truncatus*) é uma das espécies pertencentes à família Delphinidae mais comumente apresentadas em delfinários (Robeck *et al.* 2001) e está categorizado como espécie pouco preocupante em termos de extinção (www.iucnredlist.org). Esta espécie de golfinho tem o corpo fusiforme e robusto, o rosto curto, a barbatana dorsal proeminente e a sua coloração é cinzenta com o ventre mais claro (www.marinemammalscience.org).

2.1. ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTIVO

Os dois sexos podem distinguir-se através da observação externa devido à distinta configuração da fenda genital que possuem ventralmente na parte caudal do abdómen (Figura 9). Os machos possuem duas fendas genitais alinhadas, uma cranial e outra caudal que correspondem à localização do pênis e do reto



Figura 9. Fendas genitais de um macho (esquerda) e uma fêmea de Golfinho-roaz. Imagens gentilmente cedidas pelo Zoomarine Italia.

respetivamente. As fêmeas têm uma fenda genital mais longa que possui no seu interior a abertura vaginal cranialmente e a do reto caudalmente. De cada lado da fenda genital, as fêmeas possuem uma fenda mais curta onde se localizam os mamilos (Geraci & Lounsbury 1993).

As fêmeas possuem no seu trato reprodutivo, ovários, trompas de falópio e cornos uterinos pares, corpo uterino e vagina. Os ovários são estruturas alongadas, pequenas e sólidas localizadas dorsolateralmente no abdómen, num ângulo formado pelos músculos lombar hipaxial e o reto abdominal a uma distância variável da fenda genital (Rommel & Lowenstine 2001). As estruturas presentes no ovário podem fornecer informação sobre a história reprodutiva individual (Boyd *et al.* 1999 cit. por Robeck *et al.* 2001), pois os *Corpus albicans* resultantes de gestações permanecem no ovário de fêmeas maduras (Robeck *et al.* 2001). O corpo do útero localiza-se na linha média do abdómen dorsalmente à bexiga.

Os machos possuem testículos intra-abdominais, epidídimos e canais deferentes pares, pênis e próstata. Os testículos são elípticos, alongados, possuem uma túnica externa (Brook *et al.* 2000) e situam-se no abdómen caudal, na metade inferior do aspeto lateral do animal. O tamanho testicular aumenta consideravelmente durante a maturação sexual e não regride de acordo com nenhum padrão de reprodução sazonal (Rommel & Lowenstine 2001). Estes animais possuem também um mecanismo vascular de contra-corrente para diminuir temperatura testicular (Pabst *et al.* 1995). O pênis é fibroelástico, possui uma flexura sigmoide que desaparece durante a ereção e está normalmente retraído na cavidade abdominal (Rommel & Lowenstine 2001).

2.2. FISIOLOGIA E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA

2.2.1. FÊMEAS

As fêmeas atingem a maturidade sexual entre os sete e os dez anos de vida, geralmente mais cedo que os machos. São poliéstricas sazonais (Kirby & Ridgway 1984, Robeck *et al.* 1994, Robeck 2000 cit. por Robeck *et al.* 2001), desde a primavera até ao outono, embora a sazonalidade reprodutiva possa variar com a sua origem geográfica (Urian *et al.* 1996 cit. por Robeck *et al.* 2005). O seu ciclo éstrico varia entre vinte e um e quarenta e dois dias (Sawyer-Steffan & Kirby 1980, Kirby & Ridgway 1984, Shroeder 1990 cit. por Robeck *et al.* 2001) e ocorrem períodos de anestro não associados à gravidez ou à lactação (Brook 1997 cit. por Robeck *et al.* 2001).

O aumento do fotoperíodo leva à libertação de melatonina pela glândula pineal e à produção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo que leva à produção de FSH e LH. No início da fase folicular há um aumento de FSH que leva ao recrutamento e crescimento de folículos e ao aumento de recetores de LH na teca dos mesmos. À medida que os folículos crescem há interação parácrina entre as células da teca e da granulosa, o que leva à produção de estrogénio. O estrogénio inibe inicialmente a FSH e a LH mas quando atinge o seu pico na fase pré-ovulatória estimula uma maior produção de GnRH que origina o pico pré-ovulatório de LH. Estão descritos valores de 5,4ng/ml e 71ng/ml para o pico de estrogénio e LH respetivamente (Robeck TR *et al.* 2005). Dos folículos recrutados apenas um se identifica como folículo pré-ovulatório quando possui em média vinte milímetros (Brook 1997 cit. por Robeck *et al.* 2001 e Robeck *et al.* 2005). A LH leva à produção de inibina pelo folículo pré-ovulatório, que é uma glicoproteína que inibe a FSH e aumenta a sensibilidade das células da teca à LH (Robeck *et al.* 2001). A ovulação ocorre espontaneamente (Wells & Scott 1999, Sawyer-Steffan *et al.* 1983, Schneyer *et al.* 1985, Brook 2001) após o pico de LH e mais 68% das vezes tem origem no ovário esquerdo (Ohsumi 1964, Harrison & Ridgway 1971, cit por Robeck *et al.* 2001 e Robeck *et al.* 2005).

Após a ovulação as células da teca e da granulosa transformam-se em células lúteas produtoras de progesterona, originando o corpo lúteo. Foram referidas concentrações de progesterona superiores a 3ng/ml (Sawyer-Steffan *et al.* 1983) que diminuem a libertação de GnRH e conseqüentemente de FSH e LH. No final da fase lútea, que tem duração média de 19 dias (Robeck *et al.* 2005), a neurohipófise e o corpo lúteo libertam ocitocina que leva à diminuição da progesterona – foram referidas

concentrações inferiores a 1ng/ml (Sawyer-Steffan *et al.* 1983). Esta diminuição leva ao aumento da frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (Robeck *et al.* 2001), iniciando-se um novo ciclo de aproximadamente trinta dias (Brook 2000 cit. por Robeck *et al.* 2005). Apenas permanecem no ovário os *Corpus albicans* que resultaram de uma gravidez e por isso a forma do ovário pode variar ligeiramente (Harrison 1969, Marsh & Kasuya 1984, Perrin & Reilly 1984 cit. por Robeck 2001 e Brook 2002).

A gestação dura doze meses, a placenta é epiteliocorial e difusa. O feto ocupa apenas o corno uterino ipsilateral ao ovário que ovulou mas quando aumenta de tamanho, a sua cauda pode estender-se até ao outro corno uterino (placentation.ucsd.edu/dolph.html).

Os sinais que antecedem o parto são descargas de leite, descargas vaginais, diminuição de apetite, diminuição da temperatura retal e fortes contrações (Robeck *et al.* 2001). Os partos ocorrem maioritariamente no Verão, com nascimento de apenas um animal (placentation.ucsd.edu/dolph.html) e possuem três fases. A primeira fase consiste em contrações e distensões abdominais de diferentes graus de intensidade (1, 2 e 3) e na abertura do cérvix. A segunda fase consiste na expulsão do feto que em 98% das vezes está em apresentação posterior, e a terceira fase constitui a expulsão da placenta (Robeck *et al.* 2001). O mecanismo de controlo do parto em cetáceos é desconhecido, no entanto pensa-se que haverá interação de hormonas produzidas pelo eixo feto-placenta-útero, como estrogénio, progesterona, hormonas adrenais, ocitocina, relaxina e prostaglandinas (Robeck *et al.* 2001).

A lactação mantém-se em média dois anos. O intervalo entre partos é de três a quatro anos pois a sucção efetuada pela cria quando se alimenta diminui a secreção de LH inibindo o ciclo éstrico. Um ano após o nascimento a frequência de alimentação da cria com leite materno diminui e o ciclo éstrico é restituído (West *et al.* 2000, cit. por Robeck *et al.* 2001).

2.2.2. MACHOS

Os machos apresentam maior tamanho que as fêmeas, podem-se reproduzir todo o ano (Wells & Scott 1999) e atingem a maturidade sexual entre os dez e os treze anos de vida (Seargent *et al.* 1973, Perrin & Reilly 1984, Cockcroft & Ross 1990 cit. por Robeck *et al.* 2001). Existe variação sazonal dos níveis de testosterona (Harrison & Ridgway 1971, Schroeder & Keller 1989 cit. por Robeck *et al.* 2001), embora não se

verifiquem variações da ecogenicidade testicular (Brook 1997 cit. por Robeck *et al.* 2001 e Brook *et al.* 2000).

Foram relatados aumentos de testosterona de 1,1ng/ml em Abril até 54,1ng/ml em Junho, mês em que tem o seu pico (Schroeder e Keller 1989 cit. por Robeck T *et al.* 2001). Os mesmos autores verificaram, no entanto, que o pico de produção de esperma ocorre quando os níveis de testosterona estão mais baixos, de finais de Agosto até Outubro. Este facto pode estar relacionado com os efeitos inibitórios que altos níveis de testosterona podem ter na espermatogénese (Matsumoto 1990 e Tom *et al.* 1991 cit. por Robeck *et al.* 2001). O atraso entre o pico de testosterona e o pico de produção de esperma pode também resultar do tempo necessário para a maturação dos espermatozoides em golfinhos (Byers *et al.* 1983 e Asher *et al.* 1987 cit. por Robeck *et al.* 2001).

3. MANEIO VETERINÁRIO DE GRAVIDEZ E PARTO DE GOLFINHOS ROAZ (*TURSIOPS TRUNCATUS*) NO ZOOMARINE ITALIA

3.1. ÂMBITO E OBJETIVOS

Apesar de nos parques os cuidados de bem-estar estarem garantidos continuam-se a perder frequentemente crias por dificuldades na avaliação do seu estado geral de saúde e pelo seu difícil acesso. A percentagem de nados mortos em parques é em média 20,7% e a de sobreviventes para além dos três meses de idade é de 6,7% (Duffield & Robeck 1999). Assim, o objetivo da aplicação deste protocolo de seguimento de golfinhos pré e pós parto sob cuidado humano é reunir o máximo de informação para tentar minimizar os possíveis fatores de insucesso reprodutivo.

3.2. APRESENTAÇÃO DO CASO

O Zoomarine Italia possui no seu delfinário cinco Golfinhos Roaz sem experiência reprodutiva. O grupo social é constituído por um macho dominante de vinte e dois anos de idade, outros dois machos com quinze e dezasseis anos de idade e duas fêmeas de doze anos de idade. Os golfinhos são alimentados com seis espécies distintas de pescado congelado (arenque, verдинhos, carapau, chicharro, capelim, sprat e peixe-rei-do-mediterrâneo) apropriado para consumo humano e a sua dieta é suplementada com vitaminas e sessões de hidratação com água, gelo ou gelatina.

O delfinário possui sete milhões de litros de água e é composto por cinco piscinas que podem ser individualizadas, das quais uma é a piscina médica. Esta piscina

tem fundo móvel que está revestido por nylon de modo a não ferir os animais, possui um local de observação subaquático e é onde ocorrem variados procedimentos médicos e os partos. A água das piscinas é água salgada produzida no Zoomarine Italia utilizando água e sal com parâmetros físico-químicos controlados. É-lhe adicionado cloro e a temperatura da água é mantida entre 15 e 27 graus Celsius por um mecanismo autónomo. As piscinas possuem sistemas de filtração de água e todos os dias se controla a temperatura, o cloro e o pH da água.

No ano de 2012 as duas fêmeas primíparas (fêmea 1 e fêmea 2) do grupo ficaram prenhas do macho dominante. Tendo em conta a sua falta de experiência reprodutiva, a incapacidade de prever o desenvolvimento de instinto maternal, assim como a reação do grupo social ao nascimento das crias, foi de imediato posto em prática um protocolo de seguimento de gravidez de *Tursiops truncatus* elaborado pelo Zoomarine Portugal. No ano de 2013 a fêmea 1 ficou prenha novamente, tendo sido posto em prática o mesmo protocolo de seguimento de gravidez. A estudante participou na parte inicial do protocolo de seguimento posto em prática na gravidez da fêmea 1 em 2014 (seguimento de analítica sanguínea e ecográfico) no entanto não serão apresentados os resultados deste seguimento uma vez que não seriam representativos de toda a gestação.

3.3. PROTOCOLO DE SEGUIMENTO DE GRAVIDEZ DE *TURSIOPS TRUNCATUS* NO ZOOMARINE ITALIA

O programa de profilaxia médica posto em prática no Zoomarine Italia inclui, além de outros procedimentos, execução de ecografia semanal aos órgãos reprodutivos (Figura 10 A) das fêmeas de golfinho roaz para deteção de crescimento folicular, ovulação e diagnóstico precoce de gravidez - às quatro semanas de gestação (Stone *et al.* 1999 cit. por Lacave *et al.* 2004). Assim que se verifica a presença de um feto as ecografias semanais mantêm-se pois permitem estimar a data do parto (Lacave *et al.* 2004) e verificar que toda a gestação se desenvolve da maneira esperada, de modo a que se possa planificar a execução de outras ações do protocolo em questão. Nos últimos dois meses de gravidez faz-se o exame ecográfico duas vezes por semana, nas duas últimas semanas três vezes por semana e na última semana todos os dias.

A ecografia, bem como todas as outras intervenções que fazem parte deste protocolo, são realizadas com cooperação do animal através de um comportamento médico - comportamento efetuado pelo animal que permite assessorar o seu estado de

saúde (www.imata.org). Neste caso o animal coloca-se junto ao bordo da piscina em posição lateral e mantém essa posição fazendo pausas para respirar com ajuda dos treinadores que suportam a cabeça e a cauda. Devido às características da pele dos golfinhos não existe ar entre esta e a sonda e por isso não é necessário utilizar gel na realização do exame ecográfico (Brook 2001). A sonda utilizada é semi-convex de 3.5 MHz e o modo utilizado é o modo B, alterando-se para modo M para determinar a frequência cardíaca do feto. A sonda é colocada transversalmente imediatamente cranial à fenda genital e é deslocada cranialmente até se visualizar o ovário entre os músculos reto abdominal e lombar hipaxial e o feto. Observam-se as dimensões do corpo lúteo para verificar que não está a regredir, o crescimento fetal através das medidas do diâmetro biparietal e do tórax, o cordão umbilical para ver se está livre de compressão e a viabilidade fetal através da medição da frequência cardíaca. Posteriormente inserem-se as medidas do feto no programa informático de regressão linear do aumento do diâmetro biparietal e torácico desenvolvido por Lacave *et al.* 2004 que permite estimar a data do parto.

É também parte integrante do programa de profilaxia médica do Zoomarine Italia fazer uma colheita de sangue (Figura 10 B) de cada animal por mês. Esta frequência mantém-se nos primeiros dez meses de gestação e aumenta para duas colheitas sanguíneas por mês nos últimos dois meses. Na execução deste procedimento o animal emerge a parte

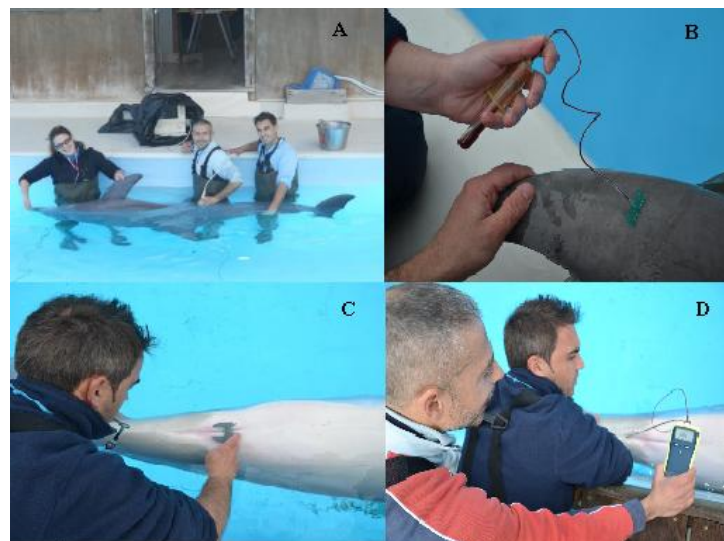


Figura 10. A Ecografia, B Colheita de sangue, C Medição da distância inter-mamária, D Medição da temperatura retal. Imagens gentilmente cedidas pelo Zoomarine Italia.

caudal do corpo que é segura pelo treinador e girada para que exponha a parte ventral da cauda onde se vê o sulco que possui a veia caudal ventral. A colheita de sangue faz-se com uma agulha borboleta de vinte e um Gauge acoplada a um adaptador de tubos de vácuo. Colhe-se sangue em tubos sem anti-coagulante, dos quais se extrai soro para medir os parâmetros de bioquímica; num tubo com citrato de sódio, do qual se extrai plasma para avaliar o fibrinogénio, num tubo com lítio heparina para medir a velocidade

de sedimentação eritrocitária e num tubo com EDTA para efectuar hemograma. O hemograma é realizado num laboratório externo e é complementado com um esfregaço sanguíneo e respetiva visualização ao microscópio ótico para efetuar contagem diferencial de leucócitos, realização de microhematócrito com respetiva leitura e leitura de proteínas totais num refratómetro - tarefas executadas no laboratório da Clínica Veterinária do Zoomarine Italia. A análise dos parâmetros bioquímicos é feita num laboratório externo sendo medidos os parâmetros disponíveis e padronizados no analisador bioquímico utilizado - glucose, ureia, creatinina, bilirrubina, colesterol, proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase, alanina transaminase, aspartina transaminase, creatina kinase, lactato desidrogenase, cálcio, fosforo, sódio, potássio, cloro, ferro, triglicerídeos, amílase, lipase e ácido úrico. Os resultados da analítica sanguínea são importantes para complementar a avaliação do estado de saúde do animal, que não é fácil de efetuar apenas com exploração macroscópica. Na avaliação dos resultados dá-se especial atenção aos valores de ferro, fibrinogénio, globulos brancos e velocidade de sedimentação eritrocitária pois estes são utilizados para identificar precocemente qualquer processo inflamatório que possa estar a desenvolver-se.

Nos últimos três meses de gestação mede-se a temperatura retal da progenitora (Figura 10 D) uma vez por dia, através da colocação de uma sonda termossensível caudalmente na fenda genital. A frequência das medições aumenta para duas vezes por dia nas últimas duas semanas de gestação para prever de forma mais precisa a data do parto. uma vez que está demonstrada uma diminuição de 0,7 a 1,3° Celsius na temperatura retal de golfinhos roaz de vinte e quatro a doze horas antes do parto (Terasawa *et al.* 1999).

O valor da distância inter-mamária é outro parâmetro importante pois pode indicar a proximidade do parto uma vez que apesar de aumentar ao longo da gestação devido à acumulação de leite nas glândulas mamárias, aumenta abruptamente nos últimos dias de gestação possivelmente devido à deslocação caudal do feto no útero (Francesco Grande, Zoomarine Italia, comunicação pessoal). No mesmo período de tempo e com a mesma frequência das medições de temperatura fazem-se medições da distância inter-mamária com auxílio de um paquímetro (Figura 10 C).

Nos trinta dias que antecedem a data prevista do parto são feitas observações subaquáticas sistemáticas da fêmea gestante ao longo de dezasseis horas, no período noturno, na piscina médica, onde o animal é isolado. São registadas a frequência

respiratória, de defecação, urinária e das contrações e distensões abdominais que são também caracterizadas quanto ao seu grau. Na semana antes da data prevista do parto, as observações são efetuadas durante vinte e quatro horas pois qualquer alteração fisiológica ou comportamental pode indicar a iminência do parto.

Durante o parto está presente a equipa que foi previamente formada e treinada a intervir caso haja problemas no trabalho de parto que possam comprometer a viabilidade da progenitora e do feto. Esta equipa é formada pelos médicos veterinários, treinadores e biólogos. É contabilizada a duração da expulsão do feto e quanto tarda a expulsão da placenta. São recolhidas amostras de placenta para despiste de *Brucella* spp. e administra-se à progenitora, por via oral, ácido clavulânico e amoxicilina 10 mg/kg de doze em doze horas durante dez dias. O antibiótico é administrado para prevenir possíveis infeções como metrite, vaginite e possíveis mastites causadas pelo modo de alimentação da cria -má posição, elevado número de tentativas (Francesco Grande, Zoomarine Italia, comunicação pessoal). Na primeira semana de vida da cria observa-se a sua frequência respiratória e de amamentação durante vinte e quatro horas, pois é neste período que a cria vai aprender a nadar, respirar e alimentar-se, estando muito vulnerável a fatores externos. É bastante importante verificar a eficiência da amamentação pois, em caso de falha, a imunidade passiva pode estar comprometida.

3.4. RESULTADOS E SEGUIMENTO

Nas ecografias realizadas ao longo da gestação das duas fêmeas observaram-se corpos lúteos de grandes dimensões (Figura 11 A e B), em média 2,5x3cm. O

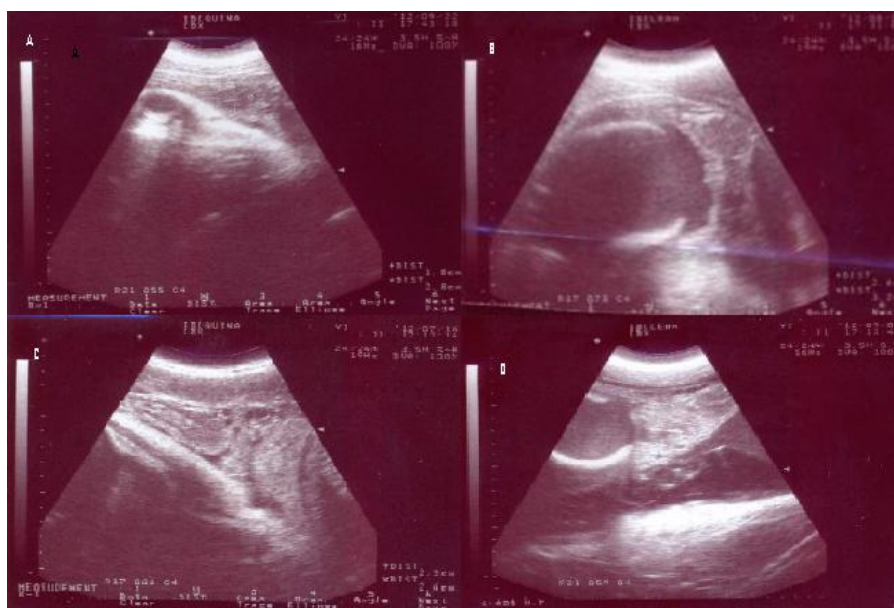


Figura 11. A e B Corpo Lúteo, C e D Cordão umbilical. Imagens gentilmente cedidas pelo Zoomarine Italia.

cordão umbilical (Figura 11 C e D) dos dois fetos foi constantemente visualizado como

uma estrutura individualizada, sem nós e não comprimida por outras estruturas. Verificou-se o aumento do diâmetro biparietal e torácico dos dois fetos ao longo da gestação (Figura 12 em Anexo) e o batimento cardíaco determinado foi em média 160 batimentos por minuto.

Não foram observadas alterações patológicas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados nas fêmeas 1 e 2. Quanto aos parâmetros sanguíneos indicativos de inflamação verificou-se que: a velocidade de sedimentação eritrocitária esteve em média acima dos valores de referência (4-17 mm/h) nos dois animais (Figura 13 A em Anexo); o número total de glóbulos brancos esteve dentro dos valores de referência publicados (5000-9000 milhões) (Figura 13 B em Anexo); a quantidade de ferro sanguínea esteve maioritariamente entre os valores de referência (120-340 µg/dl) (Figura 13 C em Anexo) e o fibrinogénio ultrapassou o valor máximo de referência (170-280 mg/dl) quatro vezes na fêmea 2, tendo duas das vezes sido após o parto (Figura 13 D em Anexo). Como na colheita de sangue efetuada à fêmea 2 oito dias antes do parto se verificaram valores dos parâmetros inflamatórios que poderiam indicar existência de inflamação (fibrinogénio 366 mg/dl, velocidade de sedimentação eritrocitária 80 mm/h e 6350 milhões de glóbulos brancos), iniciou-se uma terapia oral com 10 mg/kg de amoxicilina e ácido clavulânico de doze em doze horas que teve a duração de trinta dias.

A temperatura retal das progenitoras esteve dentro dos valores de referência (36,3-36,9 graus Celsius) e diminuiu 0,3 graus Celsius doze horas antes do parto na fêmea 1. Na fêmea 2 não se conseguiram obter os valores dos últimos dias antes do parto devido à falta de cooperação do animal. A distância inter-mamária aumentou progressivamente ao longo da gestação em ambas as fêmeas. Na fêmea 1 verificou-se um aumento de 5 milímetros doze horas antes do parto, na fêmea 2 não se conseguiram obter os valores dos últimos dias antes do parto pelo motivo supracitado. Verificou-se ainda um aumento da intensidade e frequência das contrações nas duas fêmeas à medida que se aproximava a data prevista de parto.

O parto da fêmea 1 durou setenta minutos, a placenta foi expulsa quatro horas após o parto e a cria estava em posição posterior. O parto da fêmea 2 teve duração de vinte minutos, a placenta foi expulsa dez horas e vinte minutos após o parto e a cria estava em posição anterior. Os resultados dos exames microbiológicos foram negativos quanto à presença de *Brucella* spp. nas duas placentas. Em ambas as crias a frequência respiratória não excedeu as cinco respirações por minuto por mais de duas horas e era

sincrónica com a da progenitora; a amamentação da cria 1 iniciou-se seis horas após o nascimento e a da cria 2 dezasseis horas após o nascimento. Ao longo do tempo verificaram-se valores decrescentes de tentativas e de número de amamentações efetivas devido à maior eficiência das crias em alimentar-se.

Nove dias após o parto da fêmea 1 observaram-se dificuldades respiratórias na cria 1 seguidas de morte imediata da mesma. A fêmea 1 não apresentava alterações na analítica sanguínea nem de comportamento e as análises microbiológicas do seu leite e da água da piscina médica obtiveram resultados satisfatórios. Foi encontrada 1 UFC/100ml de *Pseudomonas aeruginosa* numa das piscinas do delfinário. Durante a necrópsia da cria verificou-se boa condição corporal, hiperémia e edema pulmonar, hiperémia moderada das meninges e petéquias nas serosas dos diversos órgãos. Foram recolhidas amostras de todos os órgãos da cria 1 para análise microbiológica e foi encontrada *Escherichia coli* no coração, *Pseudomonas* spp. no encéfalo e pulmões e *Pseudomonas aeruginosa* no intestino. À data da concretização deste relatório de estágio a cria 2 encontrava-se viva.

3.5. DISCUSSÃO

O corpo lúteo observado durante os exames ecográficos tinha grandes dimensões, como era esperado, de modo a produzir níveis elevados de progesterona durante a gravidez (Sawyer – Steffan *et al.* 1983). O cordão umbilical foi observado por ecografia sem a presença de nós e de outras estruturas que o comprimissem, o que está de acordo com a viabilidade fetal observada. Também por ecografia foi verificado o aumento do diâmetro biparietal e torácico esperado devido ao crescimento fetal linear (Lacave *et al.* 2004), e um batimento cardíaco fetal dentro dos valores verificados na prática clínica (Pietro Saviano, comunicação pessoal).

Na avaliação da analítica sanguínea de golfinhos roaz tem de se ter em conta variações fisiológicas que podem ocorrer durante a prenhez (Terasawa *et al.* 2002). A velocidade de sedimentação eritrocitária, apesar de estar acima dos valores de referência (Bossart *et al.* 2001) encontrava-se dentro dos valores verificados em fêmeas prenhas na prática clínica (Francesco Grande, Zoomarine Italia, comunicação pessoal). Os leucócitos, apesar de estarem dentro dos valores descritos na bibliografia (Bossart *et al.* 2001) estiveram acima dos valores verificados neste grupo de golfinhos roaz na prática clínica (Francesco Grande, Zoomarine Italia, comunicação pessoal). Esta alteração era, no entanto, esperada pois em fêmeas prenhas verifica-se neutrofilia moderada na

analítica sanguínea (Duffield & Robeck 1999). A concentração de ferro esteve dentro dos valores de referência (Bossart *et al.* 2001) exceto em duas colheitas sanguíneas da fêmea 2. Contudo a diminuição pontual verificada nas duas colheitas sanguíneas não foi considerada clinicamente relevante pois os valores dos outros parâmetros inflamatórios estavam dentro dos valores esperados. O valor de fibrinogénio sanguíneo ultrapassou quatro vezes o valor máximo de referência (Bossart *et al.* 2001) no entanto como é esperado um aumento dos valores de fibrinogénio sanguíneo durante a prenhez (Duffield & Robeck 1999) e não havia alterações dos restantes parâmetros inflamatórios, as elevações verificadas não se consideram clinicamente relevantes.

Na colheita de sangue efetuada à fêmea 2 oito dias antes do parto verificaram-se valores dos parâmetros inflamatórios que poderiam indicar existência de inflamação pois o fibrinogénio (366 mg/dl) estava bastante próximo do limite superior, a velocidade de sedimentação eritrocitária (85 mm/Hg) apresentava um dos valores mais elevados verificados durante a gravidez e os glóbulos brancos (6350 milhões) encontravam-se acima dos valores verificados na prática clínica para este grupo de golfinhos roaz (3500-5000 milhões - Francesco Grande, Zoomarine Italia, comunicação pessoal). Por se considerar que poderia existir um processo inflamatório na fêmea 2 e tendo em conta que oito dias depois (data estimada do parto) se iria iniciar a administração de antibiótico, iniciou-se no dia da colheita de sangue a terapia oral com amoxicilina e ácido clavulânico 10 mg/kg de doze em doze horas. A terapia durou trinta dias pois apenas terminou após o “gating” (passagem da progenitora e cria da piscina médica para outra piscina por condicionamento operante - ação em que as fêmeas se podem lesionar) e após os valores de analítica sanguínea não apresentarem alterações. A amoxicilina é um antibiótico β -lactâmico que foi escolhido pois embora atravesse a barreira feto-placentária e seja excretado no leite, não possui efeitos nefastos no desenvolvimento do feto (www.infarmed.pt).

A temperatura retal das progenitoras esteve dentro dos valores de referência e como se esperava, diminuiu 0,3 graus Celsius doze horas antes do parto na fêmea 1 (Terasawa *et al.* 1999). Também a distância inter-mamária evoluiu como era de esperar aumentando substancialmente doze horas antes do parto na fêmea 1. O aumento da frequência e intensidade das contrações verificado à medida que se aproximou o parto vai de encontro ao descrito na bibliografia (Robeck *et al.* 2001), bem como a duração do parto (até duas horas) e o período de tempo entre a expulsão do feto e a expulsão da placenta (até doze horas) (Duffield & Robeck 1999).

Os resultados microbiológicos das placentas foram negativos, como se esperava, uma vez que todos os golfinhos do parque nasceram noutros parques livres de *Brucella* spp. e não tiveram contacto com outros animais. A pesquisa desta bactéria, porém, é de elevada importância devido ao seu potencial zoonótico (Wu *et al.* 2014) e por já se ter isolado *Brucella* spp. em populações sob cuidado humano. Apesar de se desconhecer a fisiopatologia da doença em mamíferos marinhos pensa-se que pode causar problemas reprodutivos, à semelhança do que se verifica noutras espécies (Dunn *et al.* 2001).

Os sinais clínicos da cria 1 juntamente com os achados macroscópicos e microbiológicos da necrópsia, sugerem que a causa de morte foi broncopneumonia (dificuldade respiratória, hiperémia e edema pulmonar) seguida de septicemia (petéquias nas serosas dos diferentes órgãos, hiperémia das meninges, *Escherichia coli* no coração, *Pseudomonas* spp. no encéfalo e *Pseudomonas aeruginosa* no intestino) (Francesco Grande, Zoomarine Italia, comunicação pessoal). As infeções bacterianas são a primeira causa de morte de crias entre os sete e os noventa dias pós parto devido a falha na imunocompetência (Duffield & Robeck 1999). No entanto este facto não era esperado uma vez que os padrões de amamentação da cria 1 eram normais. Nos mamíferos marinhos há uma grande prevalência de infeções por bactérias Gram-negativas, o que aumenta as probabilidades de endotoxemia e choque séptico que culminam em falência orgânica geral. Como as crises de septicemia evoluem muito rapidamente, um animal com septicemia pode apresentar um comportamento normal nas horas anteriores ao seu falecimento (Dunn *et al.* 2001). Este facto é semelhante ao sucedido com a cria 1 que tinha um padrão de amamentação e respiração normal e que apresentou dificuldades respiratórias de forma híper aguda e faleceu.

Numa próxima gestação da fêmea 1 poderá fazer-se suplementação vitamínica e imunitária (por exemplo com comprimidos de *Echinacea purpúrea*) durante a gravidez para que aumente a eficácia da imunidade passiva transmitida pelo leite. Também se poderá capturar a cria nos primeiros dias de vida para efetuar recolha e análise de sangue, que dará mais informações sobre a eventual presença de uma inflamação/infeção à equipa veterinária, de modo a que esta possa atuar mais precocemente (Letizia Fiorucci, Zoomarine Italia, comunicação pessoal).

4. CONCLUSÃO

Embora cada parque tenha um protocolo de seguimento de gravidez estabelecido, é essencial ir modificando e adaptando os procedimentos utilizados de

acordo com a experiência adquirida e o grupo de animais em questão. É também importante ter uma boa instalação e equipa de observação subaquática de modo a registar e comunicar qualquer alteração fisiológica ou de comportamento para que se possa intervir precocemente na progenitora ou na cria. Apesar dos seguimentos efetuados e do aperfeiçoamento das técnicas utilizadas, a percentagem de crias que sobrevivem além dos 3 meses de idade é bastante baixa, 0 - 33% (Duffield & Robeck 1999).

III. BIBLIOGRAFIA

- Bossart G D, Reidarson T H, Dierauf L A, Duffield D A (2001), “Clinical Pathology” **CRC Handbook of marine mammals medicine**, 2ª Ed, CRC Press LLC
- Brook F M (2001) “Ultrasonographic imaging of the reproductive organs of the female bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus aduncus*” **Journal of Reproduction and Fertility** 121, 419-428
- Brook F M, Kinoshita R, Benirschke (2002) “Histology of the Ovaries of a Bottlenose Dolphin, *Tursiops aduncus*, of Known Reproductive History” **Marine Mammal Science** 18 (2) 540-544
- Brook F M, Kinoshita R, Brown B, Metreweli C (2000) “Ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus aduncus*” **Journal of Reproduction and Fertility** 119, 233-240
- Chiari Y, Cahais V, Galtier N, Delsuc F (2012) “Phylogenomic analyses support the position of turtles as the sister group of birds and crocodiles (Archosauria)” **BMC Biology**, disponível em <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/65>
- Duffield D & Robeck (1999) **Bottlenose Dolphin Reproduction Workshop**, San Diego, California (Não publicado)
- Dunn J L, Buck J D, Robeck (2001), “Bacterial Diseases of Cetaceans and Pinnipeds) **CRC Handbook of marine mammals medicine**, 2ª Ed, CRC Press LLC
- Geraci J R, Lounsbury V J (1993), “Cetaceans – Single Strandings” **Marine Mammals Ashore A Field Guide for Strandings**, Texas A&M Sea Grant Publication
- Hamann M, Limpus CJ, Owens DW (2003) “Reproductive Cycles of Males and Females” **The Biology of Sea Turtles**, Vol. II, CRC Press, 135-160
- Kakizoe Y, Sakaoka K, Akune Y, Kanou Y, Saito T, Uchida I (2013) “Change of Plasma Chemistry Values in Captive Breeding Loggerhead Turtles (*Caretta caretta*)” **ISRN Zoology**, vol. 2013, ID do artigo 514576, 7 páginas
- Lacave G, Eggermont M, Verslycke T, Brook F, Salbany A, Roque L (2004), “Prediction from ultrasonographic measurements of the expected delivery date in two species of bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus* and *Tursiops aduncus*)” **The Veterinary Record** 154 (8) 228-233

- Licht P e Gallo AB (1978) “Immunochemical relatedness among pituitary follicle-stimulating hormones of tetrapod vertebrates” **General and Comparative Endocrinology** 36, 575-584 (Abstract)
- Manita T, Chanita S, Kamolporn D, Komsin S, Parinya S, Sontaya M, Pornchai S, Kaitkanokes S (2009) “Electroejaculation and semen evaluation in olive ridley turtle (*Lepidochelys olivacea*) and hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in Thailand” Conference paper, Kyoto University, disponível em kyoto-u.ac.jp
- Miller JD (1997) “Reproduction in Sea Turtles” **The Biology of Sea Turtles**, Vol. I, CRC Press, 52-81
- Miller JD, Limpus CJ (2003) “Ontogeny of Marine Turtle Gonads” **The Biology of Sea Turtles**, Vol. II, CRC Press, 199-224
- Owens WD (1997) “Hormones in the Life History of Sea Turtles” **The Biology of Sea Turtles**, Vol. I, CRC Press, 315-341
- Pabst D A, Rommel S A, McLellan W A, Williams T M, Rowels T K (1995), “Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise” **The Journal of Experimental Biology** 198, 221–226
- Pease A, Blanvillain G, Rostal D, Owens D, Segars A (2010) “Ultrasound imaging of the inguinal region of adult male Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*)” **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 41(1), 69-76
- placentation.ucsd.edu/dolph.html última visualização em 14/04/14
- Robeck, Steinman K J, Yoshioka M, Jensen E, O’Brien J K, Katsumata E, Gili C, McBain J F, Sweeney J, Monfort S L (2005), “Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen – thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)” **Society for Reproduction and Fertility** 129, 659-674
- Robeck, Atkinson S K C, Brook F (2001), “Reproduction” **CRC Handbook of marine mammals medicine**, 2ª Ed, CRC Press LLC
- Rommel S A, Lowenstine L J (2001), “Gross and Microscopic Anatomy” **CRC Handbook of marine mammals medicine**, 2ª Ed, CRC Press LLC
- Sawyer-Steffan J E, Kirby V L, Gilmartin W G (1983), “Progesterone and Estrogens in the Pregnant and Nonpregnant Dolphin, *Tursiops truncatus*, and the Effects of Induced Ovulation” **Biology of Reproduction** 28, 897-901
- Schneyer A, Castro A, Odell D (1985), “Radioimmunoassay of Serum Follicle-stimulating Hormone and Luteinizing Hormone in the Bottlenosed Dolphin” **Biology of Reproduction** 33, 844-853
- Terasawa F, Kitamura M, Fujimoto A, Hayama S (2002), “Seasonal Changes of Blood Composition in Captive Bottlenose Dolphins” **Journal of Veterinary Medicine Science** 64(11) 1075-1078
- Terasawa F, Yokoyama Y, Kitamura M (1999), “Rectal Temperatures Before and After Parturition in Bottlenose Dolphins” **Zoo Biology** 18 153-156
- Valente ALS (2007) “Life Cycle” **Diagnostic Imaging of the Loggerhead Sea Turtle**, 21-22

- Valente ALS, Velarde R, Parga ML, Marco I, Lavin S (2011) “Reproductive status of captive Loggerhead sea turtles based on serum levels of gonadal steroid hormones, corticosterona and thyroxin” **The Veterinary Journal** 187, 255-259
- Wells R S, Scott M D (1999), “Bottlenose Dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu 1821)” **Handbook of Marine Mammals: The Second Book of Dolphins and the Porpoises**, Vol 6, Academic Press
- Whittier JM, Corrie F, Limpus C (1997) “Plasma Steroid Profiles in Nesting Loggerhead Turtles (*Caretta caretta*) in Queensland, Australia: Relationship to Nesting Episode and Season” **General and Comparative Endocrinology** 106, 39-47
- Wibbels T, Owens DW, Limpus CJ, Reed PC, Amoss MS (1990) “Seasonal Changes in Serum Gonadal Steroids Associated with Migration, Mating and Nesting in the Loggerhead Sea Turtle (*Caretta caretta*)” **General and Comparative Endocrinology** 79, 154-164
- Wibbels T, Owens DW, Litch P, Limpus C, Reed PC, Amoss MS (1992) “Serum Gonadotropins and Gonadal Steroids Associated with Ovulation and Egg Production in Sea Turtles” **General and Comparative Endocrinology** 87, 71-78
- Wu Q, McFee WE, Goldstein T, Tiller RV, Schwacke L (2014) “Real-time PCR assays for detection of *Brucella* spp. and the identification of genotype ST27 in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)” **Journal of Microbiological Methods** 100, 99-104
- www.gbrmpa.gov.au última visualização em 26/02/2014
- www.imata.org última visualização em 06/05/14
- www.infarmed.pt última visualização em 06/05/14
- www.iucnredlist.org última visualização em 14/04/14
- www.iucnredlist.org última visualização em 25/05/2014
- www.marinemammalscience.org última visualização em 14/04/14
- Wyneken J (2001) **The Anatomy of Sea Turtles**, U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 1-172
- Wyneken J, Mader DR, Weber III ES, Merigo C (2006) “Medical Care of Sea Turtles” **Reptile Medicine and Surgery**, 2º Ed, Elsevier Inc, 972-1007
- Zacariotti RL (2008) “Avaliação reprodutiva e congelamento de sêmen em serpentes” **Tese de doutorado**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

IV. ANEXO

Analítica sanguínea executada em *Caretta caretta*

Hemograma realizado num hemocítmetro complementado com esfregaço sanguíneo e respetiva visualização ao microscópio ótico para efetuar contagem diferencial de leucócitos, microhematócrito com respetiva leitura, leitura de proteínas totais num refractómetro. Medição dos parâmetros bioquímicos disponíveis e padronizados no analisador bioquímico utilizado - glucose, ureia, creatinina, bilirrubina, colesterol, proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, gamaglutamiltransferase, alanina transaminase, aspartina transaminase, creatina kinase, lactato desidrogenase, cálcio, fosforo, sódio, potássio, cloro, ferro, triglicerídeos e ácido úrico)

Figura 12. Crescimento dos dois fetos ao longo da gestação da fêmea 1 e 2.

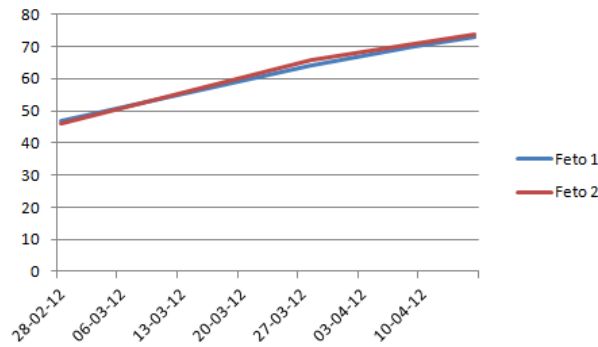


Figura 13. Variação dos parâmetros sanguíneos inflamatórios ao longo da gestação da fêmea 1 e da fêmea 2 – velocidade de sedimentação eritrocitária (A), leucócitos (B), ferro (C) e fibrinogénio (D).

