



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências
Campus do Litoral Paulista



**Dosagem de hormônios esteroides sexuais em camada de
gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei*
(Cetartiodactyla; Pontoporiidae), do litoral de São Paulo, Brasil.**

VANESSA LANES RIBEIRO

**SÃO VICENTE - SP
2019**

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista
Praça Infante D. Henrique s/ nº - CEP 11330-900 – São Vicente (SP) – Brasil
Tel. (13) 3569-7100 – Fax (13) 3569-7146 – diretor.clp@unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências
Campus do Litoral Paulista



**Dosagem de hormônios esteroides sexuais em camada de
gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei*
(Cetartiodactyla; Pontoporiidae), do litoral de São Paulo, Brasil.**

Candidata: Vanessa Lanes Ribeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Pacheco Bertozzi

Co-orientadora: Dr^a Daniela Magalhães Drummond de Mello

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus do Litoral Paulista, UNESP, para obtenção
do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade de Ambientes Costeiros.

**SÃO VICENTE - SP
2019**

Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista
Praça Infante D. Henrique s/ nº - CEP 11330-900 – São Vicente (SP) – Brasil
Tel. (13) 3569-7100 – Fax (13) 3569-7146 – diretor.clp@unesp.br

R484d Ribeiro, Vanessa Lanes

Dosagem de hormônios esteroides sexuais em camada de gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla; Pontoporiidae), do litoral de São Paulo, Brasil. / Vanessa Lanes Ribeiro. -- São Vicente, 2019

78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientadora: Carolina Pacheco Bertozzi

Coorientadora: Daniela Magalhães Drummond de Mello

1. Odontoceti. 2. Esteroides sexuais. 3. Tecido adiposo. 4. Extração hormonal. 5. Enzimaimunoensaio. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados
fornecidos pelo autor(a).

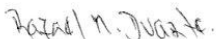
Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VANESSA LANES RIBEIRO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA.

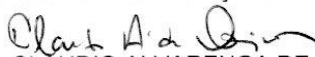
Aos 13 dias do mês de março do ano de 2019, às 09:30 horas, no(a) Sala 05 do Instituto de Biociências - UNESP/CLP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. CAROLINA PACHECO BERTOZZI - Orientador(a) do(a) Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP, Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE do(a) Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP, Prof. Dr. CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA do(a) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VANESSA LANES RIBEIRO, intitulada **Dosagem de hormônios esteroides sexuais em camada de gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla; Pontoporiidae), do litoral de São Paulo, Brasil.** Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Profa. Dra. CAROLINA PACHECO BERTOZZI



Prof. Dr. RAFAEL MENDONÇA DUARTE



Prof. Dr. CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA

RESUMO

A toninha (*Pontoporia blainvillei*) é um pequeno odontoceto impactado pelas atividades antrópicas (capturas acidentais, degradação de habitat). A dosagem hormonal em diferentes matrizes (fezes, urina, tecido adiposo, leite, saliva, borribo) tem sido cada vez mais utilizada em mamíferos aquáticos para determinar parâmetros reprodutivos. O objetivo deste estudo foi validar o método de extração e mensuração de testosterona e progesterona em camada de gordura subcutânea de carcaças de toninha armazenadas em duas temperaturas (-20°C e -196°C), além de correlacionar as dosagens com parâmetros de sexo, maturidade gonadal, idade, estágio de desenvolvimento, comprimento total e ocorrência de prenhez. As amostras foram colhidas de carcaças provenientes de encalhe e captura acidental do litoral de São Paulo. Foram colhidos fragmentos de gordura, armazenados em freezer a -20°C ($n=101$) e em nitrogênio líquido (-196°C) ($n=28$). A extração hormonal foi realizada com modificações a partir do método descrito em literatura e a dosagem foi feita por ensaio imunoenzimático para os dois hormônios. Os resultados das análises estatísticas foram expressos em duas unidades de concentração de hormônio (ng/g e ng/mg). O coeficiente de variação inter-ensaio foi de 6,89% para progesterona e 1,67% para testosterona, o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 7,82% para progesterona e 3,29% para testosterona. Os resultados do paralelismo para o ensaio de progesterona foi $F_{1,5}=0,87$ e $p=0,45$ e para testosterona $F_{1,5}=3,79$ e $p=0,11$. A eficiência média de extração foi de 66% para progesterona e 70% para testosterona. O método de extração e análise hormonal apresentou-se viável para *Pontoporia blainvillei*, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações dos hormônios nas duas temperaturas e nas duas unidades. Os níveis de hormônios encontrados foram de acordo com o esperado, onde fêmeas apresentaram níveis de progesterona mais elevados que machos, maduras e adultas tiveram níveis mais altos que imaturas, juvenis e filhotes, não houve correlação com a idade e as mesmas conclusões foram obtidas para machos em relação a testosterona. As prenhes também apresentaram níveis de progesterona mais elevados que o restante dos espécimes. Os filhotes e fetos apresentaram níveis hormonais elevados, que pode ser um reflexo da circulação hormonal materna, além da alta taxa de incorporação de hormônios na gordura ou extração mais efetiva.

Palavras-chave: Cetacea; Odontoceti; Esteroides sexuais; Tecido adiposo; Extração; Análise hormonal; Ensaio imunoenzimático; Litoral de São Paulo.

ABSTRACT

The Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) is a small odontocete impacted by anthropic activities (bycatch, habitat degradation). The hormonal measurement in biological matrices (feces, urine, blubber, milk, saliva, blow) has been increasingly used in aquatic mammals for certain reproductive parameters. The present study validated the method of extraction and measurement of testosterone and progesterone in blubber kept in two different temperatures (-20°C and -196°C), besides correlating the hormone concentration with gender, sexual maturity, age, stage of development, body length and occurrence of pregnancy. The carcasses were collected from stranded and bycatch dolphins of the coast of São Paulo. Blubber samples were collected and frozen at -20°C (n=101) and -196°C (liquid nitrogen) (n=28). The extraction was performed with a method described in literature and the hormonal analyses were done by enzyme immunoassay for the two hormones. An analysis was performed on two units of hormone concentration (ng/g and ng/mg). The inter-assay coefficient of variation was 6.89% for progesterone and 1.67% for testosterone, the intra-assay coefficient of variation was 7.82% for progesterone and 3.29% for testosterone. The progesterone assay presented parallelism $F_{1.5} = 0.87$, $p = 0.45$ and testosterone presented $F_{1.5} = 3.79$, $p = 0.11$. The mean extraction efficiency was 66% for progesterone and 70% for testosterone. The method of extraction and hormonal analysis was feasible for *Pontoporia blainvillei*. No difference was found between the progesterone and testosterone levels of samples kept at the two storage temperatures in both measurement units. The levels of hormones found were in agreement with the expectation that progesterone levels higher than males, mature and adults were higher than immature, juvenile and calf, were not abandoned with age and the same conclusions were obtained for males in relation to a testosterone. As pregnant also the levels of progesterone are higher than the rest of the specimens. High calf and fetuses hormones, which may be a reflection of the maternal hormonal circulation, besides the rate of incorporation of hormones or the more effective extraction.

Keywords: Cetaceans; Odontoceti; Sexual Steroids; Blubber; Extraction; Hormonal analysis; Enzyme immunoassay; São Paulo coast.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mapa de distribuição das FMAs (*Franciscana Management Areas*) com as lacunas de distribuição. As localidades consideradas limites anteriormente (ICMBio, 2010) estão indicadas no mapa por triângulos. Abreviações: ES, Espírito Santo, RJ, Rio de Janeiro, SP, São Paulo, PR, Paraná, SC, Santa Catarina, RS, Rio Grande do Sul. *FMA III está representada parcialmente e a FMA IV não está representada, pois tem sua distribuição na Argentina.....14

FIGURA 2. Área de estudo localizada no litoral do estado de São Paulo, Brasil, nos municípios de Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém e Peruíbe. As fêmeas (n=13) estão representadas pelos pontos vermelhos e os machos (n=15) pelos pontos azuis29

FIGURA 3. Região da colheita de camada de gordura subcutânea com pele de carcaça de *Pontoporia blainvillei*: região dorso-lateral esquerda, caudalmente a escápula esquerda (destaque no quadrado preto)30

FIGURA 4. Área de estudo localizada no litoral do estado de São Paulo, Brasil, nos municípios de Ubatuba (U), São Sebastião (SS), Guarujá (G), Praia Grande (PG), Mongaguá (M), Itanhaém (I) e Peruíbe (P). As fêmeas (n=46) estão representadas pelos pontos vermelhos e os machos (n=55) pelos pontos azuis.....50

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Teste de acurácia entre os pontos da curva padrão dos kits e <i>pools</i> de amostras diluídas para progesterona	34
GRÁFICO 2. Teste de acurácia entre os pontos da curva padrão dos kits e <i>pools</i> de amostras diluídas para testosterona	34
GRÁFICO 3. Teste de paralelismo entre os pontos da curva padrão dos kits e <i>pools</i> de amostras diluídas para progesterona ($F_{1,5}=0,87$; $p=0,45$)	34
GRÁFICO 4. Teste de paralelismo entre os pontos da curva padrão dos kits e <i>pools</i> de amostras diluídas para testosterona ($F_{1,5}=3,79$; $p=0,11$)	35
GRÁFICO 5. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de progesterona de 28 animais com camada de gordura armazenada a -20°C e a -196°C na unidade ng/g de amostra ($p=0,9631$; $df=54$; $t=0,04$).....	36
GRÁFICO 6. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de progesterona de 28 animais com camada de gordura armazenada a -20°C e a -196°C na unidade ng/mg de lipídeo ($p=0,7413$; $df=54$; $t=0,33$).....	37
GRÁFICO 7. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de 28 animais com camada de gordura armazenada a -20°C e a -196°C na unidade ng/g de amostra ($p=0,1127$; $df=54$; $t=1,61$).....	37
GRÁFICO 8. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de 28 animais com camada de gordura armazenada a -20°C e a -196°C na unidade ng/mg de lipídeo ($p=0,1039$; $df=54$; $t=1,65$).....	38
GRÁFICO 9. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de progesterona de fêmeas e machos com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($Z=-2,15$; $p=0,0314$).....	54
GRÁFICO 10. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de progesterona de fêmeas maduras e imaturas com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($Z= 2,57$; $p=0,0099$).....	55
GRÁFICO 11. Médias e intervalos de confiança de 0,95 do nível de progesterona de fêmeas adultas, juvenis e filhotes com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($H(2, N= 46)=9,6812$; $p=0,0079$).....	56
GRÁFICO 12. Médias e intervalos de confiança de 0,95 do nível de progesterona de fêmeas adultas e juvenis com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($Z=2,945494$; $p=0,0032$).....	56
GRÁFICO 13. Correlação entre os níveis de progesterona e o comprimento total de fêmeas juvenis e adultas agrupadas em ng/g de amostra ($r=0,60191$; $p=0,0003$).....	57

GRÁFICO 14. Correlação entre os níveis de progesterona e a estimativa de idade de fêmeas adultas e juvenis em ng/g de amostra($r=0,6408$; $p=0,0248$).....	58
GRÁFICO 15. Médias e intervalos de confiança de 0,95 do nível de progesterona de fêmeas prenhes e o restante dos espécimes com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($Z=-3,03444$; $p=0,0024$).....	59
GRÁFICO 16. Médias e intervalos de confiança de 0,95 do nível de progesterona de fêmeas prenhes, maduras não prenhes e imaturas com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($df=2$; $F=16,39$; $p=0,0000$).....	59
GRÁFICO 17. Concentração de progesterona em camada de gordura (ng/g de amostra) em função do comprimento total (cm) de fêmeas prenhes, maduras não prenhes e imaturas de <i>P. blainvillei</i>	60
GRÁFICO 18. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de machos e fêmeas ($n=55$ machos e $n=46$ fêmeas) com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($df=99$; $t=2,41$; $p=0,0176$).....	62
GRÁFICO 19. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de machos e fêmeas ($n=55$ machos e $n=46$ fêmeas) com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($df=26$; $t=2,07$; $p=0,0482$).....	63
GRÁFICO 20. Média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de machos entre os estágios de desenvolvimento adultos, juvenis e filhotes em ng/g de amostra ($F(2,52)=5,9443$; $p=0,0047$).....	64
GRÁFICO 21. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de machos adultos e juvenis com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($df=37$; $t=-3,19$; $p=0,0028$).....	64
GRÁFICO 22. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de fêmeas adultas, juvenis e filhotes com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($H(2, N=46)=6,4739$; $p=0,0393$).....	65
GRÁFICO 23. Correlação entre os níveis de testosterona e o comprimento total dos machos adultos e juvenis em ng/g de amostra ($r=0,3276$; $p=0,0418$).....	66
GRÁFICO 24. Correlação entre os níveis de testosterona e a estimativa de idade de fêmeas adultas e juvenis em ng/g de amostra ($r=0,6210$; $p=0,0311$).....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Dados biológicos (sexo, maturidade gonadal, estágio de desenvolvimento, comprimento total e estimativa de idade) dos espécimes (n=101) do presente estudo.....52

TABELA 2. Análise estatística das dosagens de progesterona e dados biológicos - sexo, maturidade gonadal, estágio de desenvolvimento, comprimento total, estimativa de idade e prenhez - dos espécimes (n=95) nas unidades nanograma de hormônio por grama de amostra (ng/g) e em nanograma de hormônio por miligrama de lipídeo extraído (ng/mg). $\bar{X}$ =média, σ = desvio padrão.....53

TABELA 3. Análise estatística das dosagens de testosterona e dados biológicos - sexo, maturidade gonadal, estágio de desenvolvimento, comprimento total e estimativa de idade - dos espécimes (n=101) nas unidades nanograma de hormônio por grama de amostra (ng/g) e em nanograma de hormônio por miligrama de lipídeo extraído (ng/mg). $\bar{X}$ =média, σ = desvio padrão.....61

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
A toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>).....	13
Características, distribuição e ameaças.....	13
Aspectos reprodutivos da toninha.....	15
Estudos de dosagem hormonal em cetáceos.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

CAPÍTULO 1: Validação laboratorial da dosagem de progesterona e testosterona em camada de gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla; Pontoporiidae).....

RESUMO.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 Amostras.....	28
2.2 Extração hormonal.....	30
2.3 Análise hormonal.....	31
2.4 Paralelismo, controles e eficiência de extração.....	32
2.5 Unidades utilizadas.....	32
2.6 Análise estatística.....	33
3. RESULTADOS.....	33
3.1 Paralelismo e eficiência da extração.....	33
3.2 Amostras, extração e análise hormonal.....	35
4. DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS.....	41

CAPÍTULO 2: Validação biológica da dosagem de hormônios esteroides sexuais em camada de gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla; Pontoporiidae).....

RESUMO.....	46
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Amostras.....	49
2.2 Extração hormonal.....	50
2.3 Análise hormonal.....	50
2.4 Paralelismo, controles e eficiência de extração.....	51
2.5 Análise de dados biológicos.....	51
2.6 Análise estatística.....	51
3. RESULTADOS.....	52
3.1 Paralelismo, controles e eficiência da extração.....	52
3.2 Análise de dados biológicos.....	52
3.3 Progesterona.....	52
3.3.1 Sexo.....	54
3.3.2 Maturidade gonadal.....	54
3.3.3 Estágio de desenvolvimento.....	55
3.3.4 Comprimento total.....	57
3.3.5 Estimativa de idade.....	58
3.3.6 Prenhez.....	58

3.4 Testosterona.....	60
3.4.1 Sexo.....	62
3.4.2 Maturidade gonadal.....	62
3.4.3 Estágio de desenvolvimento.....	63
3.4.4 Comprimento total.....	65
3.4.5 Estimativa de idade.....	66
4. DISCUSSÃO.....	67
5. CONCLUSÕES.....	73
6. REFERÊNCIAS.....	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

INTRODUÇÃO GERAL

A toninha (*Pontoporia blainvillei*)

Características, distribuição e ameaças

A toninha ou franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (GERVAIS & D'ORBIGNY, 1844) é um pequeno odontoceto, único membro da família Pontoporiidae (CRESPO, 2018). Sua coloração pode variar de acinzentada até marrom no dorso, tornando-se mais clara nos flancos e no ventre (TRIMBLE & PRADERI, 2006; CRESPO et al., 2002). Possui um rostro extremamente longo e estreito, com número de dentes da maxila variando entre 53 a 58 e da mandíbula de 51 a 56 (CRESPO, 2018).

É endêmica da costa leste da América do Sul, onde habita águas costeiras e estuarinas (CRESPO et al., 2002). A toninha possui hábito costeiro, e habita regiões de até 50 metros de profundidade, sendo a maior parte dos registros em locais de até 30 metros (ICMBio, 2010). Sua ocorrência foi relatada por meio de encalhes, capturas acidentais e avistamentos desde Itaúnas (18° 25' S, 30° 42' W), no Espírito Santo, Brasil (SICILIANO, 1994) até Golfo Nuevo (42° 35' S, 64° 48' W), Península Valdés, na Argentina (CRESPO et al., 1998; BORDINO et al., 1999). Ao longo de sua distribuição, foi proposta a existência de duas populações geneticamente e geograficamente separadas, a população norte, do Espírito Santo até Santa Catarina (22°S – 27°S) e a população sul, do Rio Grande do Sul à Argentina (32°S – 38°S) (PINEDO, 1991; SECCHI et al., 1998; OTT et al., 2002). Porém, a distribuição do extremo da população norte, correspondente somente à costa brasileira, está fragmentada. Ocorrem dois hiatos nessa distribuição, que podem estar relacionados a condições de habitat desfavoráveis que limitariam a ocorrência da espécie, como águas transparentes, plataforma continental estreita e a presença frequente de predadores (SICILIANO et al., 2002; MOURA et al., 2009; ICMBio, 2010; DO AMARAL et al., 2018).

Secchi et al. (2003b) realizaram a proposição de reconhecimento de quatro áreas de manejo denominadas “*Franciscana Management Areas*” (FMAs), sendo FMA I do Espírito Santo ao norte do Rio de Janeiro, FMA II em São Paulo, Paraná e Santa Catarina, FMA III do Rio Grande do Sul ao Uruguai e FMA IV no litoral da Argentina. Estudos mais recentes vêm demonstrando a necessidade de reformulação das FMAs (OTT et al., 2008; MENDEZ et al., 2010; CUNHA et al., 2014; GARIBOLDI et al., 2015, 2016). Do Amaral et al. (2018) realizaram uma atualização para os novos limites de distribuição da *Pontoporia blainvillei* no Brasil, com reformulaçãodas lacunas e divisãoda FMA I em “a” e “b”: FMA Ia corresponde altaúnas, ES (18°25'S) até Santa Cruz, ES (19°57'S) e FMA Ib Barra de Itabapoana, RJ

(21°18'S) até Armação de Búzios, RJ (22°44'S). As lacunas de distribuição foram definidas como: lacuna I da Foz do Rio Piraquê-Açu, Santa Cruz (19° 57'S) no Espírito Santo à Barra de Itabapoana (21° 18'S) no estado do Rio de Janeiro; e lacuna II da Armação dos Búzios (22° 44'S) até Piraquara de Dentro (22° 59'S) no Rio de Janeiro (Figura 1).

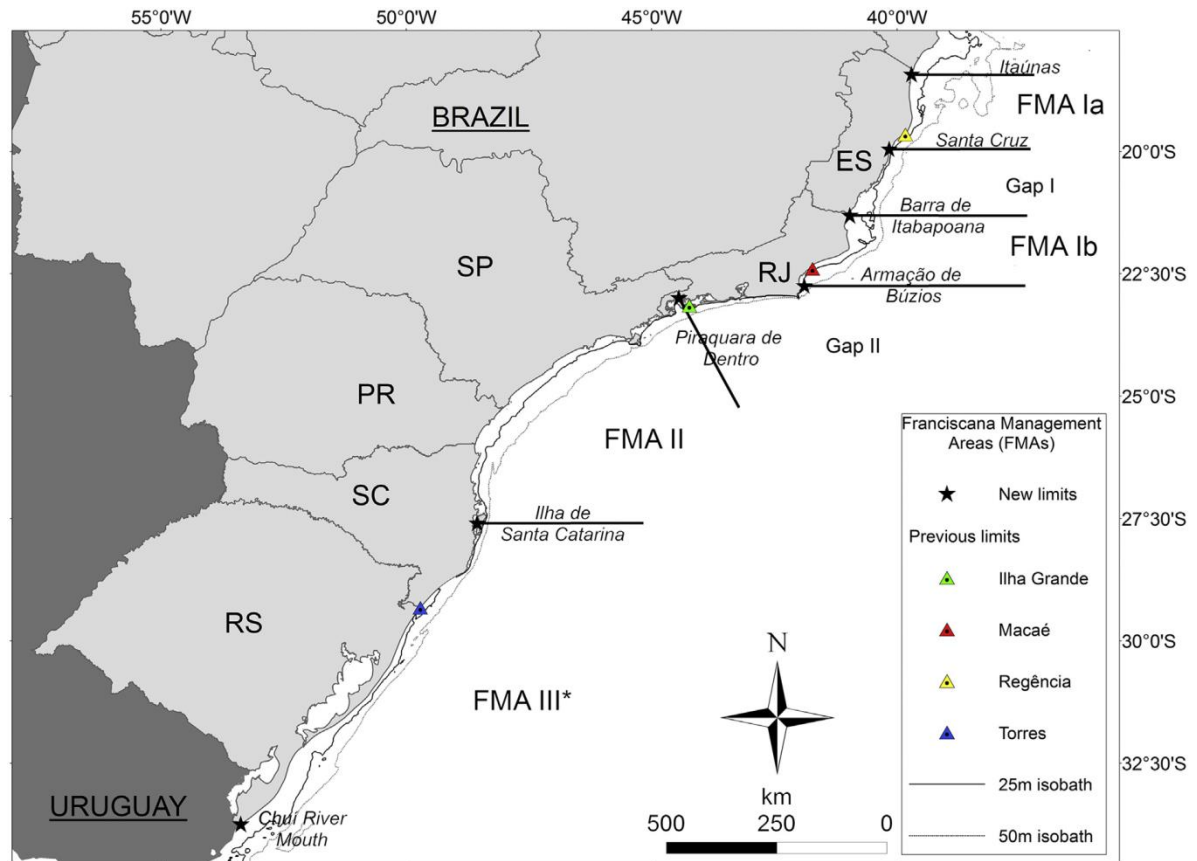


FIGURA 1. Mapa de distribuição das FMA (Franciscana Management Areas) com as lacunas de distribuição. As localidades consideradas limites anteriormente (ICMBio, 2010) estão indicadas no mapa por triângulos. Abreviações: ES, Espírito Santo, RJ, Rio de Janeiro, SP, São Paulo, PR, Paraná, SC, Santa Catarina, RS, Rio Grande do Sul. *FMA III está representada parcialmente e a FMA IV não está representada, pois tem sua distribuição na Argentina.

Extraído de: Do Amaral et al., 2018 (p. 6).

A *Pontoporia blainvillei* é uma espécie muito impactada pelas atividades antrópicas, listada como “vulnerável” na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza (ZERBINI et al., 2017) e “criticamente ameaçada” na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2014) e por organizações internacionais (CITES, 2012). Dentre as atividades antrópicas que mais atingem a conservação da espécie, estão os altos níveis de captura acidentais reportadas ao longo de toda a sua área de distribuição, degradação de habitat por poluentes, além de outros impactos (BERTOZZI & ZERBINI, 2002; ROSAS et al., 2002; BORDINO & ALBAREDA, 2004; SECCHI et al., 2004; CAPPOZZO et al., 2007; FRANCO-TRECU et al., 2009; NEGRI et al.,

2012; CREMER et al., 2016). Esta é a espécie de pequeno cetáceo mais ameaçada da costa Sudoeste do Atlântico (SECCHI et al., 2003a; REEVES et al., 2008).

Aspectos reprodutivos da toninha

A conservação de espécies sujeitas a altas taxas de mortalidade depende de um conhecimento adequado da sua dinâmica populacional, o que inclui diversas variáveis relativas ao processo reprodutivo (BERTOZZI, 2009). Os aspectos reprodutivos para *Pontoporia blainvillei*, como maturidade sexual e período reprodutivo, devem ser avaliados independentemente em cada área de manejo da espécie (FMA). Para FMA III (Rio Grande do Sul e Uruguai) e FMA IV (Argentina), há mais estudos acerca dos aspectos reprodutivos (HARRISON & BROWNELL, 1971; KASUYA & BROWNELL, 1979; HARRISON et al., 1981; BROWNELL, 1984; PINEDO et al., 1989; CORCUERA, 1996; DANILEWICZ et al., 2000; DANILEWICZ, 2003; DANILEWICZ et al., 2004; BOTTA, 2005; PANEBIANCO et al., 2012; NEGRI et al., 2014). Todavia para as áreas FMA I (Espírito Santo ao norte do Rio de Janeiro) e FMA II (São Paulo à Santa Catarina), tais estudos são mais escassos (RAMOS, 2000a, RAMOS, 2000b; ROSAS & MONTEIRO-FILHO, 2002; BERTOZZI, 2009).

O dimorfismo sexual é verificado ao longo de toda sua distribuição, com as fêmeas maiores que os machos (KASUYA; BROWNELL, 1979; PINEDO, 1991; RAMOS et al., 2000a; CRESPO, 2018). Dados sobre o ciclo reprodutivo e estimativas de idade e maturidade foram produzidos para algumas áreas de distribuição da toninha. Há indicação de um ciclo reprodutivo de dois anos para as fêmeas na costa do Uruguai (KASUYA; BROWNELL, 1979) e também para o litoral sul de São Paulo e Paraná (ROSAS & MONTEIRO-FILHO, 2002). Para o Rio Grande do Sul, o intervalo reprodutivo foi de 1,5 anos (DANILEWICZ et al., 2004) e 1,7 anos para o litoral central de São Paulo (BERTOZZI, 2009).

O período de gestação da *Pontoporia blainvillei* varia entre as áreas, sendo cerca de 10,5 a 12 meses para toninhas do Uruguai (KASUYA & BROWNELL, 1979; HARRISON et al., 1981), 11,2 meses para o Rio Grande do Sul (DANILEWICZ, 2003) e 10,2 a 10,6 meses para São Paulo e Paraná (ROSAS & MONTEIRO-FILHO, 2002; BERTOZZI, 2009). O comprimento total do neonato é reportado como superior a 70 cm e inferior a 85 cm para o Uruguai (KASUYA & BROWNELL, 1979; HARRISON et al., 1981); 71,2 cm a 72,5 cm para São Paulo e Paraná (ROSAS & MONTEIRO-FILHO, 2002; BERTOZZI, 2009); 73,4 cm para o Rio Grande do Sul (DANILEWICZ, 2003); 71 cm para o Rio de Janeiro (RAMOS et al., 2000a) e de 61 a 69 cm (média 64 cm) para a Argentina (DENUNCIO et al., 2013), porém este último com um número amostral baixo (n=15).

As fêmeas do Rio Grande do Sul apresentaram sazonalidade reprodutiva, com um padrão de nascimentos em pulso, iniciam em outubro e ocorrem até fevereiro, sendo que até 75% dos nascimentos podem ocorrer de outubro a dezembro (DANILEWICZ, 2003). Para o litoral central de São Paulo, Bertozzi (2009) e para o litoral sul de São Paulo e Paraná, Rosas e Monteiro-Filho (2002) reportaram sazonalidade de nascimentos semelhante à da área de distribuição ao sul, entre outubro e dezembro. No litoral do Rio de Janeiro não ocorreu sazonalidade, com ocorrência de nascimentos em todas as estações (RAMOS, 2000b; DI BENEDETTO & RAMOS, 2001). Os nascimentos ocorreram entre novembro e dezembro para o litoral do Uruguai (HARRISON et al., 1981; BROWNELL, 1984).

Não foi possível verificar mudanças sazonais no peso testicular e no diâmetro dos túbulos seminíferos dos machos no Rio Grande do Sul (DANILEWICZ et al., 2004), e foi comprovada atividade espermatogênica ao longo de todos os meses (BOTTA, 2005). Esses dados sugerem que alguns machos maduros permaneçam reprodutivamente ativos ao longo do ano, o que seria uma vantagem evolutiva para no caso destes encontrarem fêmeas em período ovulatório fora do período reprodutivo da espécie (DANILEWICZ et al., 2004). Rosas e Monteiro-Filho (2002) reportaram um aumento do peso testicular nos últimos meses do ano, porém não foi possível confirmar uma sazonalidade para a atividade testicular, associado ao pequeno número amostral para esta área. Nenhum estudo apresentou evidências de sazonalidade para os machos (KASUYA & BROWNELL, 1979; DANILEWICZ et al., 2004; BOTTA, 2005; SILVA, 2011). Panebianco et al. (2012) reforçou a hipótese de que as disputas entre machos pelas fêmeas em reprodução podem ser raras e de que não ocorre competição espermática, considerando o peso testicular baixo, o dimorfismo sexual reverso, as características sexuais secundárias inexistentes, além da ausência de cicatrizes de combates entre machos.

Estudos de dosagem hormonal em cetáceos

O conhecimento dos parâmetros e aspectos reprodutivos de muitos cetáceos ainda é escasso e muito do que se conhece tem sido obtido a partir de observações do trato reprodutivo de animais mortos, provenientes de encalhes ou de captura acidental (MANSOUR et al., 2002). Métodos como a dosagem hormonal de esteroides em diferentes matrizes (fezes, urina, tecido adiposo, leite e etc.) tem sido cada vez mais utilizados em pesquisas com mamíferos aquáticos (AMARAL, 2010; DE MELLO & OLIVEIRA, 2016). Essa abordagem possibilita determinar parâmetros reprodutivos, como o *status* de reprodução, taxa de prenhez, sazonalidade reprodutiva entre outros aspectos, em espécimes mantidos sob cuidados humanos (WEST et

al., 2000; ROBECK et al., 2005), bem como em populações selvagens (KELLAR et al., 2006; KELLAR et al., 2013a; TREGO et al., 2013; MELLO, 2014).

Os hormônios esteroides possuem afinidade pelo tecido adiposo e, portanto, acumulam-se neste tecido (DOLEZEL et al., 1991), o que torna a extração e dosagem de esteroides sexuais na gordura subcutânea de cetáceos factível. A metodologia tem sido utilizada em carcaças (MANSOUR et al., 2002; KELLAR et al., 2006; KELLAR et al., 2013a; TREGO et al., 2013) e em animais de vida livre por meio de biópsias (KELLAR et al., 2009; PÉREZ et al., 2011; KELLAR et al., 2014; MELLO, 2014). Kellar et al. (2006) apresentaram a colheita de amostras de biopsia de animais de vida livre como uma metodologia mais representativa da população, visto que realiza a amostragem do grupo. Essa dosagem vem auxiliando no monitoramento das taxas reprodutivas de populações de vida livre, permitindo a comparação dos níveis hormonais entre diferentes estágios de desenvolvimento e sexos, a determinação de possível sazonalidade reprodutiva e estado de prenhez (KELLAR et al., 2006; TREGO et al., 2013; KELLAR et al., 2013a; KELLAR, 2013b; MELLO, 2014; KELLAR et al., 2014). Sabe-se que os níveis de hormônios no tecido adiposo são refletidos pelos níveis séricos, e esse grau de incorporação possui diferentes taxas, influenciadas por perfusão, taxa de crescimento, atividade metabólica, entre outros (CHAMPAGNE et al., 2016).

A determinação do *status* reprodutivo, com distinção das fêmeas prenhes a partir dos níveis elevados de progesterona, foi reportado por MANSOUR et al. (2002), que utilizaram amostras de gordura de baleia minke (*Balaenoptera acutorostrata*) provenientes de caça e por KELLAR et al. (2006), também a partir de amostras de gordura de três espécies de golfinhos (*Delphinus delphis*, *Lissodelphis borealis* e *Lagenorhynchus obliquidens*) acidentalmente capturados. Trego et al. (2013) encontraram uma concentração de progesterona na gordura em fêmeas prenhes cerca de 164 vezes maior do que em não prenhes em *Delphinus capensis*, *Stenella attenuata*, *Stenella longirostris* e *Phocoenoides dalli*.

A relação entre os níveis de testosterona sérica e o estado de maturidade sexual foi reportado para cetáceos, mediante colheita de amostras *post mortem* e de indivíduos em cativeiro de *Phocoenoides dalli* (TEMTE, 1991), *Balaenoptera physalus* (KJELD et al. 1992), *Globicephala melas* (DESPORTES et al., 1994), *Delphinapterus leucas* (ROBECK et al., 2005) e *Delphinus delphis* (KELLAR et al., 2009).

No Brasil, ainda há escassez de estudos sobre reprodução que utilizam a extração e dosagem de hormônios esteroides em mamíferos aquáticos. Diversos estudos tem sido desenvolvidos com o peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*), com o monitoramento de andrógenos em amostras fecais, lacrimais, urinárias e salivares de machos (AMARAL et al.,

2009), avaliação da progesterona e estradiol salivar e fecal em fêmeas durante o ciclo ovariano (NASCIMENTO, 2004; AMARAL et al., 2013) e confirmação da sazonalidade reprodutiva em fêmeas por meio de dosagem hormonal em saliva e urina (AMARAL et al., 2014). Mello et al. (2017) mostraram a viabilidade da utilização de tecido adiposo de baleias jubarte (*Megaptera novaengliae*) para extração de hormônios esteroides sexuais.

Para a toninha, as informações sobre os parâmetros reprodutivos existentes foram obtidas a partir da análise macro e microscópica de gônadas de carcaças, provenientes de captura acidental ou encalhes. Embora a utilização da camada de gordura subcutânea de cetáceos para extração e dosagem de hormônios esteroides já tenha sido validada para diversas espécies, nenhum trabalho foi conduzido anteriormente com *Pontoporia blainvillei*. Os parâmetros hormonais são ferramentas complementares à compreensão das características reprodutivas dos espécimes de uma população, o que irá auxiliar na conservação dessa espécie ameaçada, e possivelmente, culmina na utilização desses dados como base para aplicação de outras biotécnicas reprodutivas.

O objetivo deste estudo foi validar o método de extração e mensuração de hormônios esteroides sexuais (testosterona e progesterona) em camada de gordura subcutânea de carcaças de toninha (*P. blainvillei*) em duas temperaturas de armazenamento, e descrever as relações entre as concentrações desses hormônios com parâmetros biológicos de sexo, maturidade gonadal, idade, estágio de desenvolvimento, comprimento total e ocorrência de prenhez.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, R.S., ROSAS, F. C. W., VIAU, P., D' AFFONSECA NETO, J. A., DA SILVA, V. M. F., DE OLIVEIRA, C. A. (2009). Noninvasive Monitoring of Androgens in Male Amazonian Manatee (*Trichechus inunguis*): Biologic Validation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(3), 458–465.

AMARAL, R. S. (2010). Use of Alternative Matrices to Monitor Steroid Hormones in Aquatic Mammals: A Review. *Aquatic Mammals*, 36 (2): 162-171.

AMARAL, R. S., ROSAS, F. C. W., DA SILVA, V. M. F., NICHI, M., OLIVEIRA, C. A. (2013). Endocrine monitoring of the ovarian cycle in captive female Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). *Animal Reproduction Science*, 142(1-2), 84–88.

AMARAL, R. S., ROSAS, F. C. W., DA SILVA, V. M. F., GRAHAM, L. H., VIAU, P., NICHI, M., & OLIVEIRA, C. A. (2014). Seasonal variation in urinary and salivary reproductive hormone levels in Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). *Reproduction, Fertility and Development*.

BERTOZZI, C. P. & ZERBINI, A. N. (2002). Incidental mortality of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in the artisanal fishery of Praia Grande, São Paulo State, Brazil. The Latin American Journal of Aquatic Mammals (special issue) 1 (1): 153-160.

BERTOZZI, C. P. Interação com a pesca: implicações na conservação da toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) no litoral do estado de São Paulo, SP. 2009. 189 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BOTTA, S. Reprodução e crescimento de machos de franciscana (*Pontoporia blainvillei*) do sul do Rio Grande do Sul, Brasil. 2005. 108 p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

BORDINO, P.; THOMPSON, G.; IÑIGUEZ, M. (1999). Ecology and behaviour of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Bahía Anegada, Buenos Aires, Argentina. J. cetacean res. manag., 1 (2): 213-222.

BORDINO, P. & ALBAREDA, D. (2004). Incidental mortality of Franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* in coastal gillnet fisheries in northern Buenos Aires, Argentina. Paper SC/56/SM11 presented at the International Whaling Commission Meeting, Sorrento, Italy, 19–22 July 2004.

BROWNELL, R.L. Review of reproduction in Platanistid dolphins. In: PERRIN, W. F.; BROWNELL, R. L.; DE MASTER, D. P. (Ed.) Reproduction in whales, dolphins and porpoises. Rep. Int. Whal. Comm., Spec. issue, n. 6, p. 149-158, 1984.

CAPPOZZO, H.L.; NEGRI, M.F.; PEREZ, F.H.; ALBAREDA, D.; MONZÓN, F.; CORCUERA, J.F. (2007). Incidental mortality of franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) en Argentina. LAJAM, 6 (2):127-137.

CHAMPAGNE, C.D.; KELLAR, N.M.; CROCKER, D.E.; WASSER, S.K.; BOOTH, R.K. (2016). Blubber cortisol qualitatively reflects circulating cortisol concentrations in bottlenose dolphins. Mar. mamm. sci., v. 33, p. 134-153.

CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Disponível em: <<http://www.cites.org/>>. Acesso em: 1 de março de 2018.

CORCUERA, J. Edad de madurez sexual del delfin franciscana em el sur de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Viñadel Mar: VII Reunion de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, Resumos. 1996, p. 39.

CRESPO, E. A.; HARRIS G.; GONZÁLEZ, R. (1998). Group size and distributional range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. Mar. mamm. sci., v. 14, p. 845-849.

CRESPO, E.A. 2002. Franciscana - *Pontoporia blainvillei*. p. 482-487. In: W.F. PERRIN, B. WÜRSIG & J.G.M. THEWISSEN, [Eds.], Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego, CA, USA.

CRESPO, E. A. (2018). Franciscana Dolphin. Encyclopedia of Marine Mammals, 388–392.

CREMER, M.J., BARRETO, A. S., MARANHO, A., DOMIT, C., BARBOSA, C.B., KOLESNIKOVAS, C.K.M., GROCH, K., DE OLIVEIRA, L. V., SANTOS, M. C.,

CASTILHO, P. V. & VALLE, R.R. (2016). High mortality of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in Brazil. Em: *Anais da XVII Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul (RT)*. Valparaíso, Chile.

CUNHA, H.A.; MEDEIROS, B.V.; BARBOSA, L.A.; CREMER, M.J.; MARIGO, J. et al. (2014) Population Structure of the Endangered Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*): Reassessing Management Units. PLOS ONE, v. 9, n. 1.

DANILEWICZ, D. S.; SECCHI, E. R.; OTT, P.H.; MORENO, I. B. Analysis of the age at sexual maturity and reproductive rates of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. (2000). *Comun. Mus. Cienc. Tecnol. PUCRS, ZOOL.*, v.13, p. 89 – 98.

DANILEWICZ, D. Reproduction of female franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Rio Grande do Sul, southern Brazil (2003). *LAJAM* 2(2): 67-78.

DANILEWICZ, D. S.; CLAVER, J. A.; CARRERA, A. L. P.; SECCHI, E. R.; FONTOURA, N.F. (2004). Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia: Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Fish. bull. (Wash. D.C.)*, v. 102, p. 581-592.

DENUNCIO, P.E., BASTIDA, R.O., DANILEWICZ, D., MORON, S., RODRÍGUEZ-HEREDIA, S., RODRÍGUEZ, D.H. (2013). Calf chronology of the franciscana dolphin: birth, lactation and onset on feeding ecology in coastal waters of Argentina. *Aquatic Mammals* 39, 73–80.

DE MELLO, D. M. D. & DE OLIVEIRA, C. A. (2016). Biological matrices for sampling free-ranging cetaceans and the implications of their use for reproductive endocrine monitoring. *Mammal Review*, 46(2), 77–91.

DESPORTES, G.; SABOUREAU, M.; LACROIX, A. (1994) Growth-related changes in testicular mass and plasma testosterone concentrations in long-finned pilot whales, *Globicephala melas*. *Reproduction*, 102 (1): 237–244.

DI BENEDITTO, A.P.M., RAMOS, R.M.A. Biology and conservation of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in the north of Rio de Janeiro State, Brazil *J. CETACEAN RES. MANAGE.* 3(2):185–192, 2001

DO AMARAL, K. B., DANILEWICZ, D., ZERBINI, A., DI BENEDITTO, A. P., ANDRIOLO, A., ALVARES, D. J., SECCHI, E.; FERREIRA, E.; SUCUNZA, F.; BORGES-MARTINS, M.; SANTOS, M.C.O.; CREMER, M.; DENUNCIO, P.; OTT, P.H.; MORENO, I. B. (2018). Reassessment of the franciscana *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) distribution and niche characteristics in Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 508, 1–12.

DOLEZEL, R.; KUDLAC, E.; NEDBALKOVA, J. (1991). Morphology of the reproductive tract and serum progesterone concentrations in cows within 45 days after parturition. *Acta Veterinaria Brno*, v. 60, p. 181–192.

FRANCO-TRECU, V.; COSTA, P.; ABUD, C.; DIMITRIADIS, C.; LAPORTA, P.; PASSADORE, C.; SZEPHEGY, M. (2009). Bycatch of franciscana *Pontoporia blainvillei* in

uruguayan artisanal gillnet fisheries: an evaluation after a twelve-year gap in data collection. *Lat. Am. J. Aquat. Mamm.*, 7 (1-2): 11-22.

GARIBOLDI, M.C., TÚNEZ, J.I., DEJEAN, C.B., FAILLA M., VITULLO, A.D., NEGRI, M.F., CAPOZZO, H.L. (2015) Population Genetics of Franciscana Dolphins (*Pontoporia blainvillei*): Introducing a New Population from the Southern Edge of Their Distribution. *PLoS ONE* 10(7): e0132854.

GARIBOLDI, M. C., TÚNEZ, J. I., FAILLA, M., HEVIA, M., PANEBIANCO, M. V., VIOLA, M. N. P., VITULLO, A.D., CAPOZZO, H. L. (2016). Patterns of population structure at microsatellite and mitochondrial DNA markers in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Ecology and Evolution*, 6(24), 8764–8776.

GERVAIS, P. & D'ORBIGNY, A. (1844). *Mammalogie*. Bulletin de la Société Philomathique, Paris, April 27, 1844:38--40.

HARRISON, R. J.; BROWNELL, R. L. (1971). The gonads of the South American dolphins, *Inia geoffrensis*, *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis*. *J. MAMMAL.*, 52 (2): 413-419.

HARRISON, R. J.; BRYDEN, M. M.; MCBREARTY, D. A.; BROWNELL, R. L. (1981). The ovaries and reproduction in *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Platanistidae). *J. LINN. SOC. LOND. ZOOL.*, v. 193, p. 563-580.

ICMBio (2010). Plano de ação nacional para a conservação do pequeno cetáceo Toninha: *Pontoporia blainvillei*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

KASUYA, T.; BROWNELL, R. L. (1979). Age determination reproduction and growth of the Franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Sci. Rep. Whales Res. Inst.* v. 31, p. 45-67.

KELLAR, N. M., TREGO, M. L., MARKS, C. I., DIZON, A. E. (2006). Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. *Marine Mammal Science*, 22 (1): 1-16.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; MARKS, C. I.; CHIVERS, S. J.; DANIL, K.; ARCHER, FREDERICK I. (2009). Blubber testosterone: A potential marker of male reproductive status in short- beaked common dolphins. *Marine Mammal Science*, 25 (3): 507–522.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; CHIVERS, S. J.; ARCHER, F. I. (2013a). Pregnancy patterns of pantropical spotted dolphins (*Stenella attenuata*) in the eastern tropical Pacific determined from hormonal analysis of blubber biopsies and correlations with the purse-seine tuna fishery. *Marine Biology*, 160 (12): 3113–3124.

KELLAR, N. M.; KELIHER, J.; TREGO, M. L.; CATELANI, K. N.; HANNS, C.; CRAIG, J. C; ROSA, C. (2013b). Variation of bowhead whale progesterone concentrations across demographic groups and sample matrices. *Endangered Species Research*, v. 22, p. 61–72.

KELLAR, N.; TREGO, M.; CHIVERS, S. (2014). From Progesterone in Biopsies to Estimates of Pregnancy Rates: Large Scale Reproductive Patterns of Two Sympatric Species of Common Dolphin, *Delphinus* spp. off California, USA and Baja, Mexico. *Bulletin, Southern California Academy of Sciences*, 113 (2): 58–80.

- KJELD, J. M., SIGURJONSSON, J.; ARNASON, A. (1992). Sex hormone concentrations in blood serum from the North Atlantic fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Journal of Endocrinology*, 134 (3):405-413.
- MANSOUR, A. A. H.; MKAY, D. W.; LIEN, J.; ORR, J. C.; BANOUB, J. H.; OIEN, N.; STENSON, G. (2002). Determination of pregnancy status from blubber samples in Minke Whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Marine Mammal Science*, 18 (1): 112–120.
- MELLO, D. M. D. Uso de gordura subcutânea como matriz na dosagem de esteroides sexuais em baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*). 2014. 160 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- MELLO, D.; COLOSIO, A.; MARCONDES, M.; VIAU, P.; OLIVEIRA, C. (2017). Feasibility of using humpback whale blubber to measure sex hormones. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 486, p. 32- 41.
- MENDEZ, M., ROSENBAUM, H.C., WELLS, R.S., STAMPER, A., BORDINO, P. (2010) Genetic evidence highlights potential impacts of by-catch to cetaceans. *PLoS ONE* 5(12): e15550.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente. Portarias nº 444/2014 e nº 445/2014, 17 de dezembro de 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>>. Acesso em: 21.fev.2018.
- MOURA, J.F.; RODRIGUES, E.S; SHOLL, T.G.C.; SICILIANO, S. (2009). Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) on the north-east coast of Rio de Janeiro State, Brazil, record during a long term monitoring programme. *Marine Biodiversity Records*, v. 2, p. 1-4.
- NASCIMENTO, C.C. Avaliação da função reprodutiva de fêmea de peixe-boi da Amazônia (*Trichechus inunguis*) mantidas em cativeiro, por meio da extração e dosagem de esteróides fecais. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- NEGRI, M.F.; DENUNCIO, P.; PANEBIANCO, M.V.; CAPPOZZO, H.L. (2012). Bycatch of franciscana dolphins *Pontoporia blainvillei* and the dynamics of artisanal fisheries in the species Southern most area of distribution. *Brazilian Journal of Oceanography*, 60 (2): 149-158.
- NEGRI, M. F., PANEBIANCO, M. V., DENUNCIO, P., PASO VIOLA, M. N., RODRÍGUEZ, D., CAPPOZZO, H. L. (2014). Biological parameters of franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei*, by-caught in artisanal fisheries off southern Buenos Aires, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(04), 821–829.
- OTT, P. H.; SECCHI, E. R.; MORENO, I. B.; DANILEWICZ, D.; CRESPO, E. A.; BORDINO, P.; RAMOS, R.; DI BENEDITTO, A. P.; BERTOZZI, C.; BASTIDA, R.; ZANELATTO, R.; PEREZ, J. & KINAS, P. G. (2002). Report of the working group of fishery interactions. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 1(1):55-64.
- PANEBIANCO, M. V., NEGRI, M. F., CAPPOZZO, H. L. (2012). Reproductive aspects of male franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off Argentina. *Animal Reproduction Science*, 131(1-2), 41–48.

PINEDO, M. C.; PRADERI, R.; BROWNELL, R. L. Jr.(1989). Review of the biology and status of the franciscana *Pontoporia blainvillei* (Gervais e D' Orbigny, 1844). In: PERRIN, W. F.; BROWNELL, R. L. Jr.; KAIYA, Z.; JIANKANG. L. (Ed.). Biology and Conservation of the River Dolphins. Hong Kong: IUCN. p. 46-51.

PINEDO, M. C. Development and Variation of the Franciscana, *Pontoporia blainvillei*.1991. 406 p. Ph. D. Dissertation (Doutorado em Biologia) - University of California, 1991.

PÉREZ, S.; GARCÍA-LÓPEZ, Á.; STEPHANIS, R.; GIMÉNEZ, J.; GARCÍA-TISCAR, S.; VERBORGH, P.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, G. (2011). Use of blubber levels of progesterone to determine pregnancy in free-ranging live cetaceans. Marine Biology, 158 (7): 1677–1680.

RAMOS, R. M. A.; DI BENEDITTO, A. P. M.; LIMA, N. R. W. (2000a). Relationship between dental morphology, sex, body length and age in *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in Northern Rio de Janeiro, Brazil. Ver. Bras. Biol., 60 (2): 283-290.

RAMOS, R. M. A., DI BENEDITTO, A. P. M., LIMA, N. T. W. (2000b). Growth parameters of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. Aquatic Mammals 2000, 26.1, 65–75

REEVES, R. R.; DALEBOUT, M. L.; JEFFERSON, T. A.; KARCZMARSKI, L.; LAIDRE, K.; O'CORRY-CROWE, G.; ROJAS-BRACHO, L.; SECCHI, E. R.; SLOOTEN, E.; SMITH, B. D.; WANG, J. Y. ; ZERBINI, A. N.; ZHOU, K. *Pontoporia blainvillei*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. 2008.

ROBECK, T. R.; MONFORT, S. L.; CALLE, P. P.; DUNN, J. L.; JENSEN, E.; BOEHM, J. R.; YOUNG, S.; CLARK, S. T. (2005). Reproduction, Growth and Development in Captive Beluga (*Delphinapterus leucas*). Zoo Biology, 24 (1): 29–49.

ROSAS, F.C.W.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. (2002). Reproductive parameters of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae), on the coast of São Paulo and Paraná States, Brazil. Mammalia, 66 (2): 231-245.

ROSAS, F.C.W.; MONTEIRO FILHO, E.L.A.; OLIVEIRA. M.R. (2002). Incidental catches of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) on the southern coast of São Paulo State and the coast of Paraná State, Brazil. LAJAM 1(1): 161-168.

SECCHI, E.R.; WANG, J. Y.; MURRAY, B.; ROCHA-CAMPOS, C. C.; WHITE, B. N. (1998). Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. Can. j. zool., v. 76, p. 1622-1627.

SECCHI, E.R.; OTT, P.H.; DANILEWICZ, D. (2003a). Effects of fishing bycatch and the conservation status of the Franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. p. 174-191. In: Gales, N.; Hildell, M.; Kirkwood, R. (Eds) Marine mammals: fisheries, tourism and management issues. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

SECCHI, E. R.; DANILEWICZ, D.; OTT, P.H. (2003b). Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implication to meet management objectives. J. cetacean res. manag., 5 (1):61-68.

SECCHI, E. R.; KINAS, P. G.; MUELBERT, M. (2004). Incidental catches of franciscana in coastal gillnet fisheries in the Franciscana Management Area III: period 1999 – 2000. Lat. Am. j. aquat. mamm., v. 3, p. 61-68.

SICILIANO, S. (1994). Review of small cetaceans and fishery interactions in coastal waters of Brazil. In: Perrin, W. F.; Donovan, G. P.; Barlow, J. (Ed.) Gillnets and cetaceans. Rep. Int. Whal. Comm., Spec. issue, n. 15, p. 241-250.

SICILIANO, S.; DI BENEDITTO, A.P.M.; RAMOS, R.M.A. (2002). A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae), nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterização dos habitats e fatores de isolamento das populações. Bol. Mus. Nac., Zool., v. 476, p. 1-15.

SILVA, D.F. Biologia reprodutiva de Toninha, *Pontoporia blainvillei* (GERVAIS & D'ORBIGNY, 1844) (MAMMALIA, CETACEA), no litoral Sul de São Paulo e norte do Paraná. 2011. 128 p. Dissertação de mestrado em Zoologia (Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências- Rio Claro.

TEMTE, J.L. (1991). Use of serum progesterone and testosterone to estimate sexual maturity in Dall's porpoise *Phocoenoides dalli*. Fish Bull 89:161–166.

TREGO, M. L.; KELLAR, N. M.; DANIL, K. (2013) Validation of blubber progesterone concentrations for pregnancy determination in three dolphin species and a porpoise. PLOS One, 8 (7): e69709.

TRIMBLE, M. & R. PRADERI. 2006. What is the color of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*)?: a review and a proposed assessment method. Latin American Journal of Aquatic Mammals. 5(1):55-63.

WEST, K. L.; ATKINSON, S.; CARMICHAEL, M. J.; SWEENEY, J. C.; KRAMES, B.; KRAMES, J. (2000). Concentrations of progesterone in milk from bottlenose dolphins during different reproductive states. General and Comparative Endocrinology, 117(2): 218–24.

ZERBINI, A.N., SECCHI, E., CRESPO, E., DANILEWICZ, D.; REEVES, R. 2017. *Pontoporia blainvillei* (errata version published in 2018). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e. T17978A123792204. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T17978A50371075.en>. Downloaded on 24 February 2019.

CAPÍTULO 1

Validação laboratorial da dosagem de progesterona e testosterona em camada de gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla; Pontoporiidae).

Validação laboratorial da dosagem de progesterona e testosterona em camada de gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla; Pontoporiidae).

RESUMO

A dosagem hormonal em diferentes matrizes (fezes, urina, tecido adiposo, leite, saliva, borribo) tem sido cada vez mais utilizada em mamíferos aquáticos para determinar parâmetros reprodutivos, como o *status* de reprodução, taxa de prenhez e sazonalidade. Os cetáceos possuem uma camada de gordura subcutânea denominada *blubber*, que tem sido utilizado como matriz para extração e dosagem de hormônios esteróides sexuais. O objetivo deste estudo foi validar o método de extração e mensuração de testosterona e progesterona em camada de gordura subcutânea de carcaças de toninha (*P. blainvillei*) armazenadas a -20°C e a -196°C por um ano. As amostras foram colhidas de carcaças frescas ou moderadamente decompostas provenientes de encalhe do litoral de São Paulo, sudeste do Brasil. Foi realizada a colheita de fragmentos da região dorso-lateral esquerda e armazenados simultaneamente em freezer a -20°C e em nitrogênio líquido (-196°C) totalizando 56 amostras de 28 espécimes. A extração hormonal foi realizada com modificações a partir do método descrito anteriormente por enzimaímunoensaio para progesterona e testosterona. O coeficiente de variação inter-ensaio foi de 6,89% para progesterona e 1,67% para testosterona, o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 7,82% para progesterona e 3,29% para testosterona. O teste de acurácia obteve o valor de declive próximo a 1 para progesterona e para testosterona 0,51 e o ensaio de progesterona ($F_{1,5} = 0,87$; $p = 0,45$) e da testosterona ($F_{1,5} = 3,79$; $p = 0,11$) apresentou paralelismo. A eficiência média de extração foi de 66% para progesterona e 70% para testosterona. Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de progesterona nas duas temperaturas de armazenamento em ng/g de amostra ($p = 0,963$; $df = 54$; $t = 0,04$), em ng/mg de lipídeo ($p = 0,74$; $df = 54$; $t = 0,33$) nem entre as concentrações de testosterona em ng/g de amostra ($p = 0,1127$; $df = 54$; $t = 1,61$) e em ng/mg de lipídeo ($p = 0,10$; $df = 54$; $t = 1$). O método de extração e análise hormonal apresentou-se viável para *P. blainvillei*, o acondicionamento de amostras nas duas temperaturas não revelou diferenças na mensuração hormonal e as duas unidades de concentração de hormônio foram equivalentes.

Palavras-chave: Odontoceti; Extração; Análise hormonal; Esteroides sexuais; Tecido adiposo; Enzimaímunoensaio.

1. INTRODUÇÃO

A toninha ou franciscana (*Pontoporia blannvillei*) (GERVAIS & D'ORBIGNY, 1844) é um pequeno odontoceto, endêmico da costa leste da América do Sul (CRESPO, 2018) e está listada como “vulnerável” (ZERBINI et al., 2017) ou “criticamente ameaçada” (CITES, 2012; MMA, 2014). As informações sobre os parâmetros reprodutivos existentes para a espécie foram obtidas a partir da análise macro e microscópica de gônadas de carcaças provenientes de captura acidental ou encalhes (HARRISON et al., 1981; ROSAS & MONTEIRO-FILHO, 2002; BERTOZZI, 2009; DANILEWICZ, 2003; DANILEWICZ et al., 2004).

A dosagem hormonal em diferentes matrizes, tais como fezes, urina, tecido adiposo, leite, saliva, borriço, entre outros, tem sido cada vez mais utilizada em pesquisas com mamíferos aquáticos, de maneira alternativa ao soro e plasma, visto que a colheita de sangue é mais invasiva ou até impraticável para espécimes de vida livre (AMARAL, 2010; DE MELLO & OLIVEIRA, 2016). Essa abordagem possibilita determinar parâmetros reprodutivos, como o *status* de reprodução, taxa de prenhez e sazonalidade para espécimes mantidos sob cuidados humanos (WEST et al., 2000; ROBECK et al., 2005), bem como em espécimes de vida livre (KELLAR et al., 2006; KELLAR et al., 2013a; TREGO et al., 2013; MELLO, 2014).

Os cetáceos possuem uma camada de gordura subcutânea de espessura variável denominada *blubber*, a qual funciona como reserva energética, isolante térmico e auxilia na hidrodinâmica e na flutuabilidade (KOOPMAN et al., 2002). É um tecido firme, resistente e fibroso, com teor lipídico variável e baixa densidade devido a sua composição de adipócitos, cercados e mantidos por uma malha de fibras colágenas e elastina (IVERSON, 2009). Os hormônios esteroides séricos possuem uma grande afinidade pelo tecido adiposo, acumulando-se neste tecido (DOLEZEL et al., 1991; CHAMPAGNE et al., 2016).

O *blubber* tem sido utilizado como matriz para extração e dosagem de hormônios esteróides sexuais em diversas espécies de cetáceos (MANSOUR et al., 2002; KELLAR et al., 2006; PÉREZ et al., 2011; KELLAR et al., 2013a; TREGO et al., 2013; MELLO, 2014). A distinção de fêmeas prenhes e não prenhes pelos níveis de progesterona na gordura foi factível para odontocetos (KELLAR et al., 2006; TREGO et al., 2013) e mysticetos (MANSOUR et al., 2002). A viabilidade da utilização de tecido adiposo de baleias-jubarte (*Megaptera novaengliae*) para extração de hormônios esteroides sexuais foi reportada por Mello et al. (2017). Os autores concluíram que existe uma diferença significativa entre amostras frescas e em decomposição, em que carcaças mais decompostas apresentaram níveis hormonais mais elevados, bem como a região da nadadeira dorsal, a camada externa de gordura e as amostras de menor alíquota. Desse modo, demonstram a importância da padronização de variáveis

amostrais como local de colheita e estado de decomposição do *blubber* para evitar imprecisões nos resultados.

A maioria dos estudos conduzidos com a matriz gordura em cetáceos relata o armazenamento das amostras a -20°C (KELLAR et al., 2006; KELLAR et al., 2009; TREGO et al., 2013; MELLO et al., 2017; PALLIN et al., 2018) para dosagem hormonal. O congelamento a -20°C implica na formação de cristais intracelulares, que destroem as células (PEGG, 2007), oferecendo um risco de alteração nas medidas das concentrações hormonais do *blubber* dos cetáceos. Todavia o nitrogênio líquido (-196°C) é empregado na criopreservação para manter a integridade estrutural de células (OZKAVUKCU, 2002; PEGG, 2007), apresentando maior confiabilidade na preservação de amostras biológicas.

Os imunoensaios realizados em diferentes espécies e matrizes devem ser cuidadosamente validados por meio de teste de paralelismo e acurácia. O teste de paralelismo analisa se o metabólito hormonal liga-se com afinidade ao anticorpo, bem como ocorre fisiologicamente. O teste de acurácia analisa se é possível distinguir níveis hormonais elevados de níveis baixos com precisão nas diversas diluições (HUNT et al., 2013).

Embora a utilização da camada de gordura subcutânea de cetáceos para extração e dosagem de hormônios esteroides já tenha sido realizada para diversas espécies, nenhum trabalho foi conduzido anteriormente para a única espécie da família Pontoporiidae, o menor cetáceo da América do Sul. O conhecimento dos parâmetros hormonais está diretamente relacionado a compreensão da eficiência reprodutiva dos espécimes de uma população, o que pode auxiliar na conservação dessa espécie ameaçada, e possivelmente, culmina na utilização desses dados como base para aplicação de outras biotécnicas reprodutivas.

Assim, o objetivo deste estudo foi validar o método de extração e mensuração de hormônios esteroides sexuais (testosterona e progesterona) em camada de gordura subcutânea de carcaças de toninha (*Pontoporia blainvillei*) e analisar possíveis alterações nas concentrações de hormônios em amostras armazenadas a -20°C em relação a -196°C por um ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Amostras de gordura subcutânea de *P. blainvillei* foram colhidas e cedidas pelo Instituto Biopesca, organização não-governamental, que realiza desde 1998 o monitoramento de capturas acidentais e encalhes de golfinhos e tartarugas marinhas no litoral do estado de São Paulo. As carcaças de toninhas provenientes de encalhe (n=28) foram recolhidas pela equipe

do Biopesca nos municípios de Praia Grande (24°00'20" S; 46°24'10" O), Mongaguá (24°05'35" S; 46°37'14" O), Itanhaém (24°10'59" S; 46°47'20" O) e Peruíbe (24°19'12" S; 46°59'53" O) entre julho de 2017 e junho de 2018 (Figura 2). O Instituto Biopesca é uma das instituições executoras do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS), que recolhe carcaças e animais marinhos vivos encalhados na faixa de areia. Consiste em uma atividade desenvolvida para o atendimento de condicionante do licenciamento ambiental federal, para produção e escoamento de petróleo e gás natural no Polo Pré-sal da Bacia de Santos, conduzido pelo IBAMA.

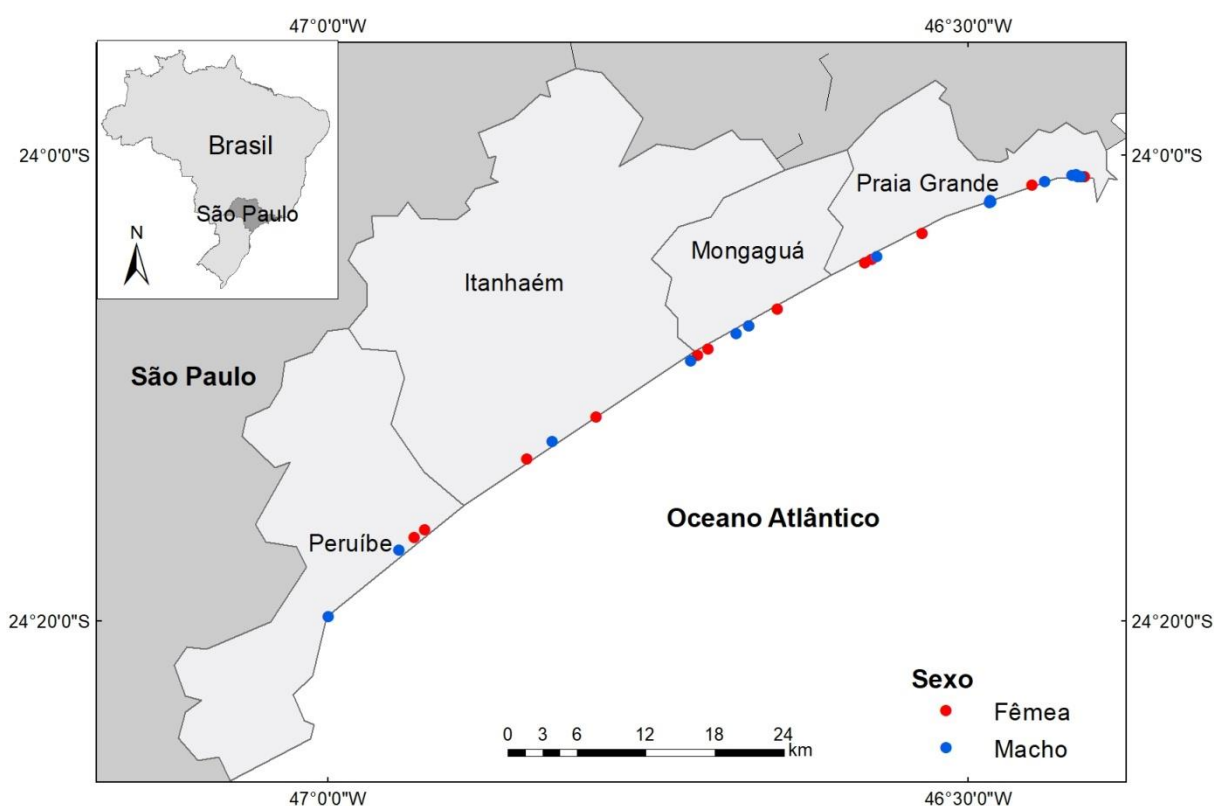


FIGURA 2. Área de estudo localizada no litoral do estado de São Paulo, Brasil, nos municípios de Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém e Peruíbe. As fêmeas (n=13) estão representadas pelos pontos vermelhos e os machos (n=15) pelos pontos azuis.

Os espécimes foram encaminhados para fotodocumentação, biometria corporal, avaliação do código de decomposição e exame necroscópico. Somente carcaças código 2 (fresca) e 3 (moderadamente decomposta) (GERACI & LOUNSBURY, 2005) foram selecionadas para a extração e mensuração dos hormônios. O estágio de desenvolvimento foi determinado pelo comprimento total, conforme Bertozzi et al. (2010) para população FMA II do litoral de São Paulo, onde filhote (ou feto) é menor que 90 cm, macho adulto a partir de 107,83 cm, fêmea adulta a partir de 119 cm e juvenil com comprimento entre o limiar superior de filhote e inferior de adulto.

Durante a necropsia, foi realizada a medida da espessura da camada de gordura e colheita de fragmento com pele da região dorso-lateral esquerda, caudalmente a escápula esquerda. Fragmentos de cerca de 5 x 5 cm foram colhidos desta região (Figura 3), aliquotados em microtubos de 2 mL e armazenados simultaneamente em freezer a -20°C e em nitrogênio líquido (-196°C) totalizando 56 amostras de 28 espécimes: 1 fêmea adulta, 6 fêmeas juvenis e 6 fêmeas filhotes e 3 machos adultos; 5 machos juvenis e 7 machos filhotes.

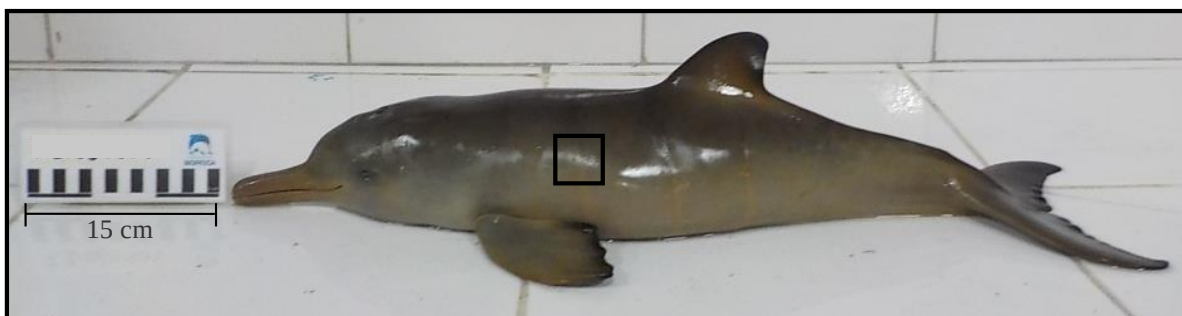


FIGURA 3. Região da colheita de camada de gordura subcutânea com pele de carcaça de *Pontoporia blainvillei*: região dorso-lateral esquerda, caudalmente a escápula esquerda (destaque no quadrado preto).
Fonte: Instituto Biopescas.

2.2 Extração hormonal

A extração hormonal foi realizada a partir do método descrito por Kellar et al. (2006) e modificado por Mello et al. (2017). Realizou-se a extração das amostras piloto, e no término foi observado a permanência de vestígios lipídicos no tubo. Portanto, para este estudo foi realizada mais uma modificação do protocolo, a incorporação de uma terceira ressuspensão com hexano no final do processamento.

As amostras de tecido acondicionadas em freezer a -20°C e em nitrogênio líquido (-196°C) foram clivadas para posterior processamento. Porém, anteriormente à clivagem, as amostras em nitrogênio foram mantidas por 10 minutos em freezer a -40°C e a partir desta etapa foram submetidas ao mesmo método de extração.

Todas as amostras foram clivadas da camada próxima à pele em fragmentos de 60 a 75 mg e adicionadas a microtubos contendo 1000 µL de etanol e cerca de 1g de “Garnet Bulk Beads”® de 0,7 mm (contas de pedra granada - *beads*). Foram homogeneizadas em aparelho OmniBeadRuptor® em 5 ciclos de 2 etapas cada, com velocidade de 5.5 m/s e intervalos de 45 segundos entre as etapas. A cada ciclo, foi realizado o resfriamento das amostras por cerca de 5 minutos. Em seguida, a solução homogeneizada foi transferida para um novo tubo, já sem os *beads* e adicionado 2000 µL de solução 4:1 de etanol acetona. Esta foi agitada no aparelho vortex (Multi-Tube Vortexer DVX-2500; VWR®) por 7 minutos a uma velocidade de 2200 rpm e posteriormente levada à centrífuga (Centrifuge 5403, Eppendorf®) 3 G (4850 rpm), por

15 minutos, sendo no final o sobrenadante transferido para um novo tubo. A solução foi levada ao fluxo de ar para secagem em banho-maria a 45°C e então ocorreu a separação dos lipídeos do resto do tecido. O peso do lipídeo foi determinado pela diferença entre o peso do tubo com o lipídeo e deste vazio (mensurado antes do início do processo de extração em balança de precisão).

Após esta etapa, foi adicionado 2000 µL de éter ao tubo e levado novamente ao aparelho vortex por 7 minutos a uma velocidade de 2500 rpm. A solução foi centrifugada (3 G por 15 minutos) e o sobrenadante rapidamente transferido para um novo tubo, e seco em fluxo de ar em banho-maria a 45°C.

O resíduo foi ressuspensão em 1000 µL de acetonitrila e levado ao aparelho vortex por 7 minutos (velocidade de 2500 rpm). Após a diluição de 1000 µL de hexano, o tubo foi levado novamente ao aparelho vortex (7 minutos, 2000 rpm) e posteriormente à centrifuga (3 G durante 10 minutos). A camada de acetonitrila foi aspirada para um novo tubo e estes procedimentos foram repetidos, totalizando 3 ressuspensões em hexano para retirar a porção lipídica e gerar mais pureza a amostra. A porção final de acetonitrila foi transferida a um novo tubo e evaporada em fluxo de ar em banho-maria (45°C) e o extrato foi congelado a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

2.3 Análise hormonal

Os extratos das amostras foram suspensos uma hora antes do início das dosagens em 1000 µL de tampão fosfato-salino (PBS) para a dosagem de testosterona e de progesterona. Após 15 min em aparelho vortex a 2500 rpm, 300 µL deste volume foram adicionados a mais 300 µL de PBS para a dosagem de progesterona.

Para a dosagem dos dois hormônios foi empregada a técnica de ensaio imunoenzimático (EIE) utilizando-se kits comerciais (Enzo Life Sciences®). O kit de EIE para testosterona foi desenvolvido para uma ampla gama de matrizes biológicas - como cultura tecidual, saliva e urina humana, soro e plasma suíno. O kit de EIE para progesterona não informa restrições de uso em matrizes específicas, utilizando exemplos de mensuração em meios de cultura tecidual, saliva e soro humano.

Os protocolos dos kits fornecidos pelos fabricantes foram seguidos sem modificações. Os controles de qualidade branco (Blank), atividade total (TA), ligação não específica (NSB) e sinal máximo (B0) foram incluídos em todas as placas. De acordo com as orientações do fabricante, as sensibilidades dos ensaios para a progesterona e testosterona são 8,57 pg/mL e 5,67 pg/mL, respectivamente. Os limites das curvas de detecção são 15,62-500 pg/mL para

progesterona e 7,81-2000 pg/mL para testosterona. As reações cruzadas do kit de progesterona fornecidos no manual do produto são 100% para progesterona e 5 α -pregnano-3.20-dione, 3,46% para 17-OH-progesterona, 1,43% para 5-pregnen-3 β -o1-20-ona, 0,77% para corticosterona, 0,28% para 4-androstene-3.17-diona, 0,056% para deoxicorticosterona, 0,013% para DHEA e menor que 0,001% para 17 β -estradiol, estrona, estriol, testosterona, hidrocortisona, 5 α -pregnano-3.20 α -diol e danazol. As reações cruzadas do kit de testosterona são 100% para testosterona, 14,6% para 19-hidroxitestosterona, 7,20% para androstendiona, 0,72% para deidroepiandrosterona, 0,40% para estradiol e menor que 0,001% para dihidrotestosterona, estriol, aldosterona, corticosterona, cortisol, cortisona, estrona, progesterona e pregnolona. O coeficiente de variação intra-ensaio para progesterona descrito no manual do kit foi de 4,9 a 7,6% e inter-ensaio de 2,7 a 6,8%. Para testosterona, o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 7,8 a 10,8% e inter-ensaio de 9,3 a 14,6%.

2.4 Paralelismo, controles e eficiência de extração

Todas as amostras, padrões e controles foram ensaiados em duplicata. Amostras que exibiram resultados com coeficiente de variação (CV) maior que 30% foram mensuradas novamente. Um *pool* de amostras com baixas concentrações de hormônio foi medido no final de cada placa. As amostras que mostraram resultados fora do intervalo da curva padrão foram diluídas até 32 vezes para a progesterona (1:32) e quatro vezes para testosterona (1:4) e mensuradas novamente. O teste de paralelismo consistiu na diluição progressiva de um *pool* de amostras na mesma proporção que a diluição dos pontos da curva padrão dos kits (fator de dois para progesterona e fator de quatro para testosterona). A eficiência de extração foi mensurada adicionando quantidades conhecidas de hormônio (25 e 12,5ng para progesterona e 25; 12,5 e 6,25 ng para testosterona) e adicionadas a uma amostra de baixa concentração hormonal. Após a leitura das placas, a eficiência de extração foi determinada subtraindo os resultados obtidos de amostras com quantidade de hormônio conhecida pelas amostras sem hormônio e dividindo pela quantidade inicial de hormônio adicionado.

2.5 Unidades utilizadas

Todas as mensurações foram calculadas e as análises estatísticas foram realizadas em duas unidades de concentração de hormônio: nanograma de hormônio por grama de amostra (ng/g) e em nanograma de hormônio por miligrama de lipídeo extraído (ng/mg). A unidade ng/g refletiu a quantidade de hormônio em gordura subcutânea homogeneizada; e ng/mg refletiu a quantidade de hormônio em lipídeo extraído.

2.6 Análise estatística

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição das concentrações obtidas. O teste de Levene foi empregado para avaliação da homocedasticidade das variâncias das concentrações médias obtidas. O teste *t* de Student foi utilizado para a comparação das médias das amostras armazenadas nas duas temperaturas, visto que as variâncias foram homocedásticas. O teste F verificou o paralelismo entre as variâncias das amostras diluídas e as curvas padrão dos kits, e a acurácia foi verificada por análise de regressão, comparando a atividade da linha de tendência das doses esperadas e observadas.

Todas as comparações estatísticas neste estudo foram consideradas significativas a $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus®2016) para os testes de paralelismo e acurácia, e Statistica versão 7.0 (StatSoft®) para as demais análises.

3. RESULTADOS

3.1. Paralelismo e eficiência da extração

O coeficiente de variação inter-ensaio dos *pools* de amostras foi de 6,89% para progesterona e 1,67% para testosterona. O valor médio do coeficiente de variação intra-ensaio foi de 7,82% para progesterona e 3,29% para testosterona. Apenas uma amostra apresentou coeficiente de variação acima de 30% durante as dosagens de progesterona e foi dosada novamente. Em relação ao teste de acurácia, obteve-se o valor de declive próximo a 1 (Gráfico 1) para progesterona, indicando uma relação linear positiva entre as doses observadas e esperadas. Para testosterona o valor foi de 0,51, com menor precisão, porém ainda dentro do expectável (Gráfico 2). O ensaio de progesterona apresentou excelente paralelismo ($F_{1,5}=0,87$; $p=0,45$) (Gráfico 3) e o da testosterona produziu resultados aceitáveis ($F_{1,5}=3,79$; $p=0,11$) (Gráfico 4), demonstrando que ambos mensuraram os hormônios alvo em diferentes concentrações. A eficiência de extração média para progesterona foi de 66% e para testosterona foi de 70%.

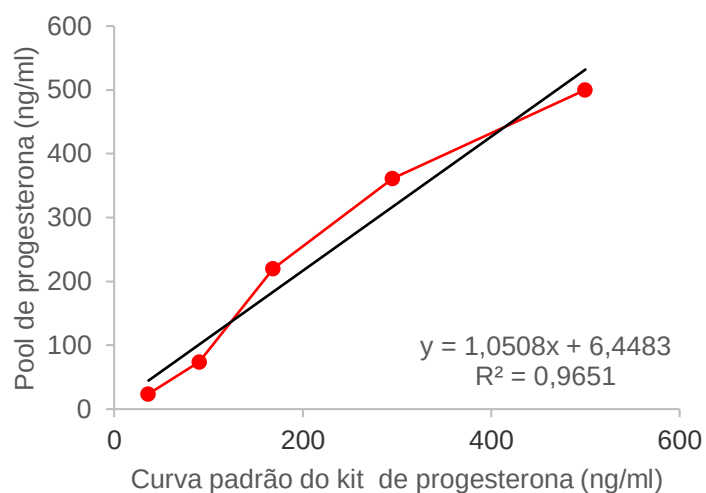


GRÁFICO 1. Teste de acurácia entre os pontos da curva padrão do kit e *pools* de amostras diluídas para progesterona.

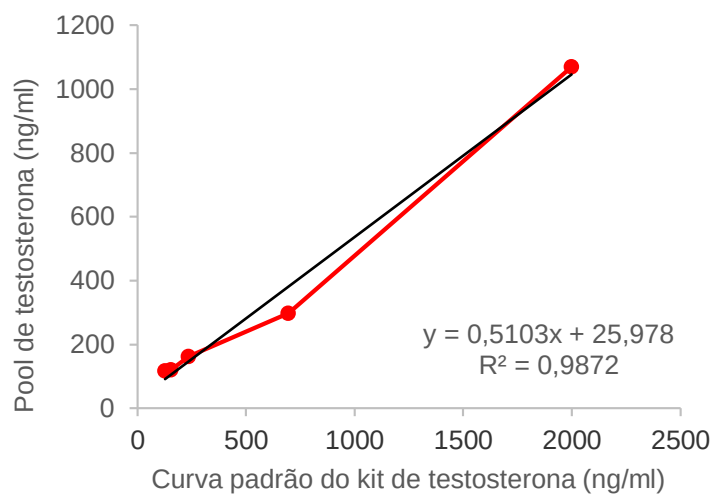


GRÁFICO 2. Teste de acurácia entre os pontos da curva padrão do kit e *pools* de amostras diluídas para testosterona.

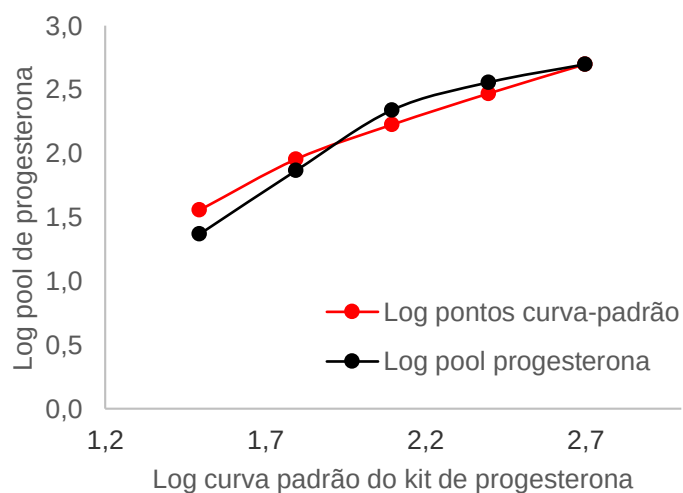


GRÁFICO 3. Teste de paralelismo entre os pontos da curva padrão do kit e *pools* de amostras diluídas para progesterona ($F_{1,5}=0,87$; $p=0,45$).

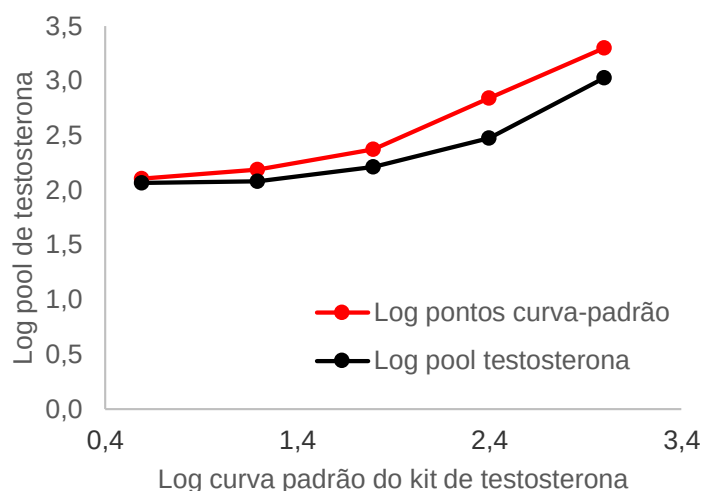


GRÁFICO 4. Teste de paralelismo entre os pontos da curva padrão do kit e *pools* de amostras diluídas para testosterona ($F_{1,5}=3,79$; $p=0,11$).

3.2. Amostras, extração e análise hormonal

A extração hormonal foi realizada em todas as amostras ($n=56$) de maneira eficiente. A homogeneização no aparelho OmniBeadRuptor® promoveu uma degradação tecidual uniforme, não observando-se fragmentos de amostras remanescentes após esse processo. Ao final de todas as etapas da extração hormonal, observou-se o tubo sem resíduos lipídicos, concluindo-se que a ressuspensão adicional em hexano conferiu a solubilização dos lipídeos restantes.

Durante o processo de fragmentação das aliquotas de gordura subcutânea observou-se uma liberação lipídica rápida nas amostras piloto que foram armazenadas em nitrogênio líquido, o que não ocorreu para as amostras armazenadas em freezer a -20°C . Sob suspeita de que esta degradação possa ter ocorrido devido a mudança brusca de temperatura, as amostras em nitrogênio foram acondicionadas em freezer a -40°C por 10 minutos antes da clivagem. Esse processo foi realizado para as 28 amostras em nitrogênio líquido e observou-se redução na liberação lipídica imediata.

As concentrações de progesterona foram determinadas para 27 dos 28 espécimes analisados. Para um indivíduo os níveis de progesterona não estavam dentro do limite máximo de detecção do kit de enzima-imunoensaio, não sendo possível logisticamente a realização de mais diluições para esta amostra. As concentrações de testosterona foram mensuradas para todos os 28 espécimes analisados.

Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações hormonais de amostras armazenadas a -20°C em freezer e -196°C em nitrogênio líquido, tanto para

progesterona como para testosterona, mesmo nas diferentes unidades de concentrações medidas (ng/g de amostra e ng/mg de lipídeo).

Na dosagem de progesterona, mensurada em ng/g de amostra, foi obtida uma média de 9,55 ($\sigma=12,04$) para amostras armazenadas em freezer a -20°C e média de 9,40 ($\sigma=10,85$) para amostras armazenadas em nitrogênio líquido ($p=0,9631$; $df=54$; $t=0,04$) (Gráfico 5). Foi obtida uma média de 16,02 ($\sigma=22,64$) para amostras armazenadas a -20°C e média de 14,26 ($\sigma=16,62$) para amostras armazenadas a -196°C (nitrogênio líquido) na dosagem de progesterona, mensurada em ng/mg de lipídeo ($p=0,7413$; $df=54$; $t=0,33$) (Gráfico 6).

Na dosagem de testosterona em ng/g de amostra foi obtido uma média de 2,80 ($\sigma=2,69$) para amostras armazenadas em freezer a -20°C , e média de 1,73 ($\sigma=2,28$) para amostras armazenadas a -196°C ($p=0,1127$; $df=54$; $t=1,61$) (Gráfico 7). Foi obtida uma média de 4,50 ($\sigma=4,53$) para amostras armazenadas em freezer (-20°C) e média de 2,69 ($\sigma=3,62$) para amostras armazenadas a -196°C em nitrogênio líquido ($p=0,1039$; $df=54$; $t=1,65$) na dosagem de testosterona em ng/mg de lipídeo (Gráfico 8).

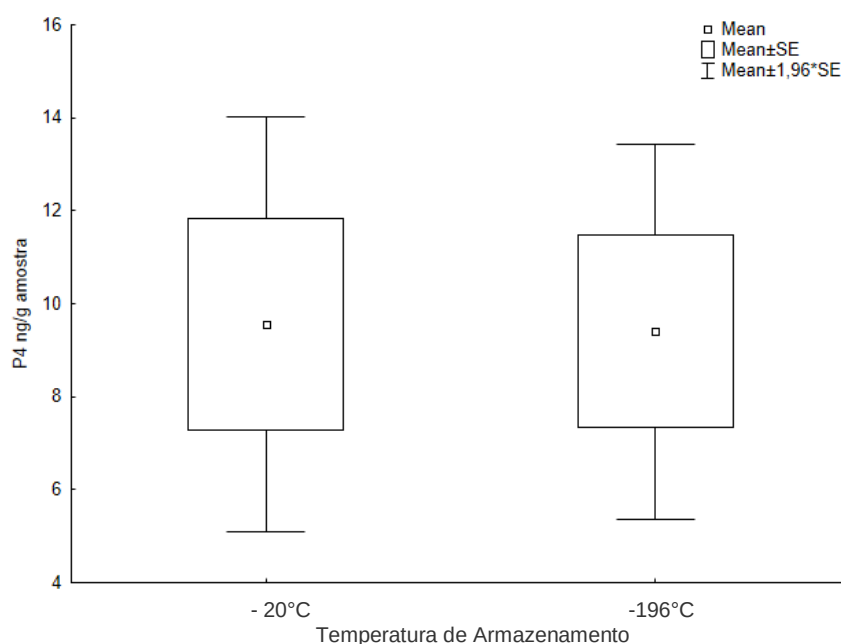


GRÁFICO 5. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de progesterona de 28 animais com camada de gordura armazenada a -20°C e a -196°C na unidade ng/g de amostra ($p=0,9631$; $df=54$; $t=0,04$).

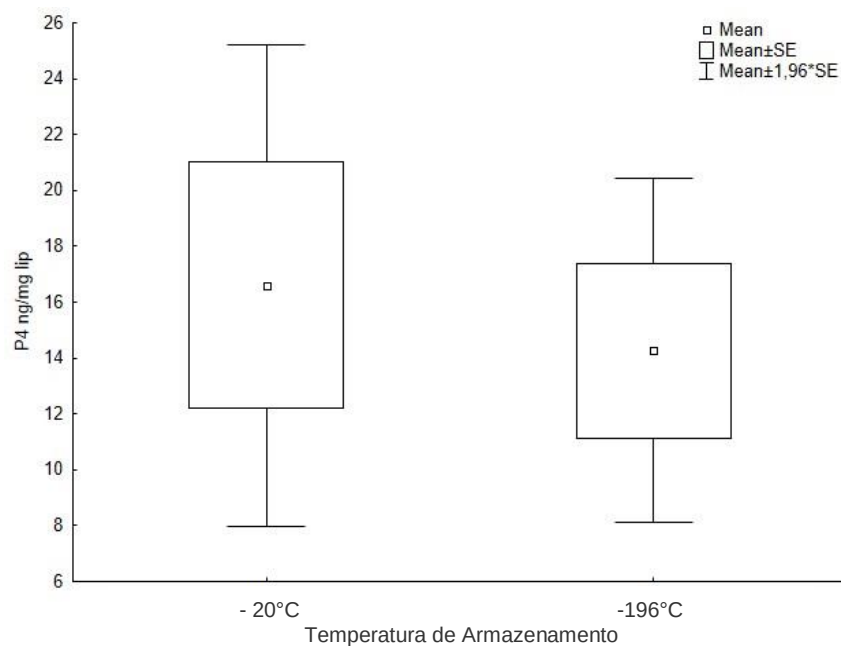


GRÁFICO 6. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de progesterona de 28 animais com camada de gordura armazenada a -20°C e a -196°C na unidade ng/mg de lipídeo ($p=0,7413$; $df=54$; $t=0,33$).

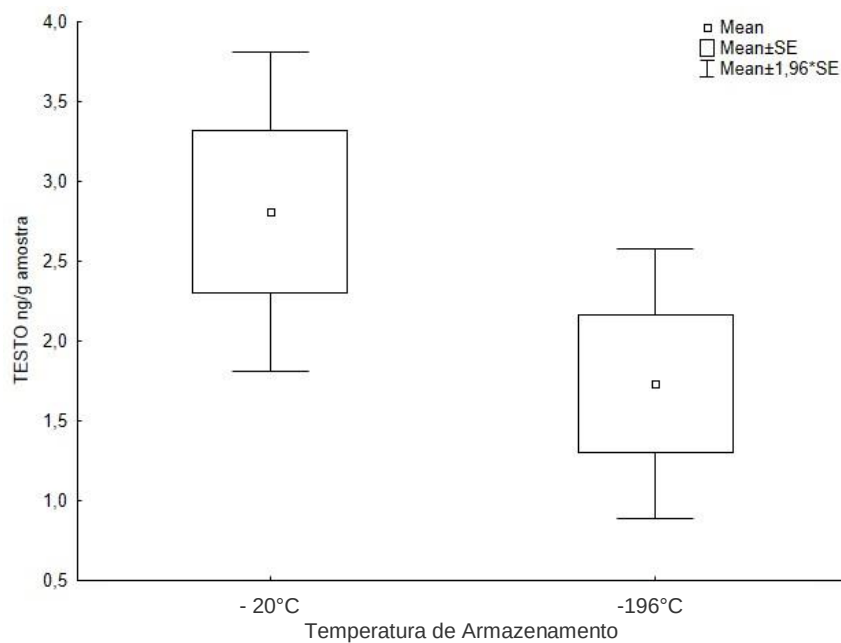


GRÁFICO 7. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de 28 animais com camada de gordura armazenada a -20°C e a -196°C na unidade ng/g de amostra ($p=0,1127$; $df=54$; $t=1,61$).

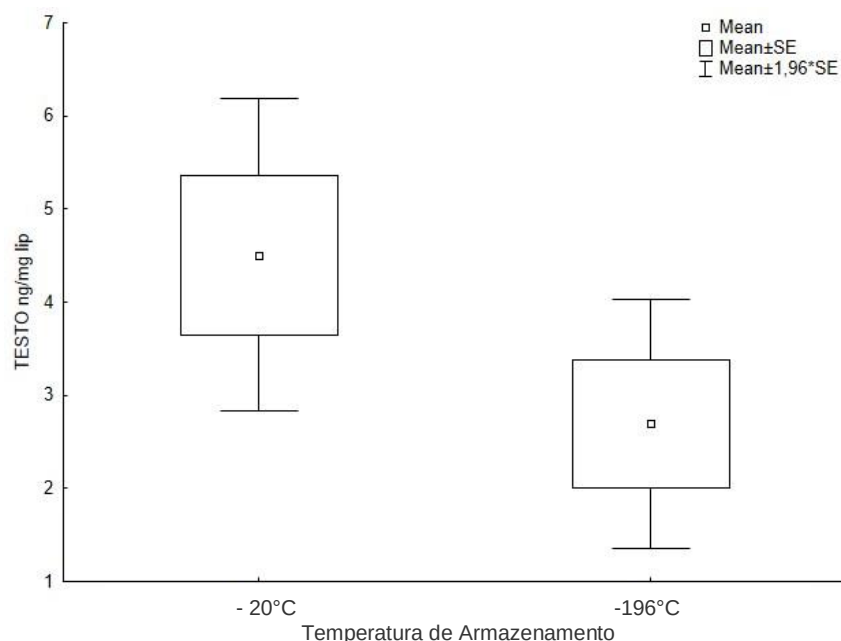


GRÁFICO 8. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de 28 animais com camada de gordura armazenada a -20°C e a -196°C na unidade ng/mg de lipídeo ($p=0,1039$; $df=54$; $t=1,65$).

4. DISCUSSÃO

A extração e dosagem hormonal de gordura subcutânea já havia sido reportada para diversas espécies de odontocetos e mysticetos. Porém, para *Pontoporia blainvillei* não havia estudos para nenhuma das populações, inclusive em nenhuma matriz biológica reportada em literatura. Este é o primeiro estudo que reporta a extração e dosagem de hormônios esteroides sexuais de gordura armazenada em nitrogênio líquido (-196°C).

A dosagem de hormônios nas duas unidades de concentração (ng/g de amostra e ng/mg de lipídeo) foi reportada por Mello et al. (2017) para anular possíveis efeitos das características individuais (idade, estado de nutrição, prenhez, lactação) e das variações da profundidade da gordura amostrada. A autora concluiu que a unidade ng/mg de lipídeo deve ser utilizada quando o tamanho da amostra ou o estágio de decomposição não é padronizado. No presente estudo, independentemente da unidade utilizada, os resultados dos testes estatísticos foram semelhantes, uma vez o tamanho da amostra e o estágio de decomposição foi padronizado, corroborando a afirmação da autora. Champagne et al. (2016) relataram a concentração de cortisol em ng por grama de lipídio extraído, porém não apresentaram valores em gramas aliquotadas do tecido adiposo para possibilitar a comparação entre as unidades.

A espessura da camada do *blubber* e a porcentagem lipídica variam entre os espécimes (IVERSON, 2009). Em um estudo conduzido por Koopman et al. (2006), os delfínidos exibiram ampla gama de conteúdo lipídico na gordura, de inferior a 20% até superior a 80%.

Caon (2002) analisou a camada de gordura de toninhas do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo e esta apresentou em sua composição uma média de 50,06% de gordura, 2,49% de proteína e 6,29% de carboidratos e cinzas. Foi reportado que os odontocetos de águas frias têm sua estrutura da gordura com maior depósito lipídico comparativamente às espécies de água quente, relacionado este fator à maior capacidade de isolamento térmico. No entanto, esse fator não é único, os membros da família Phocoenidae exibiram alta concentração lipídica na gordura independentemente do regime térmico e o autor relatou que o conteúdo lipídico elevado nos membros dessa família poderia ser uma estratégia para compensar o pequeno tamanho corporal (comprimento total de até 2,2 m) (KOOPMAN et al., 2006). Esta compensação biológica pode ocorrer também em toninhas, visto que são animais com pequeno tamanho corpóreo, atingindo sua maturidade com cerca de 107,8 a 116 cm em machos e 119 a 126 cm em fêmeas para população FMA II (ROSAS & MONTEIRO-FILHO, 2002; BERTOZZI et al., 2010).

Observou-se nesse estudo uma homogeneização uniforme dos fragmentos de gordura, indicando uma dissolução tecidual completa. Ao final de todas as etapas da extração hormonal, verificou-se o tubo sem resíduos lipídicos, concluindo-se que a terceira ressuspensão em hexano foi efetiva. Sugere-se que a quantidade de hormônio liberado durante o processo de homogeneização do tecido adiposo de cetáceos pode ser desuniforme de acordo com a quantidade de lipídeo presente na amostra. Isto pode ocorrer porque quando a porcentagem lipídica é menor, pode haver mais tecido fibroso e elástico e conseqüentemente maior será a dificuldade na homogeneização total da amostra durante a extração. Portanto o elevado conteúdo lipídico característico da espécie pode ter uma relação direta com uma homogeneização mais efetiva. Em amostras mais decompostas, também há possibilidade da ocorrência da liberação dos hormônios esteroides mais facilmente no momento da homogeneização (MELLO, 2014). Na extração lipídica ocorre a transferência física do constituinte solúvel (lipídeo) para o solvente, no caso o hexano, em contato com a matriz (BRUM et al., 2009). No presente estudo, devido a não solubilização lipídica completa, foi realizada uma terceira ressuspensão em hexano, diferindo de estudos prévios (TRANA et al., 2015; KELLAR et al., 2009; MELLO et al., 2017; TREGO et al., 2013; KELLAR et al., 2013a). A terceira ressuspensão em hexano conferiu solubilização dos lipídeos remanescentes visivelmente, todavia mais estudos são pertinentes para realizar a comparação estatística da influência dessa terceira ressuspensão nas dosagens hormonais.

O nitrogênio ou azoto líquido é uma substância empregada para criopreservação, que utiliza temperaturas muito baixas (-196°C) para preservar a integridade estrutural de células e tecidos (OZKAVUKCU, 2002; PEGG, 2007). Ozkavukcu (2002) afirma que a viabilidade do

material biológico armazenado a -196°C é independente do período de armazenamento, porém com a ressalva de que há reações fotofísicas descritas como formação de radicais livres e quebra de certas macromoléculas. O congelamento comum a -20°C é normalmente letal, pois ocorre a formação de cristais intracelulares, que perfuram as células, destruindo-as por ação mecânica direta (PEGG, 2007). Com isso, utilizou-se o armazenamento em nitrogênio líquido e em freezer comum com objetivo de verificar possíveis diferenças nas concentrações do hormônio decorrentes desse acondicionamento das amostras. Com base nos resultados, pode-se inferir que não ocorreu diferenças significativas nas dosagens hormonais das amostras armazenadas a -20° e a -196°C devido a estabilidade da molécula esteroide, sendo portanto as duas temperaturas de acondicionamento viáveis. A progesterona não possui degradação rápida e pode se manter estável em diversas amostras biológicas, como saliva e fezes (GROSCHL et al., 2001, GALAMA et al., 2004). Koziris et al. (2003) e Gislefoss et al. (2012) demonstraram estabilidade da testosterona no soro humano armazenado por até 17 anos. As dosagens de testosterona sérica foram inferiores apenas nas amostras armazenadas a -25°C a longo prazo (por 29 anos) (GISLEFOSS et al., 2012). Trana et al. (2015) avaliaram a concentração de cortisol em relação a degradação devido ao armazenamento a longo prazo. A conservação do tecido adiposo foi realizada em freezer a -40°C em 929 carcaças de *Delphinapterus leucas* por um período de 30 anos. Os resultados demonstraram que a dosagem foi menor em amostras mais degradadas, e esta avaliação foi feita por meio da coloração tecidual, deste modo, sugere que a diferença na concentração foi afetada pela exposição das amostras ao ar ou descongelamento e não pelo período de armazenamento na temperatura de -40°C . O período máximo de armazenamento das amostras do presente estudo foi de um ano, futuros trabalhos poderão avaliar a viabilidade a longo prazo. Kellar et al. (2006) estabeleceram um protocolo que tem sido utilizado por diversos estudos (KELLAR et al., 2009; PÉREZ et al., 2011; TREGO et al., 2013), no qual empregou a temperatura de -20°C para o acondicionamento das amostras. Entretanto, Kellar et al. (2014) realizaram o congelamento das amostras de gordura de *Delphinus capensis* e *D. delphis* a -80°C colhidos por um período de 4 meses. Não foi apresentada uma análise metodológica acerca da alteração dessa temperatura (-20°C para -80°C) e não foi indicado o período de armazenamento até a extração hormonal. Pérez et al. (2011) colheram gordura de odontocetos para dosagem de progesterona e relataram na metodologia o uso de amostras homogeneizadas em nitrogênio líquido usando almofariz e pilão previamente a extração, porém não especificaram a temperatura de armazenamento imediatamente após a colheita, tornando difícil uma comparação direta com o presente estudo. Nos estudos pretéritos (TRANA et al., 2015; KELLAR et al., 2009; TREGO et al., 2013; KELLAR et al., 2013a;

KELLAR et al., 2013b), independentemente da temperatura de armazenamento, foi possível realizar a dosagem hormonal, porém estes não compararam a concentração hormonal da mesma amostra submetida a diferentes temperaturas. O presente estudo é o primeiro a realizar a validação da dosagem hormonal a partir da gordura de cetáceos sob duas temperaturas de armazenamento.

5. CONCLUSÕES

O método de extração e análise hormonal apresentou-se viável para *P. blainvillei*;

A terceira ressuspensão de hexano conferiu solubilização dos lipídeos remanescentes visivelmente;

O acondicionamento de amostras de tecido adiposo nas duas temperaturas (-20°C e -196°C) não revelou diferenças na mensuração hormonal;

As duas unidades de concentração de hormônio foram equivalentes devido a padronização das amostras;

6. REFERÊNCIAS

AMARAL, R. S. (2010). Use of alternative matrices to monitor steroid hormones in aquatic mammals: A Review. *Aquatic Mammals*, 36 (2): 162-171.

BERTOZZI, C. P. Interação com a pesca: implicações na conservação da toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) no litoral do estado de São Paulo, SP. 2009. 189 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BERTOZZI, C. P.; MARIGO, J.; BOTTA, S.; ALONSO, M.B.; HENNING, B.; RIBEIRO, J.; VIOTTO, J.; MARCATTO, F.; SOUZA, S.P.; DIAS, J.F. Idade e Comprimento de maturidade sexual para machos e fêmeas de Toninha, *Pontoporia blainvillei* acidentalmente capturadas no Estado de São Paulo. In: 8º Congresso da Sociedade Latinoamericana de Especialistas em Mamíferos Aquáticos (SOLAMAC), 2010. Florianópolis. *Anais da XIV Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul (RT)*. 2010.

BRUM, A.A.S., ARRUDA, L.F., REGITANO D'ARCE, M.A.B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Quím. Nova* [online]. 2009, vol.32, n.4, pp.849-854. ISSN 0100-4042.

CAON, G.S. Composição da camada de gordura e do leite da toninha (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia, Cetacea) no litoral norte do Rio Grande do Sul. 2002. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

CHAMPAGNE, C.D.; KELLAR, N.M.; CROCKER, D.E.; WASSER, S.K.; BOOTH, R.K. (2016). Blubber cortisol qualitatively reflects circulating cortisol concentrations in bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science*, v. 33, p. 134-153.

CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Disponível em: <<http://www.cites.org/>>. Acesso em: 1 de março de 2018.

CRESPO, E. A. (2018). Franciscana Dolphin. Encyclopedia of Marine Mammals, 388–392.

DANILEWICZ, D. Reproduction of female franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Rio Grande do Sul, southern Brazil (2003). LAJAM 2(2): 67-78.

DANILEWICZ, D. S.; CLAVER, J. A.; CARRERA, A. L. P.; SECCHI, E. R.; FONTOURA, N.F. (2004). Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia: Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. Fish. bull. (Wash. D.C.), v. 102, p. 581-592.

DE MELLO, D. M. D., & DE OLIVEIRA, C. A. (2016). Biological matrices for sampling free-ranging cetaceans and the implications of their use for reproductive endocrine monitoring. Mammal Review, 46(2), 77–91.

DOLEZEL, R.; KUDLAC, E.; NEDBALKOVA, J. (1991). Morphology of the reproductive tract and serum progesterone concentrations in cows within 45 days after parturition. Acta Veterinaria Brno, v. 60, p. 181–192.

GALAMA, W. T., GRAHAM, L. H., & SAVAGE, A. (2004). Comparison of fecal storage methods for steroid analysis in black rhinoceroses (*Diceros bicornis*). Zoo Biology, 23(4), 291–300.

GERACI, J.R. & LOUNSBURY, V.J. (2005). Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings. 2nd ed., National Aquarium in Baltimore, Baltimore, EUA.

GERVAIS, P. & A. D'ORBIGNY, A. (1844). Mammalogie. Bulletin de la Société Philomathique, Paris, April 27, 1844:38--40.

GISLEFOSS, R. E., GRIMSRUD, T. K., HOIE, K., & MORKRID, L. (2012). Stability of testosterone measured in male archival serum samples by two different methods. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 72(7), 555–562.

GRÖSCHL, M. (2001). Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. Steroids, 66(10), 737–741.

HARRISON, R. J.; BRYDEN, M. M.; MCBREARTY, D. A.; BROWNELL, R. L. (1981). The ovaries and reproduction in *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Platanistidae). J. LINN. SOC. LOND. ZOOL., v. 193, p. 563-580.

HUNT, K. E., ROLLAND, R. M., & KRAUS, S. D. (2013). Detection of steroid and thyroid hormones via immunoassay of North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) respiratory vapor. Marine Mammal Science, 30(2), 796–809.

IVERSON, S.J. (2009). Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. In: Kainz, M., Brett, M., Arts, M. (eds) Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer, New York, NY.

KELLAR, N. M., TREGO, M. L., MARKS, C. I., DIZON, A. E. (2006). Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. Marine Mammal Science, 22 (1): 1-16.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; MARKS, C. I.; CHIVERS, S. J.; DANIL, K.; ARCHER, FREDERICK I. (2009). Blubber testosterone: A potential marker of male reproductive status in short-beaked common dolphins. *Marine Mammal Science*, 25 (3): 507–522.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; CHIVERS, S. J.; ARCHER, F. I. (2013a). Pregnancy patterns of pantropical spotted dolphins (*Stenella attenuata*) in the eastern tropical Pacific determined from hormonal analysis of blubber biopsies and correlations with the purse-seine tuna fishery. *Marine Biology*, 160 (12): 3113–3124.

KELLAR, N. M.; KELIHER, J.; TREGO, M. L.; CATELANI, K. N.; HANNS, C.; CRAIG, J. C.; ROSA, C. (2013b). Variation of bowhead whale progesterone concentrations across demographic groups and sample matrices. *Endangered Species Research*, v. 22, p. 61–72.

KELLAR, N.; TREGO, M.; CHIVERS, S. (2014). From progesterone in biopsies to estimates of pregnancy rates: large scale reproductive patterns of two sympatric species of common dolphin, *Delphinus* spp. off California, USA and Baja, Mexico. *Bulletin, Southern California Academy of Sciences*, 113 (2): 58–80.

KOOPMAN, H. N., PABST, D. A., McLELLAN, W. A., DILLAMAN, R. M., READ, A. J. (2002). Changes in Blubber Distribution and Morphology Associated with Starvation in the Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*): Evidence for Regional Differences in Blubber Structure and Function. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75(5), 498–512.

KOOPMAN, H.N. (2006) Phylogenetic, ecological, and ontogenetic factors influencing the biochemical structure of the blubber of odontocetes. *Mar Biol* (2007) 151:277-291.

KOZIRIS, L.P.; VINGREN, J.L. & KRAEMER, W.J. (2003). Stability of serum testosterone concentration in long-term cryostorage. *Medicine and Science in Sports and Exercise - MED SCI SPORT EXERCISE*. 35.

MANSOUR, A. A. H.; MKAY, D. W.; LIEN, J.; ORR, J. C.; BANOUB, J. H.; OIEN, N.; STENSON, G. (2002). Determination of pregnancy status from blubber samples in Minke Whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Marine Mammal Science*, 18 (1): 112–120.

MELLO, D. M. D. Uso de gordura subcutânea como matriz na dosagem de esteroides sexuais em baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*). 2014. 160 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MELLO, D.; COLOSIO, A.; MARCONDES, M.; VIAU, P.; OLIVEIRA, C. (2017). Feasibility of using humpback whale blubber to measure sex hormones. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 486, p. 32- 41.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. Portarias nº 444/2014 e nº 445/2014, 17 de dezembro de 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>>. Acesso em: 21.fev.2018.

OZKAVUKCU, S. (2002). Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*.

PALLIN, L., ROBBINS, J., KELLAR, N., BÉRUBÉ, M., & FRIEDLAENDER, A. (2018). Validation of a blubber-based endocrine pregnancy test for humpback whales. *Conservation Physiology*, 6(1).

PEGG, D. E. (2007). Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*, 39–57.

PÉREZ, S.; GARCÍA-LÓPEZ, Á.; STEPHANIS, R.; GIMÉNEZ, J.; GARCÍA-TISCAR, S.; VERBORGH, P.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, G. (2011). Use of blubber levels of progesterone to determine pregnancy in free-ranging live cetaceans. *Marine Biology*, 158 (7): 1677–1680.

ROBECK, T. R.; MONFORT, S. L.; CALLE, P. P.; DUNN, J. L.; JENSEN, E.; BOEHM, J. R.; YOUNG, S.; CLARK, S. T. (2005). Reproduction, Growth and Development in Captive Beluga (*Delphinapterus leucas*). *Zoo Biology*, 24 (1): 29–49.

ROSAS, F.C.W.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. (2002). Reproductive parameters of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae), on the coast of São Paulo and Paraná States, Brazil. *Mammalia*, 66 (2): 231-245.

TRANA, M.R.; ROTH, J.D.; TOMY, G.T.; ANDERSON, W.G.; FERGUSON, S.H. (2015). Influence of sample degradation and tissue depth on blubber cortisol in beluga whales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 462 p. 8–13.

TREGO, M. L.; KELLAR, N. M.; DANIL, K. (2013) Validation of blubber progesterone concentrations for pregnancy determination in three dolphin species and a porpoise. *PLOS One*, 8 (7): e69709.

WEST, K. L.; ATKINSON, S.; CARMICHAEL, M. J.; SWEENEY, J. C.; KRAMES, B.; KRAMES, J. (2000). Concentrations of progesterone in milk from bottlenose dolphins during different reproductive states. *General and Comparative Endocrinology*, 117(2): 218–24.

ZERBINI, A.N., SECCHI, E., CRESPO, E., DANILEWICZ, D. & REEVES, R. 2017. *Pontoporia blainvillei* (errata version published in 2018). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e. T17978A123792204. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T17978A50371075.en>. Downloaded on 24 February 2019.

CAPÍTULO 2

Validação biológica da dosagem de hormônios esteroides sexuais em camada de gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla; Pontoporiidae).

Validação biológica da dosagem de hormônios esteroides sexuais em camada de gordura subcutânea de toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetartiodactyla; Pontoporiidae).

RESUMO

A toninha (*Pontoporia blainvillei*) é um pequeno odontoceto muito impactado pelas atividades antrópicas, principalmente pelas capturas acidentais. A dosagem hormonal de esteroides pode ser um indicador de parâmetros reprodutivos, como o *status* de reprodução, taxa de prenhez, sazonalidade, entre outros aspectos. O objetivo deste estudo foi relacionar as dosagens de testosterona e progesterona em camada de gordura subcutânea de carcaças de toninha com dados biológicos referentes ao sexo, maturidade gonadal, idade, estágio de desenvolvimento, comprimento total e ocorrência de prenhez. As carcaças foram provenientes de encalhe e captura acidental do litoral de São Paulo. Foi realizada biometria corporal e exame necroscópico, com colheita de fragmentos de gordura e armazenamento em freezer a -20°C, colheita de gônadas para avaliação microscópica da maturidade e de dentes para estimativa da idade. A extração foi realizada com modificações a partir do método descrito anteriormente e a análise hormonal por enzimaímunoensaio dos dois hormônios. As duas unidades de concentração de hormônio foram equivalentes. Os níveis de hormônios encontrados foram de acordo com o esperado, onde fêmeas apresentaram níveis de progesterona mais elevados que machos, maduras e adultas tiveram níveis mais altos que imaturas, juvenis e filhotes, não houve correlação com a idade e os mesmos resultados foram obtidos para machos em relação a testosterona. As prenhes também apresentaram níveis de progesterona mais elevados que o restante dos grupos. Os filhotes e fetos apresentaram níveis hormonais elevados, que pode ser um reflexo da circulação hormonal materna, além da alta taxa de incorporação de hormônios na gordura ou extração mais efetiva;

Palavras-chave: Odontoceti; Enzimaímunoensaio; Dosagem hormonal; Progesterona; Testosterona; Cetáceos.

1. INTRODUÇÃO

A toninha ou franciscana (*Pontoporia blannvillei*) (GERVAIS & D'ORBIGNY, 1844) é um pequeno odontoceto, endêmica da costa leste da América do Sul, o qual habita águas costeiras e estuarinas de até 50 metros de profundidade (CRESPO et al., 2002; ICMBio, 2010; CRESPO, 2018). Sua ocorrência foi relatada através de encalhes, capturas acidentais e avistamentos. Ao longo dos anos, houve diversas modificações de sua área de distribuição (PINEDO, 1991; SICILIANO, 1994; CRESPO et al., 1998; BORDINO et al., 1999; SECCHI et al., 1998; SECCHI et al., 2003b; MOURA et al., 2009; CUNHA et al., 2014; DO AMARAL et al., 2018). Secchi et al. (2003b) propuseram o reconhecimento de quatro áreas de manejo denominadas “*Franciscana Management Areas*” (FMAs), sendo FMA I do Espírito Santo ao norte do Rio de Janeiro, FMA II incluindo São Paulo, Paraná e Santa Catarina, FMA III do Rio Grande do Sul ao Uruguai e FMA IV na costa da Argentina. Do Amaral et al. (2018) realizaram uma atualização para os novos limites de distribuição da espécie no Brasil, reformulando as lacunas e dividindo a FMA I em FMA Ia (Itaúnas (18°25'S) até Santa Cruz (19°57'S), ambas no Espírito Santo) e FMA Ib (Barra de Itabapoana (21°18'S) até Armação de Búzios (22°44'S), localizadas no Rio de Janeiro).

É uma espécie muito impactada pelas atividades antrópicas, listada como “vulnerável” ou até “criticamente ameaçada” (CITES, 2012; MMA, 2014; ZERBINI et al., 2017), principalmente devido aos altos níveis de capturas acidentais reportados ao longo de toda a sua área de distribuição, além da degradação do habitat por poluentes (BERTOZZI & ZERBINI, 2002; ROSAS et al., 2002; BORDINO & ALBAREDA, 2004; SECCHI et al., 2004; CAPPOZZO et al., 2007; FRANCO-TRECU et al., 2009; NEGRI et al., 2012; CREMER et al., 2016). A conservação de espécies sujeitas a altas taxas de mortalidade depende de um conhecimento da sua dinâmica populacional, o que inclui diversas variáveis descritoras do processo reprodutivo (BERTOZZI et al., 2009).

No estudo dos parâmetros reprodutivos de cetáceos, as informações relacionadas a idade, maturidade gonadal e níveis hormonais são complementares entre si assegurando uma apropriada interpretação do estado reprodutivo dos indivíduos. A dosagem hormonal de esteroides foi reportada em matrizes como fezes, urina e tecido adiposo, além de soro e plasma, em mamíferos aquáticos (AMARAL, 2010; DE MELLO & OLIVEIRA, 2016), a qual possibilita determinar parâmetros reprodutivos em espécimes mantidos sob cuidados humanos (WEST et al., 2000; ROBECK et al., 2005) e em populações selvagens (KELLAR et al., 2006; KELLAR et al., 2013a; TREGO et al., 2013; MELLO, 2014).

As características de dimorfismo sexual, idade, maturidade gonadal e classificação etária para *P. blainvillei* são semelhantes às utilizadas em outras espécies de cetáceos. O dimorfismo sexual é determinado pela observação da distância perineal, dado que as fêmeas possuem uma fenda genital aparentemente única, abrangendo as aberturas genital e anal e os machos possuem a fenda genital e anal distintas (MARIGO & GROCH, 2014).

A categorização dos estágios de desenvolvimento referentes a população FMA II de *P. blainvillei* no litoral de São Paulo é feita considerando-se o comprimento total durante a biometria corporal em filhote (ou feto) para animais com até 90 cm, juvenil ou adulto a partir de 107,83 cm para machos adultos e superior a 119 cm para fêmeas adultas (BERTOZZI et al., 2010).

Trego et al. (2013) mensuraram a concentração de progesterona em fêmeas de *Delphinus capensis*, *Stenella attenuata*, *S. longirostris* e *Phocoenoides dalli* e determinaram a maturidade sexual pela presença do feto no útero ou de corpo lúteo nos ovários. Nos indivíduos em que não foi possível avaliar os ovários, utilizou-se o valor do comprimento total médio da maturidade para a espécie disponível em literatura como um indicador de estágio de desenvolvimento. A colheita de gordura em cetáceos de vida livre é realizada por meio de biopsia, o que limita a determinação de parâmetros biológicos como maturidade gonadal e idade.

A maturidade gonadal pode ser analisada macro e microscopicamente para classificação como maduro ou imaturo (PERRIN e DONOVAN, 1984; HOHN et al., 1985). As fêmeas maduras possuem ovários com presença de pelo menos um corpo albicans ou um corpo lúteo, e as imaturas não possuem corpos de ovulação (PERRIN e DONOVAN, 1984). Para *P. blainvillei*, vale ressaltar que os corpos albicans não provocam cicatrizes permanentes na superfície ovariana e necessitam ser avaliadas histologicamente (HARRISON et al., 1981). Os machos maduros apresentam os túbulos seminíferos envolvidos por pouco tecido intersticial, com grande diâmetro e alongados, com luz no lúmen e possível ocorrência de todas as células da linhagem espermatogênica (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozoides) e os imaturos tem os túbulos seminíferos envolvidos por abundante tecido intersticial, sem luz no lúmen, circulares ou pouco alongados, com ocorrência de espermatogônias e possivelmente espermatócitos (HOHN et al., 1985). Diversos estudos realizaram a mensuração de hormônios esteroides sexuais nos cetáceos com maturidade gonadal conhecida, distinguindo-se fêmeas maduras prenhes das maduras e imaturas a partir de níveis elevados de progesterona (MANSOUR et al., 2002; KELLAR et al., 2006). A maturidade

gonadal em machos também foi correlacionada com os níveis de testosterona sérica e em tecido adiposo (ROBECK et al., 2006; DESPORTES et al., 1994; KELLAR et al., 2009).

A determinação da idade é realizada microscopicamente por meio da avaliação de deposição de tecido dentário, em que cada camada de crescimento corresponde a 1 ano e acrescenta-se 0,25 anos quando há tecido depositado após o limite da camada completa mais recente (MYRICK et al., 1983). Estudos reportaram a dosagem de testosterona sérica em odontocetos, correlacionando parâmetros de idade e sazonalidade. Os níveis foram mais elevados em machos acima de oito anos nos meses de janeiro a abril, demonstrando sazonalidade reprodutiva em *Delphinapterus leucas* (ROBECK et al., 2005). Para *Orcinus orca*, os machos maduros de 13 anos ou mais obtiveram concentrações séricas estatisticamente mais elevadas que juvenis e púberes (ROBECK & MONFORT, 2006).

Dado que a dosagem hormonal pode ser um importante indicador de parâmetros reprodutivos dos cetáceos, o objetivo deste estudo foi relacionar as dosagens de hormônios esteroides sexuais (testosterona e progesterona) em camada de gordura subcutânea de carcaças de toninha (*Pontoporia blainvillei*) com parâmetros biológicos de sexo, maturidade gonadal, idade, estágio de desenvolvimento, comprimento total e ocorrência de prenhez.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Amostras de gordura subcutânea de *P. blainvillei* (n=101 indivíduos) foram colhidas e cedidas pelo Instituto Biopesca, organização não-governamental, que realiza desde 1998 o monitoramento de capturas acidentais e encalhes de golfinhos e tartarugas marinhas no litoral do estado de São Paulo. As carcaças de toninhas provenientes de encalhe (n=57), do Projeto de Monitoramento de Praias da Bacia de Santos, e de captura acidental (n=44) foram recolhidas pela equipe do Biopesca, entre novembro de 2004 e junho de 2018, nos municípios de Ubatuba (23°26'02" S; 45°04'15" O), São Sebastião (9°56'00" S; 36°33'15" O), Guarujá (23°59'35" S; 46°15'23" O), Praia Grande (24°00'20" S; 46°24'10" O), Mongaguá (24°05'35" S; 46°37'14" O), Itanhaém (24°10'59" S; 46°47'20" O) e Peruíbe (24°19'12" S; 46°59'53" O) (Figura 4).

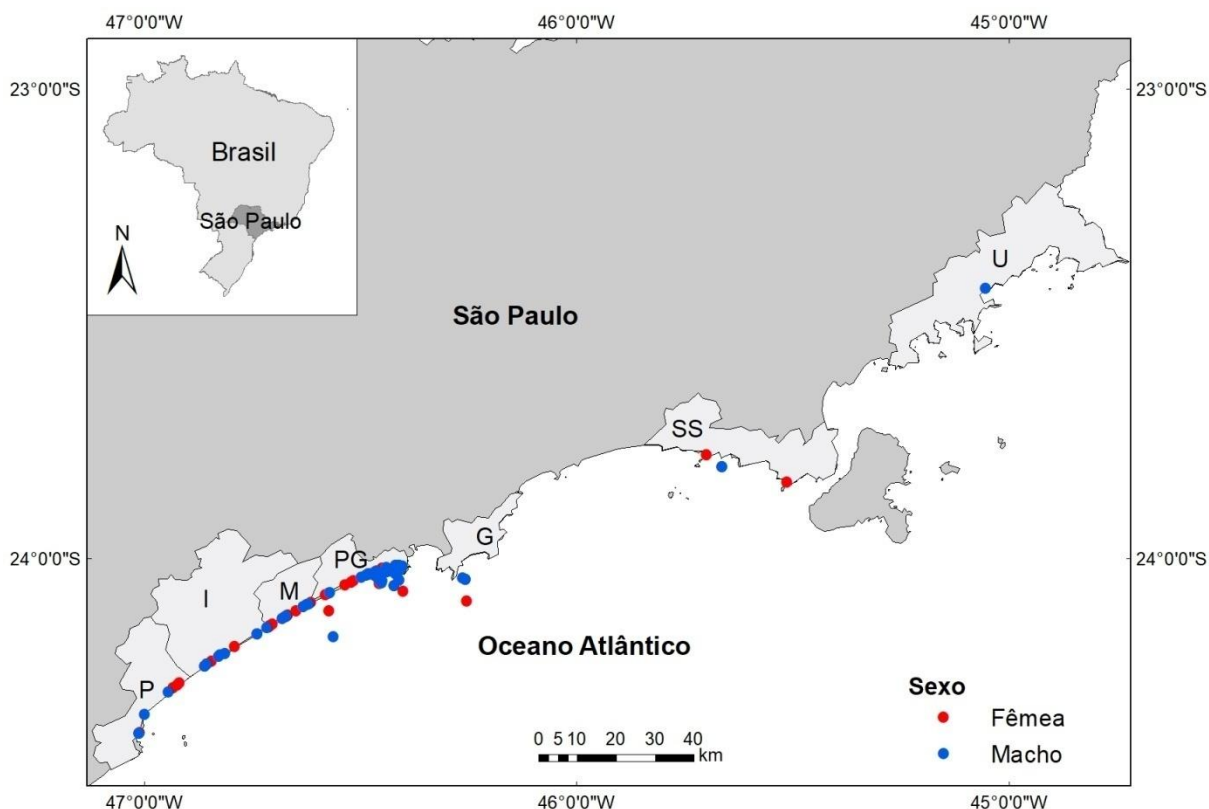


FIGURA 4. Área de estudo localizada no litoral do estado de São Paulo, Brasil, nos municípios de Ubatuba (U), São Sebastião (SS), Guarujá (G), Praia Grande (PG), Mongaguá (M), Itanhaém (I) e Peruíbe (P). As fêmeas (n=46) estão representadas pelos pontos vermelhos e os machos (n=55) pelos pontos azuis.

Os espécimes foram encaminhados para fotodocumentação, biometria corporal, avaliação do código de decomposição e exame necroscópico. Somente carcaças código 2 (fresca) e 3 (moderadamente decomposta) (GERACI & LOUNSBURY, 2005) foram selecionadas para a extração e determinação dos hormônios esteroides sexuais.

Durante a necropsia, foi realizada a colheita da camada de gordura subcutânea com pele da região dorso-lateral esquerda, caudalmente a escápula esquerda. Fragmentos de cerca de 5 x 5 cm foram aliquoteados em microtubos de 2mL e armazenados em freezer a -20°C, perfazendo um total de 101 amostras.

2.2 Extração hormonal

A extração hormonal foi realizada conforme descrito no item 2.2 do capítulo 1.

2.3 Análise hormonal

A análise hormonal foi realizada conforme descrito no item 2.3 do capítulo 1.

2.4 Paralelismo, controles e eficiência de extração

O paralelismo, controles e eficiência de extração foram realizados conforme descrito no item 2.4 do capítulo 1.

2.5 Análise de dados biológicos

Os dados biológicos dos espécimes (sexo, maturidade gonadal, comprimento total e idade) foram cedidos pelo Instituto Biopescaria. As categorizações de sexo foram em macho ou fêmea; a maturidade gonadal em maduros ou imaturos e o estágio de desenvolvimento em filhotes, juvenis ou adultos. Os fetos e filhotes foram agregados na mesma classificação como “filhote”. Apenas os indivíduos com dados de maturidade gonadal confirmados histologicamente e idade analisada microscopicamente foram utilizados nas análises estatísticas. O estágio de desenvolvimento foi determinado pelo comprimento total, conforme Bertozzi et al. (2010) para população FMA II do litoral de São Paulo, onde filhote (ou feto) é menor que 90 cm, macho adulto a partir de 107,83 cm, fêmea adulta a partir de 119 cm e juvenil com comprimento entre os limiares superior de filhote e inferior de adulto.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas em duas unidades de concentração de hormônio: nanograma de hormônio por grama de amostra (ng/g) e em nanograma de hormônio por miligrama de lipídeo extraído (ng/mg). A unidade ng/g refletiu a quantidade de hormônio dosado em g de gordura subcutânea homogeneizada; e a unidade ng/mg refletiu a quantidade de hormônio dosado por lipídeo extraído.

Foi utilizado o teste de Levene para avaliação da homocedasticidade das variâncias das amostras. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados. O teste *t* de Student foi utilizado para amostras com variâncias homocedásticas ou o Mann-Whitney para variâncias não homocedásticas na comparação entre duas médias. ANOVA unidirecional foi utilizada para análises que envolveram a comparação de três ou mais médias no caso de variâncias homocedásticas e o teste de Kruskal-Wallis para variâncias não homocedásticas, ambas seguidas por um teste post-hoc de Tukey.

As análises de correlação de Pearson foram realizadas para progesterona e testosterona em relação ao comprimento total e idade dos indivíduos. Todas as comparações estatísticas neste estudo foram consideradas significativas a $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Statistica versão 7.0 (StatSoft®) e um gráfico utilizando o Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus®2016).

3. RESULTADOS

3.1 Paralelismo, controles e eficiência de extração

Os coeficientes de correlação do teste de paralelismo e a eficiência de extração foram calculados nas dosagens de progesterona (P4) e testosterona (T) conforme descrito no item 3.1 do capítulo 1.

3.2 Análise de dados biológicos

Os dados biológicos de sexo, maturidade gonadal, estágio de desenvolvimento, comprimento total e idade estão apresentadas abaixo (Tabela 1).

TABELA 1. Dados biológicos (sexo, maturidade gonadal, estágio de desenvolvimento, comprimento total e estimativa de idade) dos espécimes (n=101).

Sexo	n	Maturidade Gonadal	n	Estágio de Desenvolvimento	Comprimento Total (cm)	n	Estimativa de Idade (anos)	n
Fêmea	46	Imatura	28	Filhote ou feto	55,5-87,5	14	0-0,5	14
				Juvenil	97,9-116,7	17	0,5-2,25	6
		Madura	7	Adulta	120,4-140,5	15	3-13	6
Macho	55	Imaturo	21	Filhote ou feto	54-86,3	16	0-0,75	8
				Juvenil	90,2-106,6	14	0,75-1,75	7
		Maduro	7	Adulto	110-121,1	25	3,25-17	12

3.3 Progesterona

As concentrações de progesterona foram determinadas para 95 dos 101 espécimes estudados. Todavia, em 6 animais, os níveis de progesterona foram superiores ao limite máximo de detecção do kit de enzimaímunoensaio, com a necessidade de mais diluições, procedimento que não foi logisticamente factível. As análises realizadas nas unidades de concentração ng/g de amostra e ng/mg de lipídeo extraído apresentaram resultados estatisticamente semelhantes. Desta forma, apenas os resultados em ng/g foram apresentados em gráficos quando houve diferença ou correlação estatisticamente significativa. Todas as análises estatísticas em ambas as unidades estão na Tabela 2.

TABELA 2. Análise estatística das dosagens de progesterona e dados biológicos - sexo, maturidade gonadal, estágio de desenvolvimento, comprimento total, estimativa de idade e prenhez - dos espécimes (n=95) nas unidades nanograma de hormônio por grama de amostra (ng/g) e em nanograma de hormônio por miligrama de lipídeo extraído (ng/mg). $\bar{X}$ =média, σ = desvio padrão.

Parâmetro	Sexo	Categoria	n	Concentração em ngp4/g _{amostra}	Resultados do Teste Estatístico			Concentração em ngp4/mg _{lipídeo}	Resultados do Teste Estatístico		
Sexo	Machos		51	$\bar{X}$ = 6,25; σ =9,60	Z=-2,15; p=0,0314			$\bar{X}$ = 9,58; σ =16,81	Z=-2,35; p=0,0184		
	Fêmeas		44	$\bar{X}$ = 14,29; σ =18,87				$\bar{X}$ = 21,33; σ =27,28			
Maturidade Gonadal	Machos	Maduros	7	$\bar{X}$ =5,56 ; σ =8,25	t=-0,36; df=26; p=0,7171			$\bar{X}$ = 8,34; σ =11,59	t=-0,42; df=26; p=0,6776		
		Imaturos	21	$\bar{X}$ =7,32 ; σ =11,67				$\bar{X}$ = 12,17; σ =22,93			
	Fêmeas	Maduras	7	$\bar{X}$ =32,93; σ = 23,39	Z=2,57; p=0,0099			$\bar{X}$ =46,07; σ =32,77	Z=2,45; p=0,0141		
		Imaturas	28	$\bar{X}$ =8,03; σ = 10,62				$\bar{X}$ =12,87; σ =17,48			
Estágio de Desenvolvimento	Fêmeas	Filhotes	14	$\bar{X}$ = 14,05; σ =13,65	H (2, N= 46) =9,6812; p=0,0079	Z=2,945494; p=0,0032	Z=-1,84597; p=0,0648	$\bar{X}$ =23,53 ; σ =23,30	H (2, N= 46) =8,485; p=0,0144	Z=3,126445; p=0,0017	t=-2,99; df=29; p=0,0056
		Juvenis	17	$\bar{X}$ =3,84 ; σ =4,13				$\bar{X}$ =5,92 ; σ =6,40			
		Adultas	15	$\bar{X}$ =26,35 ; σ =25,75				$\bar{X}$ =36,74 ; σ =35,98			
	Machos	Filhotes	16	$\bar{X}$ =9,27 ; σ =13,04	F=1,3080; p=0,2790			$\bar{X}$ =15,44 ; σ =25,76	F=1,51; p=0,2288		
		Juvenis	14	$\bar{X}$ =3,79 ; σ =5,97				$\bar{X}$ =5,41 ; σ =8,33			
		Adultos	25	$\bar{X}$ =5,69 ; σ =8,46				$\bar{X}$ =8,16 ; σ =12,19			
Comprimento Total (CT em cm)	Fêmeas	Todos	44		r= 0,2095; p= 0,1671				r=0,1352; p=0,3760		
		Juvenis e adultas	30		r=0,60191; p=0,0003				r=0,5873; p=0,0005		
	Machos	Todos	51		r= -0,1788; p= 0,1916				r=-0,2088; p=0,1261		
		Juvenis e adultos	35		r= 0,1012; p= 0,5401				r=0,1046; p=0,5264		
Estimativa Dentária (Idade em anos)	Fêmeas	Todos	14		r= 0,3546; p= 0,0755				r=0,2430; p=0,2315		
		Juvenis e adultas	12		r= 0,6408; p=0,0248				r=0,6231; p=0,0304		
	Machos	Todos	27		r=-0,2273; p= 0,2033				r=-0,1978; p=0,2697		
		Juvenis e adultos	19		r= -0,2273; p= 0,3493				r=-0,1958; p=0,4217		
Prenhez	Fêmeas	Prenhes	4	$\bar{X}$ =52,35; σ =26,44	Z=-3,03444; p=0,0024			$\bar{X}$ =71,07; σ =36,08	t=-5,58; df=94; p=0,0000		
	Todos	Não prenhes	92	$\bar{X}$ =8,79 ; σ =11,79				$\bar{X}$ =13,56; σ =19,41			
		Imaturas	26	$\bar{X}$ = 8,65 ; σ =10,78	df=2; F=16,39; p=0,0000			$\bar{X}$ =13,86 ; σ =17,76	df=2; F=12,14; p=0,0001		
	Fêmeas	Maduras	5	$\bar{X}$ =23,78 ; σ =21,30				$\bar{X}$ =34,56; σ =32,07			
		Prenhes	4	$\bar{X}$ =52,35 ; σ =26,44				$\bar{X}$ =71,07 ; σ =36,08			

3.3.1 Sexo

A média dos níveis de progesterona para fêmeas (n=44) foi de 14,29 ng/g ($\sigma=18,87$); e para machos (n=51) resultou em 6,25 ng/g ($\sigma=9,6$). Devido a não homocedasticidade das variâncias, foi realizado o teste de Mann-Whitney, que revelou uma diferença significativa: as fêmeas possuem as concentrações de progesterona mais elevadas que os machos ($Z=-2,15$; $p=0,0314$) (Gráfico 9).

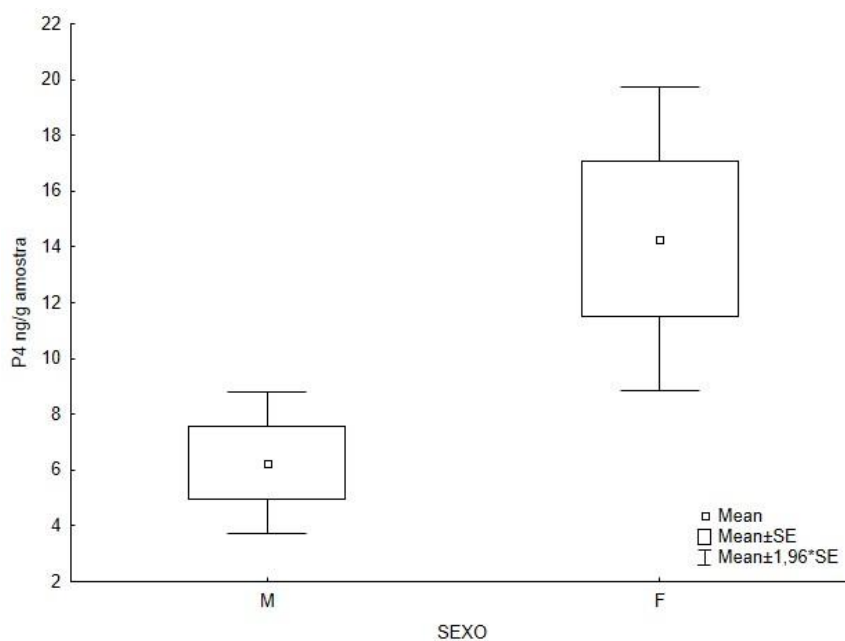


GRÁFICO 9. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de progesterona de fêmeas e machos com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($Z=-2,15$; $p=0,0314$).

3.3.2 Maturidade gonadal

A média dos níveis de progesterona para fêmeas maduras (n=7) foi de $32,93 \pm 23,39$ ng/g, e a média de progesterona para fêmeas imaturas (n=28) foi de $8,03 \pm 10,62$ ng/g. Foram observadas diferenças significativas, as fêmeas maduras exibiram níveis de progesterona mais elevados que as imaturas. P4 ng/g amostra: $Z= 2,57$; $p=0,0099$ (Teste de Mann-Whitney) (Gráfico 10).

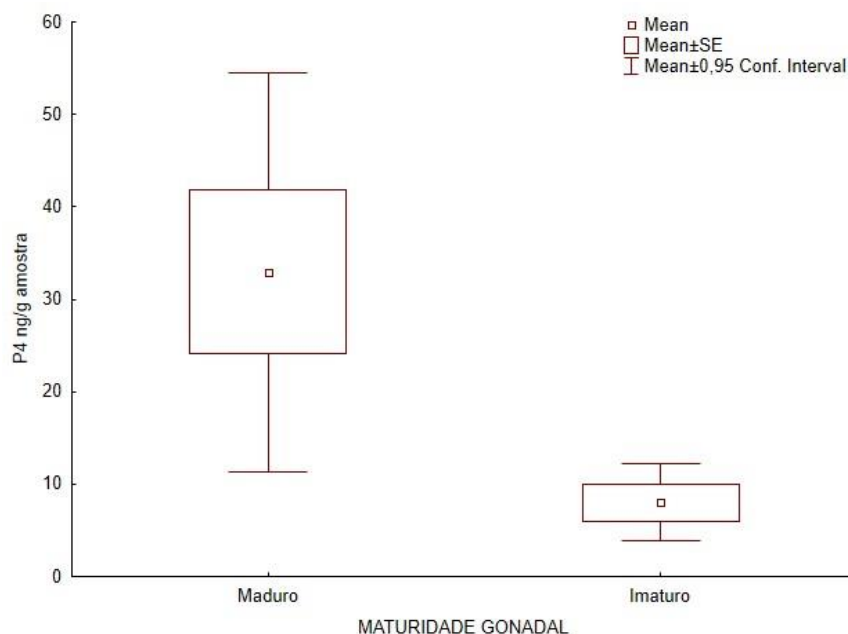


GRÁFICO 10. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de progesterona de fêmeas maduras e imaturas com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($Z= 2,57$; $p=0,0099$).

Os níveis de progesterona nos machos foram mensurados em ng/g de amostra (Teste t) e não foram significativamente distintos entre maduros ($n=7$; $\bar{x}=5,56$ ng/g; $\sigma=8,25$; $p=0,7171$; $df=26$; $t=-0,36$) e imaturos ($n=21$; $\bar{x}=7,32$ ng/g; $\sigma=11,67$; $p=0,7171$; $df=26$; $t=-0,36$).

3.3.3 Estágios de desenvolvimento

Foi realizada a comparação das dosagens de progesterona das fêmeas em relação as estágios de desenvolvimento (adulta: $n=15$; $\bar{x}=26,35$ ng/g; $\sigma=25,75$; juvenil: $n=17$; $\bar{x}=3,84$ ng/g; $\sigma=4,13$ e filhote: $n=14$; $\bar{x}=14,05$ ng/g; $\sigma=13,65$), e evidenciou que fêmeas adultas possuem níveis de progesterona significativamente maiores que filhotes e juvenis conforme o gráfico 11 (Kruskall Wallis: $H(2, N=46)=9,6812$; $p=0,0079$).

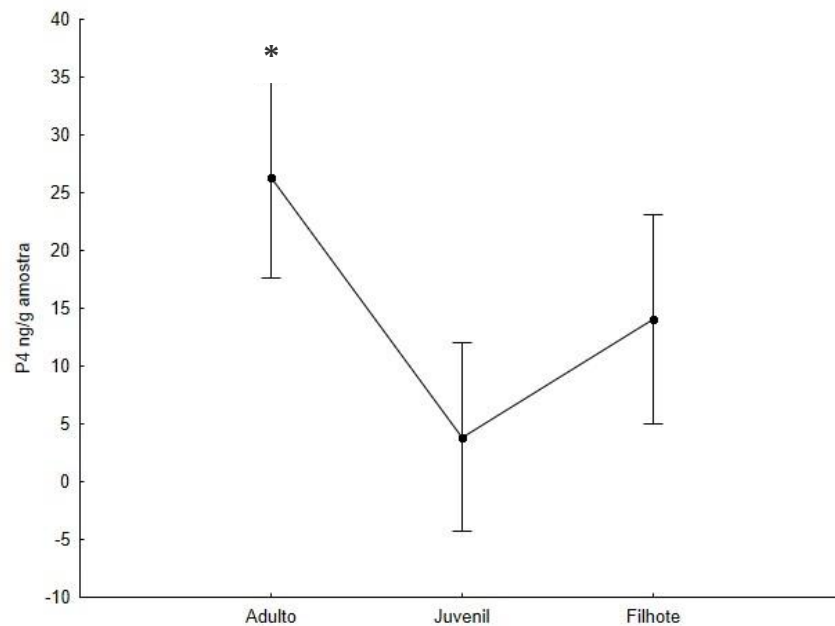


GRÁFICO 11. Médias e intervalos de confiança de 0,95 do nível de progesterona de fêmeas adultas, juvenis e filhotes com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($H(2, N=46)=9,6812$; $p=0,0079$). *Média de progesterona significativamente mais elevada que os demais estágios de desenvolvimento.

Quando a comparação ocorreu entre fêmeas adultas e juvenis, retirando-se os filhotes da análise, também foi observada diferença. As fêmeas adultas possuem significativamente maior nível de progesterona do que as juvenis. P4 ng/g de amostra (teste Mann-Whitney): adultas ($n=15$; $\bar{x}=26,35$ ng/g; $\sigma=25,75$) e juvenis ($n=17$; $\bar{x}=3,84$ ng/g; $\sigma=4,13$) ($Z=2,945494$; $p=0,0032$) (GRÁFICO 12).

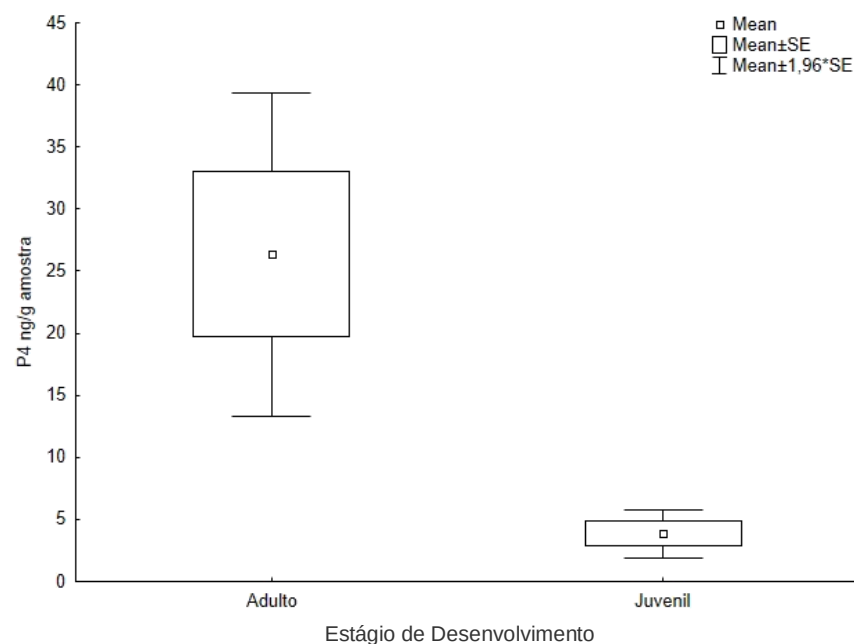


GRÁFICO 12. Médias e intervalos de confiança de 0,95 do nível de progesterona de fêmeas adultas e juvenis com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($Z=2,945494$; $p=0,0032$).

Quando a concentração de progesterona foi comparada entre fêmeas filhotes e juvenis, não foi observada diferença significativa (teste Mann-Whitney): $Z=-1,84597$; $p=0,0648$.

Foi realizada a comparação das dosagens de progesterona dos machos em relação aos estágios de desenvolvimento (adulto: $n=25$; $\bar{x}=5,69$ ng/g; $\sigma=8,46$; juvenil: $n=14$; $\bar{x}=3,79$ ng/g; $\sigma=5,97$ e filhote: $n=16$; $\bar{x}=9,27$ ng/g; $\sigma=13,04$), que não evidenciou diferença significativa (ANOVA unidirecional: $F=1,3080$; $p=0,2790$).

3.3.4 Comprimento total

Foi realizada uma análise de correlação entre as concentrações de progesterona nas amostras das fêmeas e o comprimento total das mesmas, e esta não exibiu uma correlação significativa (P4 ng/g: $r=0,2095$; $p=0,1671$). Quando a correlação foi realizada entre o comprimento total e as dosagens de progesterona nas amostras apenas das fêmeas adultas e juvenis, a progesterona aumentou significativamente conforme maior o comprimento total da fêmea ($r=0,60191$ e $p=0,0003$ ng/g) (Gráfico 13).

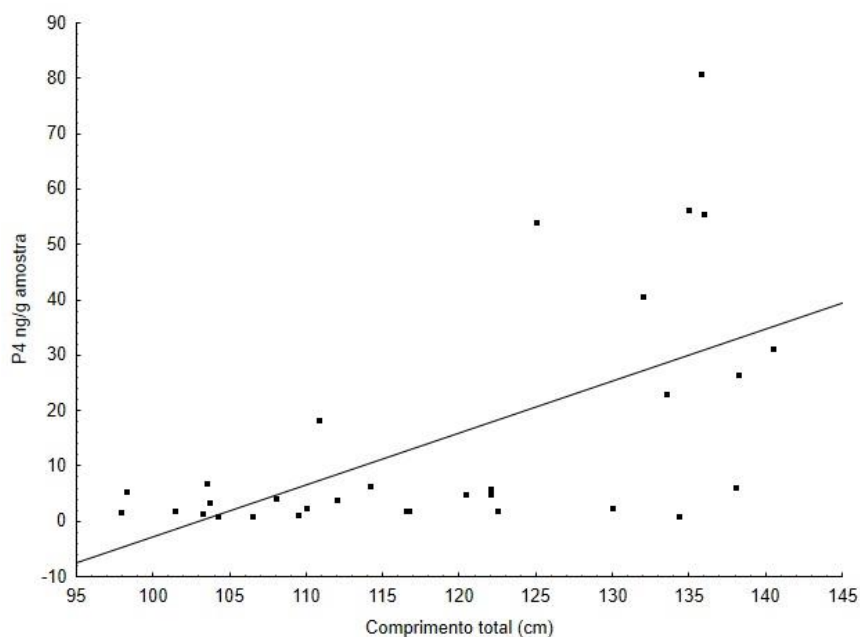


GRÁFICO 13. Correlação entre os níveis de progesterona e o comprimento total de fêmeas juvenis e adultas agrupadas em ng/g de amostra ($r=0,60191$; $p=0,0003$).

Realizou-se uma análise de correlação entre as dosagens de progesterona nas amostras dos machos e o comprimento total, e esta não exibiu uma correlação (P4 ng/g de amostra: $r=-0,1788$; $p=0,1916$). Quando a análise foi realizada retirando-se os filhotes, a correlação também não foi significativa (P4 ng/g de amostra: $r=0,1012$; $p=0,5401$).

3.3.5 Estimativa de idade

Não houve correlação significativa entre os níveis de progesterona das fêmeas e a estimativa de idade (P4 ng/g: $r=0,3546$; $p=0,0755$). Retirando-se os filhotes das análises, houve correlação significativa, os níveis de progesterona aumentaram nos animais com idade mais avançada ($r=0,6408$; $p=0,0248$) (Gráfico 14).

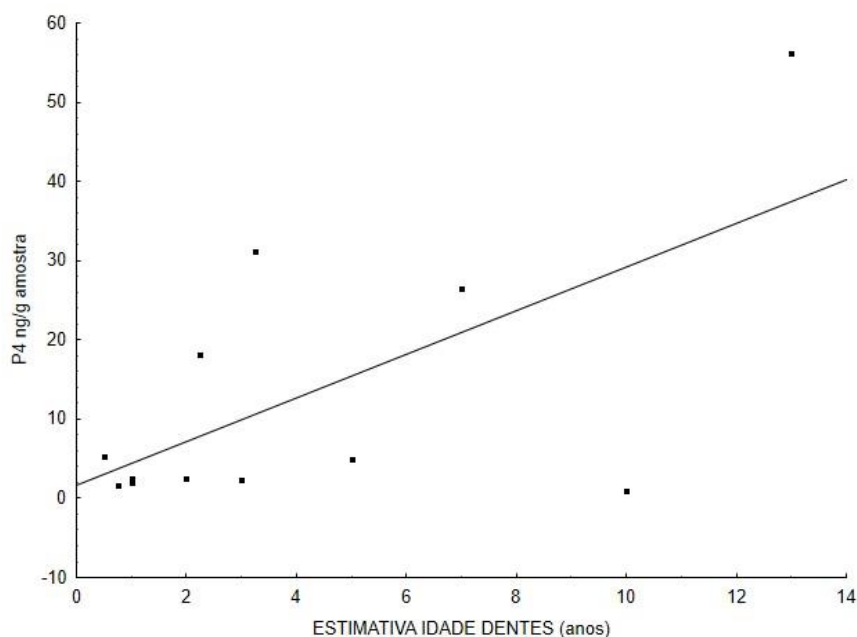


GRÁFICO 14. Correlação entre os níveis de progesterona e a estimativa de idade de fêmeas adultas e juvenis em ng/g de amostra ($r=0,6408$; $p=0,0248$).

Foi realizada uma análise correlação entre as concentrações de progesterona nas amostras dos machos e a estimativa de idade e esta não foi significativa (P4 ng/g de amostra: $r=-0,2273$; $p=0,2033$). Retirando-se os filhotes das análises, também não houve correlação significativa (P4 ng/g: $r=-0,2273$; $p=0,3493$).

3.3.6 Prenhez

Foi realizada uma análise entre as dosagens de progesterona entre as fêmeas prenhes ($n=4$) e o restante dos espécimes ($n=92$). As fêmeas prenhes exibiram a média de $52,35 \pm 26,44$ ng/g e os demais a média de $8,79 \pm 11,79$ ng/g (Mann Whitney: $Z=-3,03444$; $p=0,0024$) (Gráfico 15). Os níveis de progesterona das fêmeas prenhes foi significativamente mais elevado que o restante dos espécimes analisados.



GRÁFICO 15. Médias e intervalos de confiança de 0,95 do nível de progesterona de fêmeas prenhes e o restante dos espécimes com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($Z=-3,03444$; $p=0,0024$).

Quando a análise entre as fêmeas prenhes, maduras não prenhes e imaturas foi efetuado, também houve diferença estatística significativa. Fêmeas prenhes: $n=4$; $\bar{x}=52,35$; $\sigma=26,44$; maduras: $n=5$; $\bar{x}=23,78$; $\sigma=21,30$ e imaturas: $n=26$; $\bar{x}=8,65$; $\sigma=10,78$ (ANOVA unidirecional: $df=2$; $F=16,39$; $p=0,0000$) (Gráfico 16). As fêmeas prenhes tiveram as dosagens significativamente mais elevadas em relação as maduras não prenhes e imaturas (Gráfico 17).

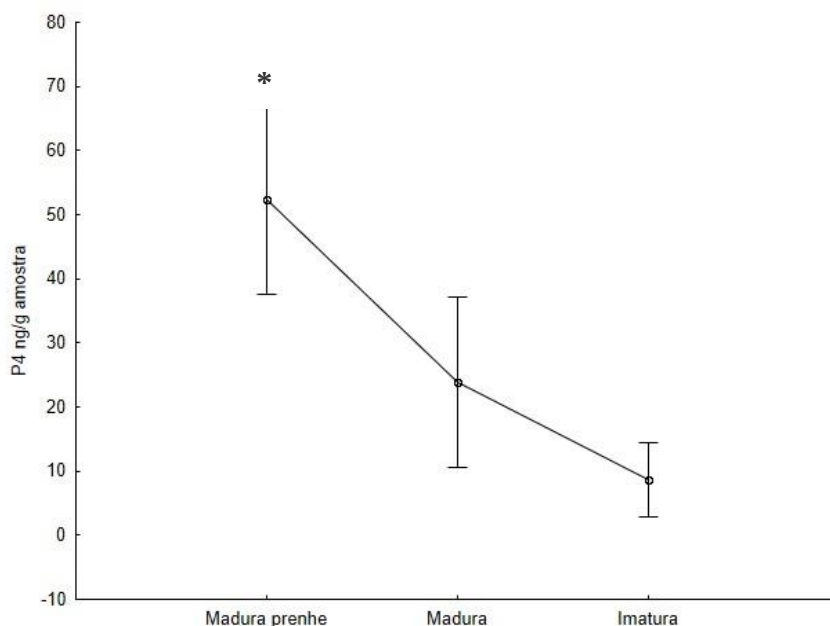


GRÁFICO 16. Médias e intervalos de confiança de 0,95 do nível de progesterona de fêmeas prenhes, maduras não prenhes e imaturas com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($df=2$; $F=16,39$; $p=0,0000$). *Média de progesterona significativamente mais elevada que as demais categorias.

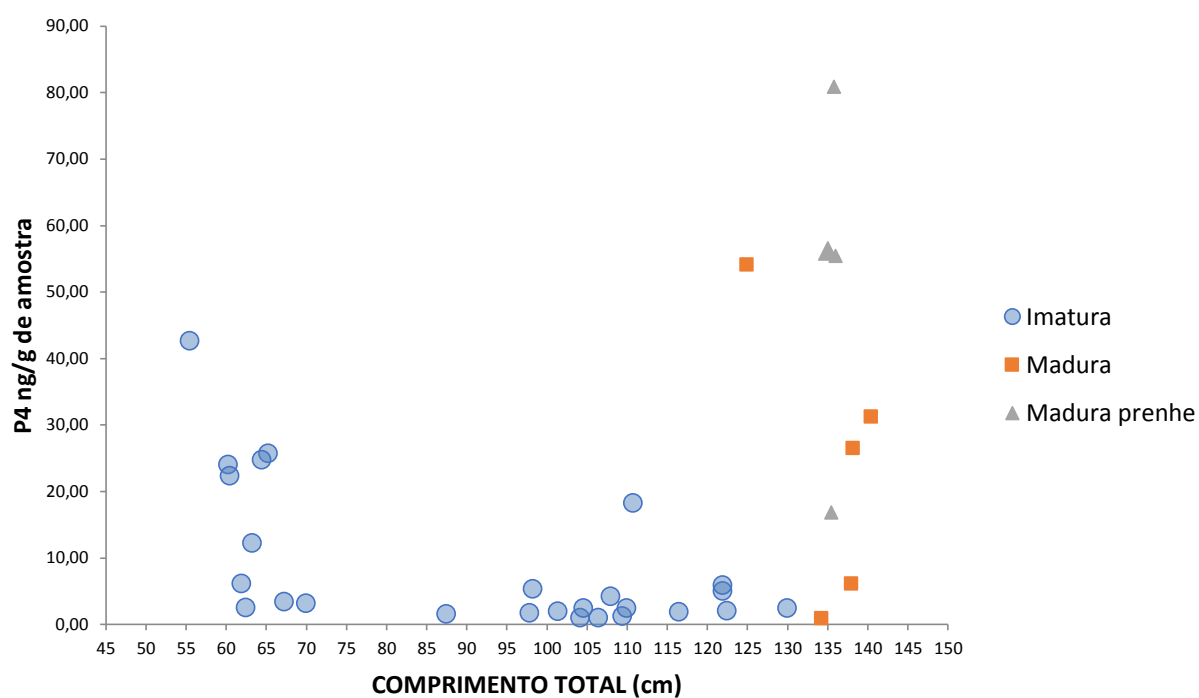


GRÁFICO 17. Concentração de progesterona em camada de gordura (ng/g de amostra) em função do comprimento total (cm) de fêmeas prenhes, maduras não prenhes e imaturas de *P. blainvillei*.

3.4 Testosterona

As concentrações de testosterona foram mensuradas para todos os espécimes. As análises realizadas nas unidades de concentração nanograma de hormônio por grama de amostra (ng/g) e nanograma de hormônio por miligrama de lipídeo extraído (ng/mg) apresentaram resultados estatisticamente semelhantes. Deste modo, a unidade ng/g foi representada por gráficos quando houve diferença/correlação significativa e todas as análises, em ambas as unidades, estão na Tabela 3.

TABELA 3. Análise estatística das dosagens de testosterona e dados biológicos - sexo, maturidade gonadal, estágio de desenvolvimento, comprimento total e estimativa de idade - dos espécimes (n=101) nas unidades nanograma de hormônio por grama de amostra (ng/g) e em nanograma de hormônio por miligrama de lipídeo extraído (ng/mg). $\bar{X}$ =média, σ =desvio padrão.

Parâmetro	Sexo	Categoria	n	Concentração (ngT/g _{amostra})	Resultados do Teste Estatístico		Concentração em (ngT/mg _{lipídeo})	Resultados do Teste Estatístico		
Sexo	Machos		55	$\bar{X}$ = 4,81; σ =5,5	t=2,41; df=99; p=0,0176		$\bar{X}$ = 6,99; σ =6,99	t=2,25; df=99; p=0,0260		
	Fêmeas		46	$\bar{X}$ = 2,40; σ =4,3			$\bar{X}$ = 3,64; σ =6,69			
Maturidade Gonadal	Machos	Maduros	7	$\bar{X}$ = 9,07; σ =10,94	t=2,07; df=26; p=0,0482		$\bar{X}$ =12,74; σ =14,46	t=2,45; df=26; p=0,0210		
		Imaturos	21	$\bar{X}$ = 3,45; σ =3,77			$\bar{X}$ =4,56; σ =3,60			
	Fêmeas	Maduras	7	$\bar{X}$ = 2,97; σ =4,23	df=33; t=0,17; p=0,8644		$\bar{X}$ = 3,97; σ =5,53	t=-0,04; df=33; p=0,9628		
		Imaturas	28	$\bar{X}$ = 2,61; σ =5,15			$\bar{X}$ = 4,12; σ =8,12			
Estágio de Desenvolvimento	Fêmeas	Filhotes	14	$\bar{X}$ =4,45; σ =6,85	H (2, N= 46) =6,4739; p=0,0393		$\bar{X}$ =7,21; σ =10,74	H (2, N= 46) =6,9884; p=0,0304		
		Juvenis	17	$\bar{X}$ =0,92; σ =1,01			$\bar{X}$ =1,37; σ =1,45			
		Adultas	15	$\bar{X}$ =2,14; σ =2,95			$\bar{X}$ =2,90; σ =3,87			
	Machos	Filhotes	16	$\bar{X}$ = 3,98; σ =4,33	F(2,52)=5,9443; p=0,0047	t=-3,19; df= 37; p=0,0028	$\bar{X}$ =5,19; σ =4,21	F(2;52) = 6,9657; p=0,0021	t=-3,22; df= 37; p=0,0026	t=-2,30; df=28; p=0,0289
		Juvenis	14	$\bar{X}$ = 1,51; σ =1,85			$\bar{X}$ =2,20; σ =2,60			
		Adultos	25	$\bar{X}$ = 7,19; σ =6,47			$\bar{X}$ =10,02; σ =8,82			
	Comprimento Total (CT em cm)	Fêmeas	Todos	46		r=-0,2747; p=0,0679			r= -0,3205; p=0,0318	
			Juvenis e adultas	32		r=0,3291; p=0,0707			r=0,3162; p=0,0831	
Machos		Todos	55	r= 0,1253; p=0,3621		r=0,0551; p=0,6893				
		Juvenis e adultos	39	r= 0,3276; p=0,0418		r=0,3318; p=0,0391				
Estimativa Dentária (Idade em anos)	Fêmeas	Todos	13	r=0,0283; p=0,8910		r= -0,0303; p=0,8834				
		Juvenis e adultas	12	r=0,6210; p=0,0311		r=0,5975; p=0,0402				
	Machos	Todos	27	r= 0,1145; p=0,5258		r=0,0825; p=0,6480				
		Juvenis e adultos	19	r= 0,1077; p=0,6608		r =0,1148; p=0,6398				

3.4.1 Sexo

As médias das concentrações de testosterona para os machos (n=55) foi de 4,81 ng/g ($\sigma=5,5$) e para fêmeas (n=46) de 2,40 ng/g ($\sigma=4,3$) (df=99; $t=2,41$; $p=0,0176$) (Gráfico 18). Houve diferença significativa, os machos exibiram níveis de testosterona maiores do que o das fêmeas.

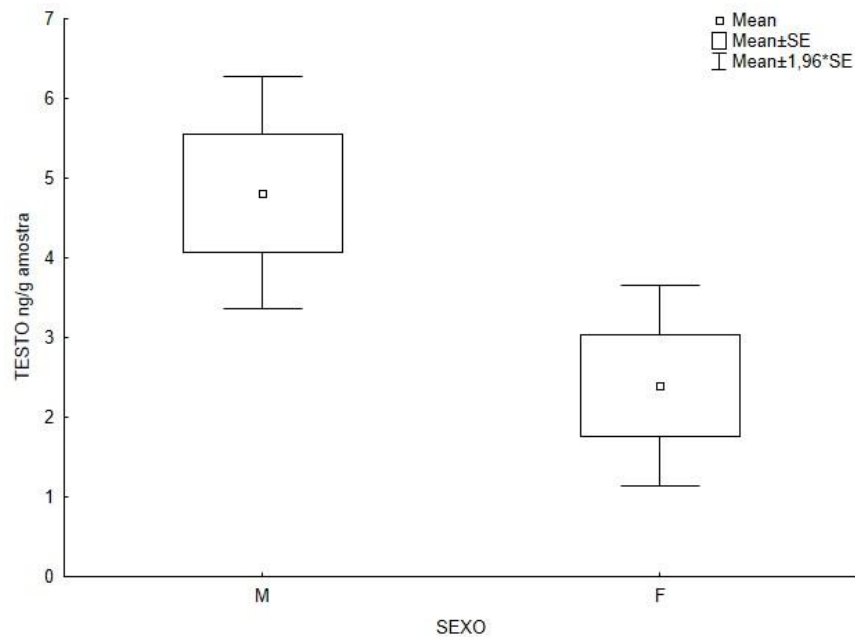


GRÁFICO 18. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de machos e fêmeas (n=55 machos e n=46 fêmeas) com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra (df=99; $t=2,41$; $p=0,0176$).

3.4.2 Maturidade gonadal

Os machos maduros obtiveram níveis hormonais mais elevados que os imaturos utilizando o teste t . A média dos maduros (n=7) foi de $9,07 \pm 10,94$ ng/g e dos imaturos (n=21) foi de $3,45 \pm 3,77$ ng/g (df=26; $t=2,07$; $p=0,0482$) (Gráfico 19).

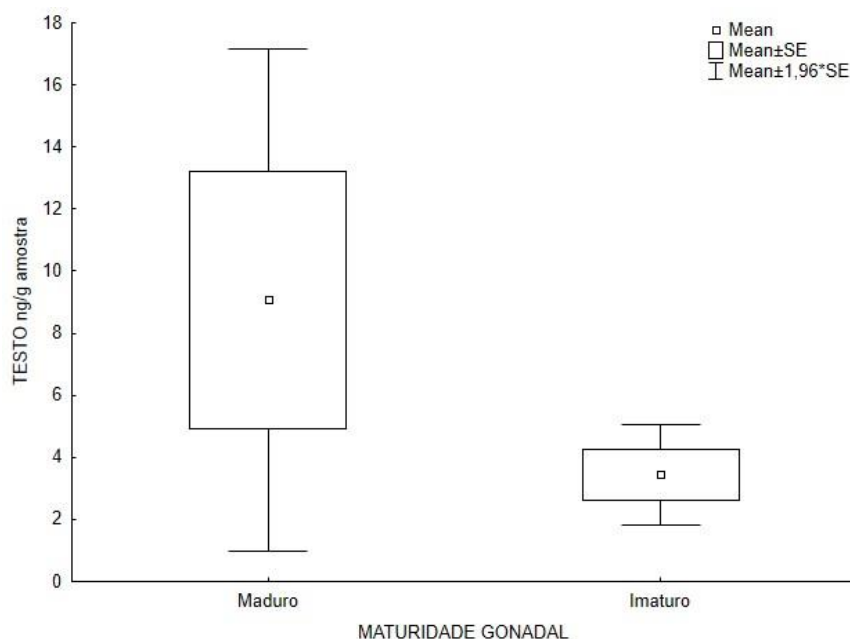


GRÁFICO 19. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de machos e fêmeas ($n=55$ machos e $n=46$ fêmeas) com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($df=26$; $t=2,07$; $p=0,0482$).

Os níveis de testosterona entre as fêmeas maduras e imaturas em em ng/g não foram estatisticamente diferentes pelo teste t : maduras ($n=7$; $\bar{x}=2,97$; $\sigma=4,23$; $df=33$; $t=0,17$; $p=0,8644$) e imaturas ($n=28$; $\bar{x}=2,6$; $\sigma=5,15$; $df=33$; $t=0,17$; $p=0,8644$).

3.4.3 Estágios de desenvolvimento

Foi comparado os níveis de testosterona dos machos entre os estágios de desenvolvimento (adultos: $n=25$, $\bar{x}=7,19$, $\sigma=6,47$; juvenis: $n=14$, $\bar{x}=1,51$, $\sigma=1,85$ e filhotes: $n=16$, $\bar{x}=3,98$, $\sigma=4,33$), observando-se uma diferença significativa. As dosagens médias dos adultos foram significativamente mais elevadas do que as dos filhotes e juvenis (ANOVA unidirecional: $F(2,52)=5,9443$; $p=0,0047$) (Gráfico 20).

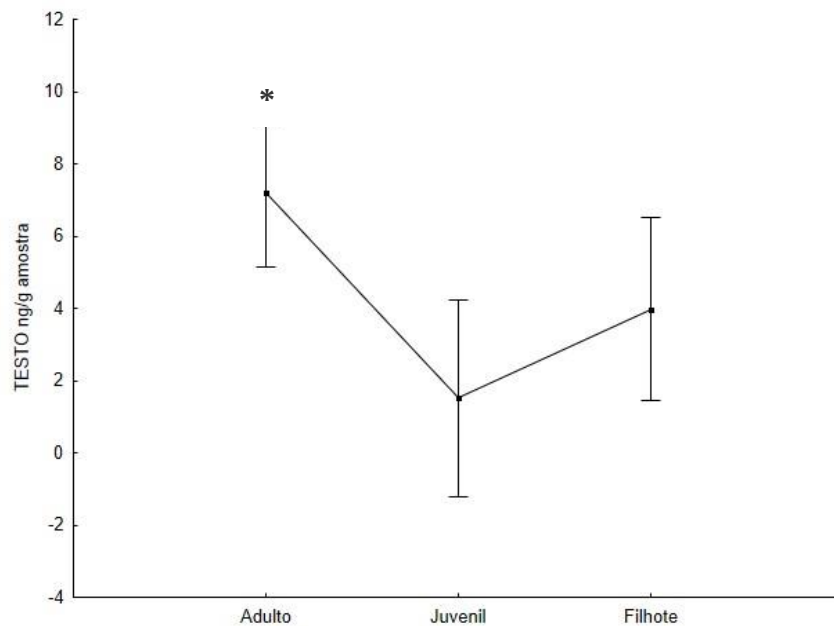


GRÁFICO 20. Média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de machos entre os estágios de desenvolvimento adultos, juvenis e filhotes em ng/g de amostra ($F(2,52)=5,9443$; $p=0,0047$). *Média de testosterona significativamente mais elevada que os demais estágios de desenvolvimento.

Realizando-se o teste t para comparação da dose de testosterona entre machos adultos e juvenis apenas, obteve-se os seguintes resultados: adultos ($n=25$) tem a dose significativamente maior que os juvenis ($n=14$). A média dos adultos foi de 7,19 ng/g ($\sigma=6,47$) e dos juvenis foi de 1,51 ng/g ($\sigma=1,85$) ($df=37$; $t=-3,19$; $p=0,0028$) (Gráfico 21).

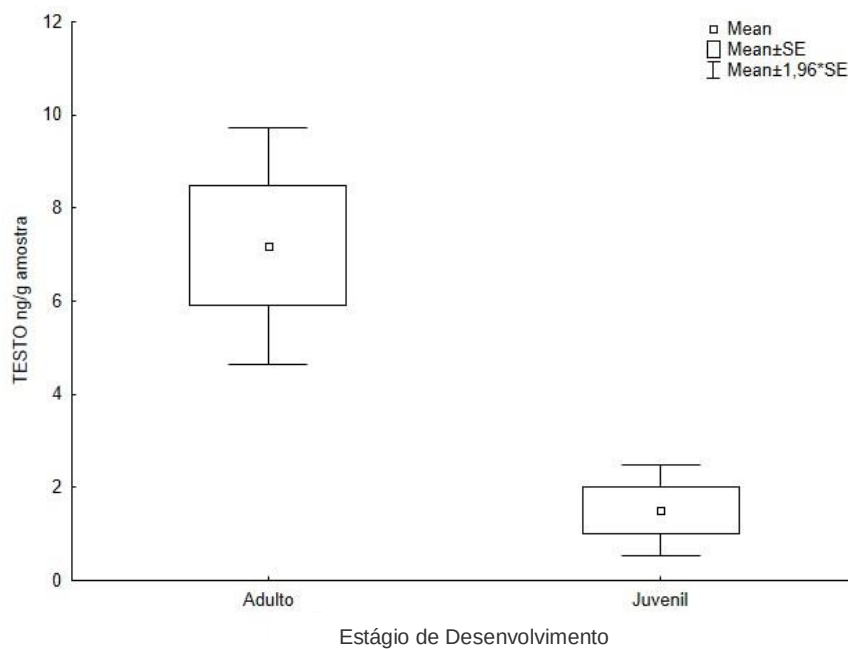


GRÁFICO 21. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de machos adultos e juvenis com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($df=37$; $t=-3,19$; $p=0,0028$).

A comparação dos níveis de testosterona entre machos juvenis (n=14) e filhotes (n=16) não revelou diferença significativa ($df=28$; $t=-1,97$; $p=0,0585$) pelo teste t em ng/g. Em relação as fêmeas, foi comparado os níveis de testosterona entre os estágios de desenvolvimento (adultos: $n=15$; $\bar{x}=2,14$; $\sigma=2,95$; juvenis: $n=17$; $\bar{x}=0,92$; $\sigma=1,01$ e filhotes: $n=14$; $\bar{x}=4,45$; $\sigma=6,85$), observando-se uma diferença significativa (Kruskal Wallis: $H(2, N=46)=6,4739$; $p=0,0393$) (Gráfico 22). As fêmeas filhotes possuem níveis de testosterona significativamente maiores do que adultas e juvenis.

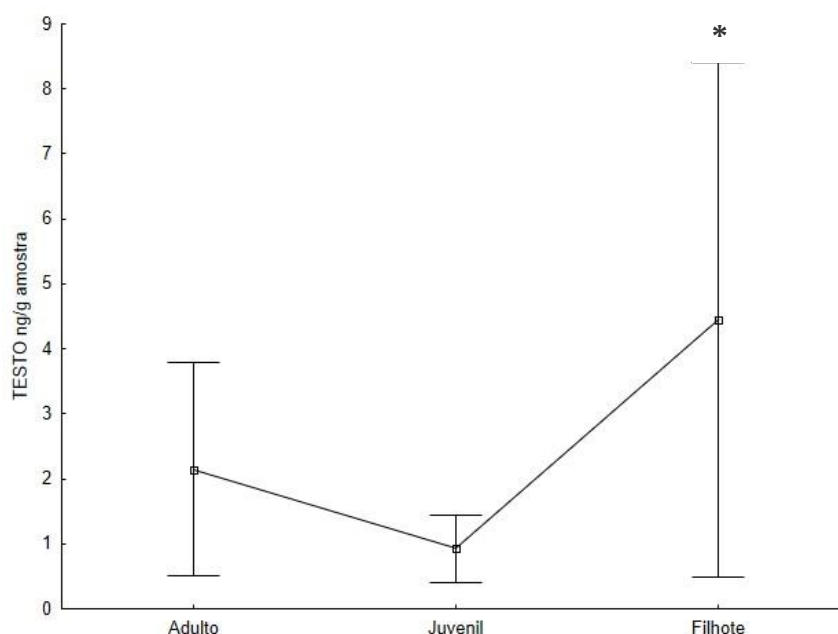


GRÁFICO 22. Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0,95 dos níveis de testosterona de fêmeas adultas, juvenis e filhotes com camada de gordura armazenada a -20°C em ng/g de amostra ($H(2, N=46)=6,4739$; $p=0,0393$). *Média de testosterona significativamente mais elevada que os demais estágios de desenvolvimento.

3.4.4 Comprimento total

Foi realizada uma análise de correlação entre as dosagens de testosterona nas amostras dos machos e o comprimento total e não houve uma correlação significativa (T ng/g de amostra: $r=0,1253$; $p=0,3621$). Quando a análise foi realizada entre as concentrações de testosterona nas amostras dos machos e o comprimento total retirando-se os filhotes, houve correlação significativa (T ng/g de amostra: $r=0,3276$; $p=0,0418$) (Gráfico 23). Os níveis de testosterona no tecido adiposo dos machos aumentou conforme o aumento do comprimento total destes.

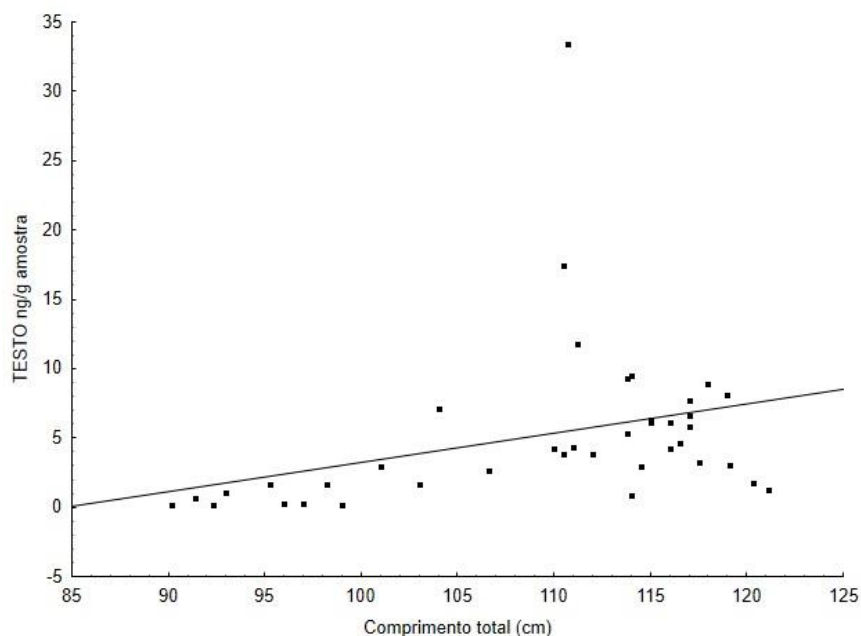


GRÁFICO 23. Correlação entre os níveis de testosterona e o comprimento total dos machos adultos e juvenis em ng/g de amostra ($r=0,3276$; $p=0,0418$).

Quando a análise de correlação foi realizada entre as dosagens de testosterona nas amostras das fêmeas e o comprimento total, não houve correlação significativa ($r=-0,2747$; $p=0,0679$). Retirando-se os filhotes das análises, também não houve correlação significativa ($r=0,3291$; $p=0,0707$).

3.4.5 Estimativa de idade

Os níveis de testosterona nos machos não exibiram uma correlação significativa com a estimativa de idade (T ng/g de amostra: $r=0,1145$; $p=0,5258$). Quando os filhotes machos foram excluídos, a correlação continuou não sendo significativa (T ng/g: $r=0,1077$; $p=0,6608$).

Foi realizada uma análise de correlação entre os níveis hormonais de testosterona das fêmeas e a estimativa de idade e também não houve uma correlação significativa ($r=0,0283$; $p=0,8910$ em ng/g de amostra). Todavia, agrupando-se as fêmeas adultas e juvenis, os níveis de testosterona das fêmeas aumentaram significativamente de acordo com a idade mais avançada ($r=0,6210$; $p=0,0311$) (Gráfico 24).

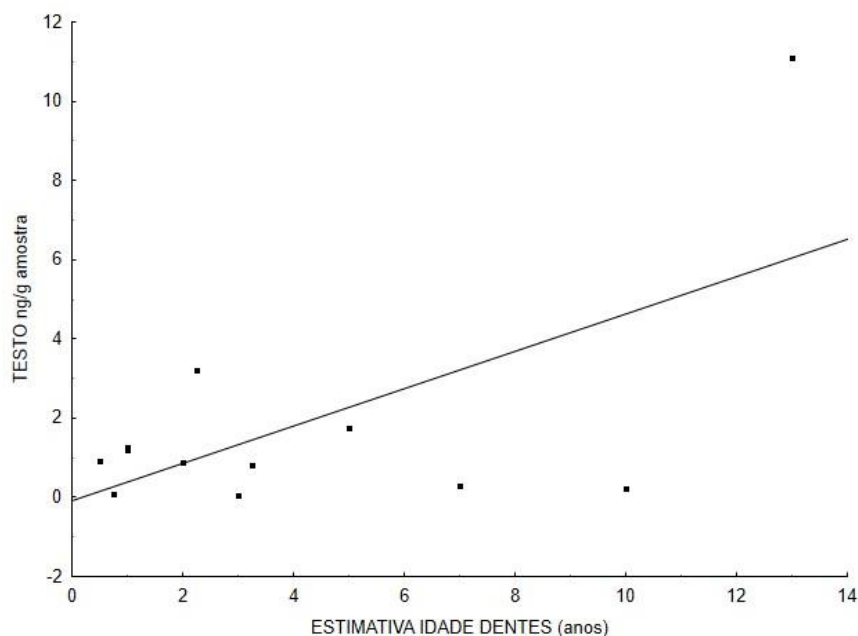


GRÁFICO 24. Correlação entre os níveis de testosterona e a estimativa de idade de fêmeas adultas e juvenis em ng/g de amostra ($r=0,6210$; $p=0,0311$).

4. DISCUSSÃO

A progesterona e a testosterona foram extraídas do tecido adiposo de toninha e dosadas de maneira efetiva. Este é o primeiro estudo que reporta a extração e dosagem de hormônios esteroides sexuais para *Pontoporia blainvillei* e as correlaciona com os parâmetros reprodutivos, produzindo uma validação biológica para a espécie.

A média das concentrações de progesterona das fêmeas ($14,29 \pm 18,87$ ng/g) foi significativamente mais elevada em relação aos machos ($6,25 \pm 9,6$ ng/g) ($p=0,0314$). A progesterona é um hormônio esteroide sexual, secretada pelo corpo lúteo ovariano, fundamental no ciclo das fêmeas devido a funções como preparação do trato reprodutivo para implantação e manutenção da prenhez (HAFEZ et al., 2004). A progesterona também é um precursor da testosterona, e nos machos possui um papel muitas vezes subestimado. As funções da progesterona no macho estão relacionadas a efeitos anti-androgênicos sobre a espermiogênese, a capacitação espermática, bem como efeitos sobre os sistemas imunológico, cardiovascular, respiratório, renal, no tecido adiposo, entre outros (OETTEL & MUKHOPADHYAY, 2004). Andersen e Tufik (2006) demonstraram a importância da progesterona no comportamento de machos de diversas espécies (humanos, répteis e roedores) como efeito sexual inibitório. Existem poucos estudos relacionados aos níveis de progesterona em machos de cetáceos. Mello (2014) realizou a mensuração dos níveis de progesterona em tecido adiposo de *Megaptera novaengliae* e obteve como resultado a média significativamente mais elevada nas fêmeas ($13,62 \pm 3,06$ ng/g) em relação aos machos ($0,94 \pm 0,15$ ng/g), o que corrobora com este estudo.

Quando comparados os níveis de progesterona nos machos maduros ($\bar{x}=5,56\pm 8,25$ ng/g) e imaturos ($\bar{x}=7,32\pm 11,67$ ng/g), estes não apresentaram diferença significativa ($p=0,7171$). A comparação das dosagens de progesterona dos machos em relação aos estágios de desenvolvimento (adulto: $\bar{x}=5,69\pm 8,46$ ng/g; juvenil: $\bar{x}=3,79\pm 5,97$ ng/g e filhote: $\bar{x}=9,27\pm 13,04$ ng/g) também não evidenciou diferença significativa ($p=0,2790$). Kellar et al. (2013b) dosaram a progesterona na gordura de machos de *Balaena mysticetus* e reportaram uma diferença significativa entre maduros ($\bar{x}=1,43\pm 0,25$ ng/g) e imaturos ($\bar{x}=0,52\pm 0,05$ ng/g), diferindo deste estudo. Porém, Kellar et al. (2013b) assumiram a classificação de maturidade com base no comprimento total disponível em literatura para espécie.

Diversos estudos demonstram uma produção local de hormônios esteroides sexuais pelo tecido adiposo em humanos, porém não há estudos que corroborem essa produção no *blubber* de cetáceos (DESLYPERE et al., 1985; FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Existem trabalhos que demonstram a secreção de progesterona sérica induzida por estresse em mamíferos derivada da adrenal, visto que os hormônios esteróides são sintetizados principalmente nas glândulas adrenais, gônadas e placenta (COOPER et al., 1995; ANDERSEN & TUFIK, 2006). Com isso, sugere-se que as toninhas do presente estudo encontravam-se em situação de estresse, pois a maioria possuía marcas de interação com rede de emalhe, e portanto a progesterona poderia ser derivada parcialmente dessa condição.

Todavia, existem estudos pontuais que demonstram as taxas de agregação dos hormônios séricos no tecido adiposo e sugerem que depende de fatores como taxa de perfusão, crescimento e atividade metabólica (CHAMPAGNE et al., 2016). Num estudo conduzido com suínos, o atraso da incorporação da progesterona no tecido adiposo foi estimado em 24 horas quando este hormônio está aumentando no sangue (HILLBRAND & ELSAESSER, 1983), o que pode sugerir um retardamento na incorporação também para toninha. Foi realizada a mensuração da concentração de cortisol em *Tursiops truncatus* em diversas matrizes (sangue, gordura e fezes) após administração de hidrocortisona e demonstrou uma associação entre o nível sérico e na gordura, com as colheitas realizadas num intervalo de 2 horas ou mais. Esses dados podem indicar que o tecido adiposo reflete a concentração de hormônios circulantes qualitativamente, com a ressalva de que a associação não é precisa quantitativamente (CHAMPAGNE et al., 2016). Kellar et al. (2013b) também sugerem a existência de uma forte relação entre concentrações de progesterona no soro e na gordura a longo prazo, porém pouca ou nenhuma a curto e médio prazo. Esta inferência foi proposta com a análise da correlação destas matrizes apenas em fêmeas prenhes (com altas concentrações hormonais) devido a magnitude e duração

da prenhez, sendo que a mesma correlação não ocorre na ausência das amostras de fêmeas prenhes.

As fêmeas maduras ($\bar{x}=32,93\pm23,39$ ng/g) exibiram níveis de progesterona significativamente mais elevados do que as imaturas ($\bar{x}=8,03\pm10,62$ ng/g) ($p=0,0099$). As dosagens de progesterona das fêmeas em relação aos estágios de desenvolvimento (adultas: $\bar{x}=26,35\pm25,75$ ng/g; juvenil: $\bar{x}=3,84\pm4,13$ ng/g e filhote: $\bar{x}=14,05\pm13,65$ ng/g) também evidenciou que fêmeas adultas possuem níveis de progesterona significativamente maior que filhotes e juvenis ($p=0,0079$). O valor mínimo de progesterona de uma das fêmeas prenhes no presente estudo foi de 16,88 ng/g, e ocorreu sobreposição deste valor bruto com animais imaturos, diferindo de estudos prévios (KELLAR et al., 2006; PÉREZ et al., 2011). Para as demais prenhes ($n=3$), o valor mínimo foi de 55,44 ng/g e o máximo para imaturas foi 42,62 ng/g. No presente estudo, a média das concentrações de progesterona das fêmeas prenhes ($\bar{x}=52,35\pm26,44$ ng/g) foi aproximadamente 6 vezes mais elevada que a média do restante dos espécimes ($\bar{x}=8,79\pm11,79$ ng/g) de toninha. As fêmeas prenhes também tiveram as dosagens significativamente mais elevadas em relação as imaturas ($\bar{x}=8,65\pm10,78$ ng/g) e maduras não prenhes ($\bar{x}=23,78\pm21,30$ ng/g) ($p=0,0000$). A validação biológica do uso de biopsias para estimar a prenhez em quatro espécies de cetáceos (*Delphinus capensis* ($n=18$), *Stenella attenuata* ($n=8$), *S. longirostris* ($n=6$), e *Phocoenoides dalli* ($n=8$)) foi realizado por Trego et al. (2013) e a concentração média em animais prenhes das espécies agrupadas ($n=7$) foi de 516,90 ng/g, representando a dosagem 246 vezes superior as fêmeas imaturas ($\bar{x}=2,08$ ng/g, $n=19$), e 112 vezes acima da média de maduras não prenhes ($\bar{x}=4,58$ ng/g, $n=14$) (TREGO et al., 2013). Mansour et al. (2002) realizaram a determinação da progesterona por radioimunoensaio em amostras de gordura de 36 baleias-minke (*Balaenoptera acutorostrata*) provenientes de caça. As prenhes ($n=22$) obtiveram uma concentração de progesterona aproximadamente 60 vezes maior do que as fêmeas não prenhes ou machos. Kellar et al. (2006) realizaram a determinação da prenhez a partir de 110 amostras de gordura de carcaça de *Delphinus delphis*, *Lissodelphis borealis* e *Lagenorhynchus obliquidens* através de ensaio imunoenzimático. As *D. delphis* prenhes ($n=18$) apresentavam, em média, 16 vezes mais progesterona na gordura do que as maduras não prenhes, sem sobreposição nas concentrações dos dois estágios reprodutivos. Os valores de progesterona mais elevados das fêmeas não prenhes tiveram uma diferença de quatro vezes em relação ao mais baixo das fêmeas prenhes. As fêmeas prenhes foram distintas a partir do valor de progesterona superior a 50 ng/g e este valor posteriormente foi utilizado para definição de prenhez em *D. delphis* de vida livre por meio de biopsias (Kellar et al., 2014). Num estudo com *Balaena mysticetus* (KELLAR et al.,

2013b), foi colhido tecido adiposo de 42 machos e 28 fêmeas, e realizado ensaio imunoenzimático para dosagem de progesterona. As fêmeas prenhes (n=6) tiveram as concentrações mais elevadas ($\bar{x}=615,70\pm1938$ ng/g), e se encontravam estatisticamente distintas de fêmeas maduras ($\bar{x}=7,12\pm3,4$ ng/g, n=3) e imaturas ($0,41 \pm 0,06$ ng/g, n=19). Além disso, fêmeas maduras apresentaram níveis significativamente mais elevados do que as imaturas. Pérez et al. (2011) mensuraram os níveis de progesterona em cetáceos (*Tursiops truncatus* e *Globicephala melas*). A média dos níveis de progesterona em *T. truncatus* foi cerca de 9 vezes mais elevado em fêmeas prenhes (n=2), sem ocorrer sobreposição em intervalos de concentração (diferença de 2,5 vezes entre o nível mais baixo das prenhes e o mais elevado das maduras). Há uma ressalva para o caso de existência de patologias reprodutivas, como presença de calcificação ovariana e tumores, porém não há elucidação de como tais patologias afetam a maturidade e o ciclo reprodutivo das fêmeas (BERTOZZI, 2009), porém neste estudo nenhum espécime possuía alterações patológicas nas gônadas. A maior parte dos estudos tiveram valores superiores e mais discrepantes do que as comparações realizadas no presente estudo, porém a validação ocorreu equitativamente. As concentrações refletiram a distinção entre as fêmeas prenhes e o restante dos espécimes, dando confiabilidade ao uso da progesterona como um dos métodos de verificação de prenhez em odontocetos.

Sabendo que a maturidade nos vertebrados em geral, e particularmente nos cetáceos, apresenta correlação positiva com seu comprimento total, este dado é utilizado por diversos estudos para categorizar os estágios de desenvolvimento (Robeck et al., 2006; Kellar et al., 2013b). Os primeiros resultados desta análise demonstraram que a dosagem de progesterona, tanto em fêmeas quanto em machos, não apresentou correlação com o comprimento total dos respectivos indivíduos (Fêmeas: $r=0,2095$; $p=0,1671$. Machos: $r=-0,1788$; $p=0,1916$). Entretanto, na ausência dos filhotes, mantendo-se apenas juvenis e adultas agrupados, foi possível observar uma correlação positiva nas fêmeas ($r=0,60191$; $p=0,0003$), enquanto entre os machos permanece a inexistência de correlação para este hormônio ($r=0,1012$; $p=0,5401$).

Um dado importante para explicar biologicamente as elevadas concentrações hormonais é que na categoria “filhotes” houve um agrupamento de filhotes e fetos, portanto os níveis elevados podem estar refletindo a circulação hormonal transmitida pela mãe ao feto, as quais possuem comprovadamente níveis elevados de progesterona durante a prenhez (Mansour et al., 2002; Kellar et al., 2006; Kellar et al., 2013b; Kellar et al., 2014). Deve-se considerar também que os filhotes possuem uma elevada taxa metabólica, e estudos sugerem que este é um dos fatores que influenciam na incorporação de hormônios no tecido adiposo (CHAMPAGNE et al., 2016). Outra hipótese é de uma extração hormonal mais efetiva em filhotes, tendo em vista

que o tecido adiposo dos recém-nascidos nos mamíferos são escassos em lipídeos, e o depósito de gordura em animais imaturos ocorre gradativamente devido a um aumento no número e no tamanho dos adipócitos (IVERSON, 2009).

Quando analisada a concentração de progesterona e sua relação com a idade (estimada pela análise do cemento dentário) observou-se que não houve correlação nas fêmeas ($r = 0,3546$; $p = 0,0755$), todavia, excluindo as amostras pertencentes aos filhotes, e mantendo somente as amostras de fêmeas adultas e juvenis, é possível observar uma correlação positiva ($r = 0,6408$; $p = 0,0003$). A idade das toninhas no presente estudo foi relacionada ao estágio de desenvolvimento e mensuração hormonal. Para fêmeas filhotes de até 0,5 anos, a média da progesterona foi de $14,05 \pm 13,65$ ng/g; para juvenis de 0,5 a 2,25 anos a média foi de $3,84 \pm 4,13$ ng/g e para adultas (e maduras) de 3 a 13 anos, a média foi de $26,35 \pm 25,75$ ng/g, evidenciando estatisticamente os níveis de progesterona mais elevados em fêmeas adultas ($p = 0,0079$). Os estudos de análise hormonal utilizando correlações com a idade em odontocetos são escassos. Nesses animais, a idade é determinada pela análise do cemento dentário, o que se torna um procedimento mais complexo em espécimes vivos. Apesar disso, o procedimento de extração dentária foi realizado para estimativa de idade associado a avaliação da saúde dos odontocetos em alguns estudos. Tal avaliação contemplou a dosagem de cortisol sérico, porém não analisou hormônios esteróides sexuais (SCHWACKE et al., 2014; SMITH et al., 2017). Steinman et al. (2016) reportou a relação do estrogênio, testosterona e cortisol sérico com a idade em fêmeas prenhes ($9,2 \pm 0,6$ anos, $n = 20$) em *Tursiops truncatus*, porém não realizou a dosagem de progesterona.

Os níveis de testosterona em toninhas foram mais elevados em machos maduros em relação aos imaturos (Machos maduros: $\bar{X} = 9,07$; $\sigma = 10,94$. Machos imaturos: $\bar{X} = 3,45$; $\sigma = 3,77$; $p = 0,0482$), porém não houve correlação com a idade ($r = 0,1145$; $p = 0,5258$), mesmo retirando as amostras de filhotes da análise ($r = 0,1077$; $p = 0,6608$). Para machos filhotes de até 0,75 anos, a média da testosterona foi de $3,98 \pm 4,33$ ng/g; para juvenis de 0,75 a 1,75 anos a média foi de $1,51 \pm 1,85$ ng/g e para adultos (e maduros) de 3,25 a 17 anos, a média foi de $7,19 \pm 6,47$ ng/g. As dosagens médias dos machos adultos foram significativamente mais elevadas do que filhotes e juvenis ($p = 0,0047$). Robeck et al. (2005) correlacionaram as dosagens de testosterona sérica com a idade de *Delphinapterus leucas* de cativeiro, e encontraram níveis significativamente mais elevados em machos mais velhos (acima de 8 anos, $\bar{x} = 5$ ng/mL) apenas nos meses de janeiro a abril em comparação com os machos mais jovens (menos de 8 anos, $\bar{x} = 0,95$ ng/mL), demonstrando sazonalidade reprodutiva. ROBECK & MONFORT (2006) caracterizaram a sazonalidade e a maturidade sexual em *Orcinus orca* com auxílio da dosagem de testosterona

sérica por radioimunoensaio. Foram utilizados 10 machos mantidos sob cuidados humanos. Os machos juvenis variaram de 1 a 7 anos ($\bar{x}=0,13\text{ng/mL} \pm 0,20$), machos púberes com 8 a 12 anos ($\bar{x}=2,88\text{ ng/mL} \pm 3,20$) e maduros com 13 anos ou mais ($\bar{x}=5,57 \pm 2,90\text{ ng/mL}$). Como discutido anteriormente, existe uma diferença na concentração hormonal em se tratando de diferentes matrizes, como na gordura e no soro, porém diversos estudos relatam uma associação significativa entre estas duas matrizes qualitativamente (CHAMPAGNE et al, 2016; KELLAR et al., 2013b).

Os machos ($\bar{x}=4,81 \pm 5,5\text{ ng/g}$) exibiram níveis de testosterona mais elevados do que as fêmeas ($\bar{x}=2,40 \pm 4,3\text{ ng/g}$) ($p=0,176$). Esse dado era predito, visto que a testosterona é um dos principais andrógenos para a espermatogênese em mamíferos. O testículo é responsável pela síntese do hormônio esteróide sexual testosterona, o qual possui funções de desenvolvimento e manutenção das glândulas sexuais acessórias, estimulação das características sexuais secundárias, do comportamento sexual e espermatogênese, além de possuir efeitos anabólicos (HAFEZ et al., 2004). Mello (2014) realizou a dosagem de testosterona em camada de gordura subcutânea de *Megaptera novaengliae* em machos e fêmeas em área de reprodução e em outra de alimentação. Machos na área de reprodução ($n=121$) apresentaram uma média de $0,83\text{ ng/g}$ ($\sigma=0,06$), a qual foi significativamente mais elevada do que das fêmeas ($n=30$), com média de $0,37\text{ ng/g}$ ($\sigma=0,03$). Para área de alimentação, machos ($n=12$) apresentaram $0,88\text{ ng/g}$ ($\sigma=0,08$) e fêmeas $0,79\text{ ng/g}$ ($\sigma=0,06$), porém esses valores não refletiram uma diferença significativa. Nesse estudo foi demonstrado uma concentração hormonal mais elevada e com valores significativamente maiores nos machos. Os níveis de testosterona entre as fêmeas maduras ($\bar{x}=2,97 \pm 4,23\text{ ng/g}$) e imaturas ($2,6 \pm 5,15\text{ ng/g}$) não foram estatisticamente diferentes ($p=0,8644$).

Apesar de os estágios de desenvolvimento e o valor do comprimento total estarem diretamente relacionados, não houve uma correlação significativa ($r=0,1253$, $p=0,3621$). A concentração de testosterona é utilizada como um indicador endócrino da maturidade reprodutiva para mamíferos machos, inclusive cetáceos. Muitos estudos realizaram a dosagem sérica de testosterona para machos de *Phocoenoides dalli* (TEMTE, 1991), *Globicephala melas* (DESPORTES et al., 1994), *Balaenoptera acutorostrata* (KJELD et al., 2004) e *Tursiops aduncus* (FUNASAKA, 2011), entre outros. Kellar et. al (2009) classificaram os machos de *Delphinus delphis* ($n=114$) nas categorias maduro, púbere ou imaturo por meio de análise testicular. Obteve níveis médios de testosterona na gordura em maduros de $14,3 \pm 3,0\text{ ng/g}$, os quais foram significativamente mais altos do que os de púberes ($\bar{x}=2,5 \pm 0,5\text{ ng/g}$) e de imaturos ($\bar{x}=2,2 \pm 0,3\text{ ng/g}$), o que corrobora com o presente estudo.

5. CONCLUSÕES

As duas unidades de concentração de hormônio (ng/g de amostra e ng/mg de lipídeo) apresentaram resultados estatisticamente semelhantes;

Os níveis de hormônios encontrados foram de acordo com o esperado fisiologicamente;

Fêmeas apresentaram níveis de progesterona mais elevados que machos, maduras tiveram níveis mais altos que imaturas;

As fêmeas adultas apresentaram níveis de progesterona mais elevados que juvenis e filhotes;

Não houve correlação dos níveis de progesterona com a idade das fêmeas;

As prenhes também apresentaram níveis de progesterona mais elevados que o restante dos espécimes;

Machos apresentaram níveis de testosterona mais elevados que fêmeas, maduros tiveram níveis mais altos que imaturos;

Os machos adultos apresentaram níveis de testosterona mais elevados que juvenis e filhotes;

Não houve correlação dos níveis de testosterona com a idade dos machos;

Os filhotes e fetos apresentaram níveis hormonais elevados, deve-se atentar a inclusão de indivíduos filhotes nas análises hormonais de cetáceos, pois o elevado nível hormonal pode criar um viés nas análises estatísticas e deve ser elucidado.

6. REFERÊNCIAS

AMARAL, R. S. (2010). Use of alternative matrices to monitor steroid hormones in aquatic mammals: a review. *Aquatic Mammals*, 36 (2): 162-171.

ANDERSEN, M. L., & TUFIK, S. (2006). Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Research Reviews*, 51(1), 136–143.

BERTOZZI, C. P. & ZERBINI, A. N. (2002). Incidental mortality of franciscana, *Pontoporiablainvillei*, in the artisanal fishery of Praia Grande, São Paulo State, Brazil. *The Latin American Journal of Aquatic Mammals* (special issue) 1 (1): 153-160.

BERTOZZI, C. P. Interação com a pesca: implicações na conservação da toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) no litoral do estado de São Paulo, SP. 2009. 189 f. Tese (Doutorado) - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BERTOZZI, C. P.; MARIGO, J.; BOTTA, S.; ALONSO, M.B.; HENNING, B.; RIBEIRO, J.; VIOTTO, J.; MARCATTO, F.; SOUZA, S.P.; DIAS, J.F. Idade e Comprimento de maturidade sexual para machos e fêmeas de Toninha, *Pontoporia blainvillei* acidentalmente capturadas no Estado de São Paulo. In: 8º Congresso da Sociedade Latinoamericana de Especialistas em

Mamíferos Aquáticos (SOLAMAC), 2010. Florianópolis. *Anais da XIV Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul (RT)*. 2010.

BORDINO, P.; THOMPSON, G.; IÑIGUEZ, M. (1999). Ecology and behaviour of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Bahía Anegada, Buenos Aires, Argentina. *J. cetacean res. manag.*, 1 (2): 213-222.

BORDINO, P. & ALBAREDA, D. (2004). Incidental mortality of Franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* in coastal gillnet fisheries in northern Buenos Aires, Argentina. Paper SC/56/SM11 presented at the International Whaling Commission Meeting, Sorrento, Italy, 19–22 July 2004.

CHAMPAGNE, C.D.; KELLAR, N.M.; CROCKER, D.E.; WASSER, S.K.; BOOTH, R.K. (2016). Blubber cortisol qualitatively reflects circulating cortisol concentrations in bottlenose dolphins. *Mar. mamm. sci.*, v. 33, p. 134-153.

CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Disponível em: <<http://www.cites.org/>>. Acesso em: 1 de março de 2018.

COOPER, C., EVANS, A. C. O., COOK, S., RAWLINGS, N.C. (1995) Cortisol, progesterone and beta-endorphin response to stress in calves. *Can J AnimSci*, 75: 197–201.

CRESPO, E.A. 2002. Franciscana - *Pontoporia blainvillei*. p. 482-487. In: W.F. PERRIN, B. WÜRSIG & J.G.M. THEWISSEN, [Eds.], *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, CA, USA.

CRESPO, E. A. (2018). Franciscana Dolphin. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 388–392. doi:10.1016/b978-0-12-804327-1.00133-3

CREMER, M.J., BARRETO, A. S., MARANHO, A., DOMIT, C., BARBOSA, C.B., KOLESNIKOVA, C.K.M., GROCH, K., DE OLIVEIRA, L. V., SANTOS, M. C., CASTILHO, P. V. & VALLE, R.R., (2016). High mortality of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in Brazil. Em: *Anais da XVII Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul (RT)*. Valparaíso, Chile.

CUNHA, H.A.; MEDEIROS, B.V.; BARBOSA, L.A.; CREMER, M.J.; MARIGO, J. et al. (2014) Population Structure of the Endangered Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*): Reassessing Management Units. *PLOS ONE*, v. 9, n. 1.

DE MELLO, D. M. D., & DE OLIVEIRA, C. A. (2016). Biological matrices for sampling free-ranging cetaceans and the implications of their use for reproductive endocrine monitoring. *Mammal Review*, 46(2), 77–91.

DESLYPERE, J. P.; VERDONCK, L.; VERMEULEN, A. (1985). Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 61(3), 564–570.

DESPORTES, G.; SABOUREAU, M.; LACROIX, A. (1994) Growth-related changes in testicular mass and plasma testosterone concentrations in long-finned pilot whales, *Globicephala melas*. *Reproduction*, 102 (1): 237–244.

- DO AMARAL, K. B., DANILEWICZ, D., ZERBINI, A., DI BENEDITTO, A. P., ANDRIOLO, A., ALVARES, D. J., SECCHI, E.; FERREIRA, E.; SUCUNZA, F.; BORGES-MARTINS, M.; SANTOS, M.C.O.; CREMER, M.; DENUNCIO, P.; OTT, P.H.; MORENO, I. B. (2018). Reassessment of the franciscana *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) distribution and niche characteristics in Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 508, 1–12.
- FONSECA-ALANIZ, M.H., TAKADA, J., ALONSO-VALE, M.I.C., LIMA, F.B. (2007) Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio de Janeiro)* 83: S192–S203.
- FRANCO-TRECU, V.; COSTA, P.; ABUD, C.; DIMITRIADIS, C.; LAPORTA, P.; PASSADORE, C.; SZEPEGY, M. (2009). Bycatch of franciscana *Pontoporia blainvillei* in uruguayan artisanal gillnet fisheries: an evaluation after a twelve-year gap in data collection. *Lat. Am. J. Aquat. Mamm.*, 7 (1-2): 11-22.
- FUNASAKA, N. (2011). Seasonal difference of diurnal variations in serum melatonin, cortisol, testosterone, and rectal temperature in Indo-Pacific Bottlenose Dolphins (*Tursiops aduncus*). *Aquatic Mammals*, 37(4), 433–442.
- GERACI, J.R. & LOUNSBURY, V.J. (2005). *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings*. 2nd ed., National Aquarium in Baltimore, Baltimore, EUA.
- GERVAIS, P. & D'ORBIGNY, A. (1844). *Mammalogie*. Bulletin de la Société Philomathique, Paris, April 27, 1844:38--40.
- HAFEZ, E.S.E.; JAINUDEEN, M.R.; ROSNINA, Y. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. São Paulo: Manole, 2004. Cap 3, p. 33-53.
- HARRISON, R. J.; BRYDEN, M. M.; MCBREARTY, D. A.; BROWNELL, R. L. (1981). The ovaries and reproduction in *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Platanistidae). *J. LINN. SOC. LOND. ZOOL.*, v. 193, p. 563-580.
- HILLBRAND, F.W. & ELSAESSER, F. (1983). Concentrations of progesterone in the backfat of pigs during the oestrous cycle and after ovariectomy. *Reproduction*, 69(1), 73–80.
- HOHN, A. A., CHIVERS, S. J., & BARLOW, J. (1985). Reproductive maturity and seasonality of male spotted dolphins, *Stenella attenuata*, in the eastern tropical Pacific. *Marine Mammal Science*, 1(4), 273–293.
- ICMBio (2010). Plano de ação nacional para a conservação do pequeno cetáceo Toninha: *Pontoporia blainvillei*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.
- IVERSON, S.J. (2009). Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. In: Kainz, M., Brett, M., Arts, M. (eds) *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York, NY.
- KELLAR, N. M., TREGO, M. L., MARKS, C. I., DIZON, A. E. (2006). Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. *Marine Mammal Science*, 22 (1): 1-16.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; MARKS, C. I.; CHIVERS, S. J.; DANIL, K.; ARCHER, FREDERICK I. (2009). Blubber testosterone: a potential marker of male reproductive status in short-beaked common dolphins. *Marine Mammal Science*, 25 (3): 507–522.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; CHIVERS, S. J.; ARCHER, F. I. (2013a). Pregnancy patterns of pantropical spotted dolphins (*Stenella attenuata*) in the eastern tropical Pacific determined from hormonal analysis of blubber biopsies and correlations with the purse-seine tuna fishery. *Marine Biology*, 160 (12): 3113–3124.

KELLAR, N. M.; KELIHER, J.; TREGO, M. L.; CATELANI, K. N.; HANNS, C.; CRAIG, J. C.; ROSA, C. (2013b). Variation of bowhead whale progesterone concentrations across demographic groups and sample matrices. *Endangered Species Research*, v. 22, p. 61–72.

KELLAR, N.; TREGO, M.; CHIVERS, S. (2014). From Progesterone in Biopsies to Estimates of Pregnancy Rates: Large Scale Reproductive Patterns of Two Sympatric Species of Common Dolphin, *Delphinus* spp. off California, USA and Baja, Mexico. *Bulletin, Southern California Academy of Sciences*, 113 (2): 58–80.

KJELD, M.; ALFREDSSON, A.; ÓLAFSSON, O.; TRYLAND, M.; CHRISTENSEN, I.; STUEN, S.; ÁRNASON, A. (2004). Changes in blood testosterone and progesterone concentrations of the North Atlantic minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) during the feeding season. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 61, p. 230-237.

MANSOUR, A. A. H.; MKAY, D. W.; LIEN, J.; ORR, J. C.; BANOUB, J. H.; OIEN, N.; STENSON, G. (2002). Determination of pregnancy status from blubber samples in Minke Whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Marine Mammal Science*, 18 (1): 112–120.

MARIGO, J.; GROCH, K.R. Cetacea: Golfinhos e Baleias. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. 2ª ed., São Paulo: Roca, 2014. Cap 43, p. 917-935.

MELLO, D. M. D. Uso de gordura subcutânea como matriz na dosagem de esteroides sexuais em baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*). 2014. 160 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MELLO, D.; COLOSIO, A.; MARCONDES, M.; VIAU, P.; OLIVEIRA, C. (2017). Feasibility of using humpback whale blubber to measure sex hormones. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 486, p. 32- 41.

MMA, Ministério do Meio Ambiente. Portarias nº 444/2014 e nº 445/2014, 17 de dezembro de 2014. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>>. Acesso em: 21.fev.2018.

MOURA, J.F.; RODRIGUES, E.S; SHOLL, T.G.C.; SICILIANO, S. (2009). Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) on the north-east coast of Rio de Janeiro State, Brazil, record during a long term monitoring programme. *Marine Biodiversity Records*, v. 2, p. 1-4.

MYRICK JR, A. C.; HOHN, A. A.; SLOAN, P. A.; KIMURA, M.; STANLEY, D. D. (1983). Estimating age of spotted and spinner dolphins (*Stenella attenuata* and *Stenella longirostris*) from teeth. *NOAA Technical Memorandum NMFS*, n. 30, 17p.

NEGRI, M.F.; DENUNCIO, P.; PANEBIANCO, M.V.; CAPPOZZO, H.L. (2012). Bycatch of franciscana dolphins *Pontoporia blainvillei* and the dynamics of artisanal fisheries in the species Southern most area of distribution. Brazilian Journal of Oceanography, 60 (2): 149-158.

OETTEL, M., & MUKHOPADHYAY, A. (2004). Progesterone: the forgotten hormone in men? The Aging Male, 7(3), 236–257.

PÉREZ, S.; GARCÍA-LÓPEZ, Á.; STEPHANIS, R.; GIMÉNEZ, J.; GARCÍA-TISCAR, S.; VERBORGH, P.; MANCERA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, G. (2011). Use of blubber levels of progesterone to determine pregnancy in free-ranging live cetaceans. Marine Biology, 158 (7): 1677–1680.

PERRIN, W. F.; DONOVAN, G. P. (1984). Report of the workshop. Report of the International Whaling Commission, v. 6, p. 1-24.

PINEDO, M. C. Development and Variation of the Franciscana, *Pontoporia blainvillei*. 1991. 406 p. Ph. D. Dissertation (Doutorado em Biologia) - University of California, 1991.

ROBECK, T. R.; MONFORT, S. L.; CALLE, P. P.; DUNN, J. L.; JENSEN, E.; BOEHM, J. R.; YOUNG, S.; CLARK, S. T. (2005). Reproduction, growth and development in captive beluga (*Delphinapterus leucas*). Zoo Biology, 24 (1): 29–49.

ROBECK, T. R., & MONFORT, S. L. (2006). Characterization of male killer whale (*Orcinus orca*) sexual maturation and reproductive seasonality. Theriogenology, 66(2): 242–250.

ROSAS, F.C.W.; MONTEIRO FILHO, E.L.A.; OLIVEIRA, M.R. (2002). Incidental catches of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) on the southern coast of São Paulo State and the coast of Paraná State, Brazil. LAJAM 1(1): 161-168.

SCHWACKE, L. H., SMITH, C. R., TOWNSEND, F. I., WELLS, R. S., HART, L. B., Balmer, B. COLLIER, T.K., DE GUISE, S., FRY, M.M., GUILLETTE JR, L.J., LAMB, S.V., LANE, S.M., McFREE, W.E., PLACE, N.J., TUMLIN, M.C., YLITALO, G.M., ZOLMAN, E.S., ROWLES, T.K. (2013). Health of Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in Barataria Bay, Louisiana, Following the Deepwater Horizon Oil Spill. Environmental Science & Technology, 48(1), 93–103.

SECCHI, E.R.; WANG, J. Y.; MURRAY, B.; ROCHA-CAMPOS, C. C.; WHITE, B. N. (1998). Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. Can. j. zool., v. 76, p. 1622-1627.

SECCHI, E. R.; DANILEWICZ, D.; OTT, P.H. (2003b). Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implication to meet management objectives. J. cetacean res. manag., 5 (1):61-68.

SECCHI, E. R.; KINAS, P. G.; MUELBERT, M. (2004). Incidental catches of franciscana in coastal gillnet fisheries in the Franciscana Management Area III: period 1999 – 2000. Lat. Am. j. aquat. mamm., v. 3, p. 61-68.

SICILIANO, S. (1994). Review of small cetaceans and fishery interactions in coastal waters of Brazil. In: Perrin, W. F.; Donovan, G. P.; Barlow, J. (Ed.) Gillnets and cetaceans. Rep. Int. Whal. Comm., Spec. issue, n. 15, p. 241-250.

SMITH, C.R., ROWLES, T.K., HART, L.B., TOWNSEND, F.I., WELLS, R.S., ZOLMAN, E.S., BALMER, B.C., QUIGLEY, B., IVANCIC, M., McKERCHER, W., TUMLIN, M.C., MULLIN, K.D., ADAMS, J.D., WU, Q., McFEE, W., COLLIER, T.K., SCHWACKE, L.H. Slow recovery of Barataria Bay dolphin health following the *Deepwater Horizon* oil spill (2013-2014), with evidence of persistent lung disease and impaired stress response. (2017) *Endang Species Res* 33:127-142.

TEMTE, J.L. (1991). Use of serum progesterone and testosterone to estimate sexual maturity in Dall's porpoise *Phocoenoides dalli*. *Fish Bull* 89:161–166.

TRANA, M.R.; ROTH, J.D.; TOMY, G.T.; ANDERSON, W.G.; FERGUSON, S.H. (2015). Influence of sample degradation and tissue depth on blubber cortisol in beluga whales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 462 p. 8–13.

TREGO, M. L.; KELLAR, N. M.; DANIL, K. (2013) Validation of blubber progesterone concentrations for pregnancy determination in three dolphin species and a porpoise. *PLOS One*, 8 (7): e69709.

WEST, K. L.; ATKINSON, S.; CARMICHAEL, M. J.; SWEENEY, J. C.; KRAMES, B.; KRAMES, J. (2000). Concentrations of progesterone in milk from bottlenose dolphins during different reproductive states. *General and Comparative Endocrinology*, 117(2): 218–24.

ZERBINI, A.N., SECCHI, E., CRESPO, E., DANILEWICZ, D. & REEVES, R. 2017. *Pontoporia blainvillei* (errata version published in 2018). *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e. T17978A123792204. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T17978A50371075.en>. Downloaded on 24 February 2019.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam a importância da validação dos métodos para dosagem hormonal em cetáceos para padronização das técnicas e possibilidade de futuras comparações. Existem muitas limitações ao trabalhar com uma espécie ameaçada, de difícil avistamento e que geralmente é encontrada apenas em óbito. Sugere-se a realização de estudos relacionados a dinâmica da incorporação de hormônios séricos na gordura, além de análise hormonal associada a sazonalidade.