

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta Dissertação,
será disponibilizado somente a partir
de 19/03/2021.



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).

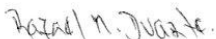
Essa ficha não pode ser modificada.

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.

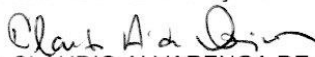
Aos 13 dias do mês de março do ano de 2019, às 09:30 horas, no(a) Sala 05 do Instituto de Biociências - UNESP/CLP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. CAROLINA PACHECO BERTOZZI - Orientador(a) do(a) Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral 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, borriço) 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).

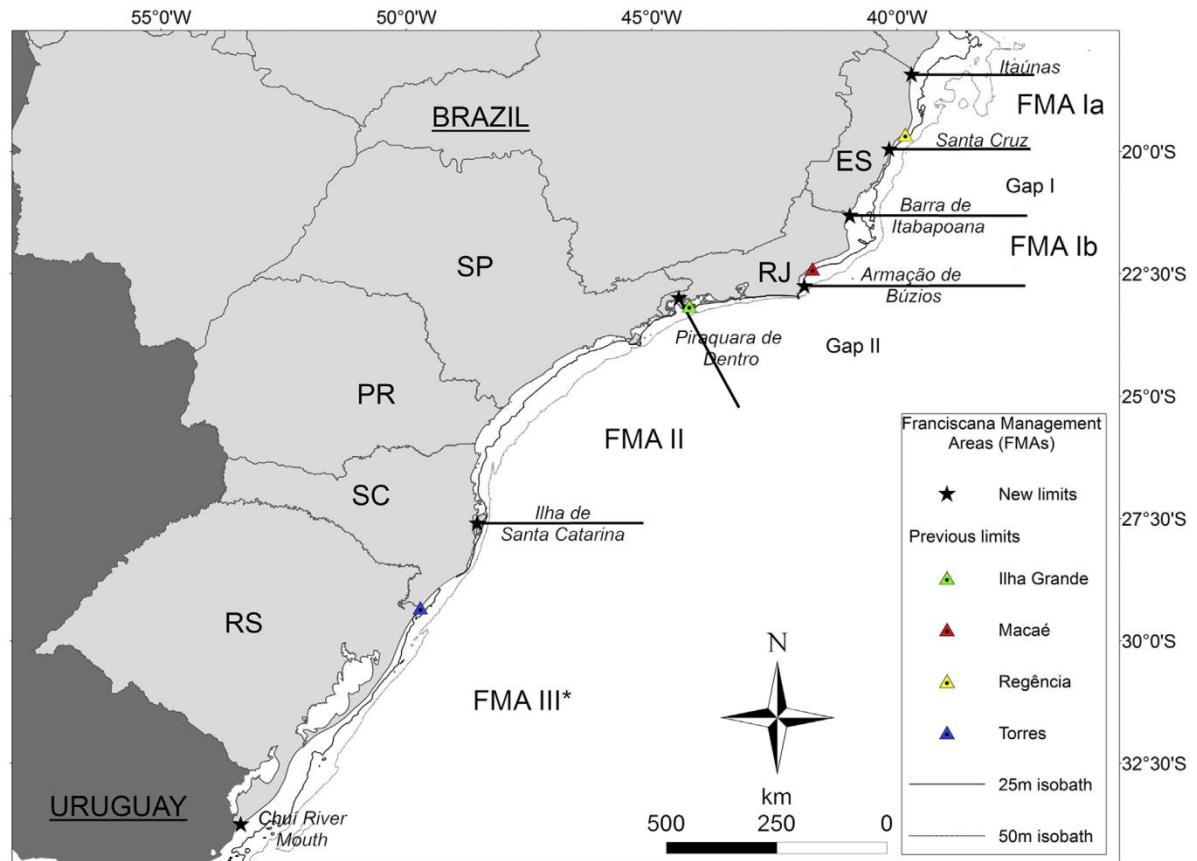


FIGURA 1. Mapa de distribuição das FMAs (*Franciscana Management Areas*) com as lacunas de distribuição. As localidades consideradas limites anteriormente (ICMBio, 2010) estão indicadas no mapa por triângulos. Abreviações: ES, Espírito Santo, RJ, Rio de Janeiro, SP, São Paulo, PR, Paraná, SC, Santa Catarina,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

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 BENEDITTO & 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., KOLESHNIKOVAS, 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.