DANIELA MAGALHÃES DRUMMOND DE MELLO

**Uso de gordura subcutânea como matriz biológica na dosagem de
esteroides sexuais em baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*)**

São Paulo
2014

DANIELA MAGALHÃES DRUMMOND DE MELLO

Uso de gordura subcutânea como matriz biológica na dosagem de esteroides sexuais em baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3061
FMVZ

Mello, Daniela Magalhães Drummond de
Uso de gordura subcutânea como matriz biológica na dosagem de esteroides sexuais em
baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*) / Daniela Magalhães Drummond de Mello. -- 2014.
160 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

1. Progesterona. 2. Testosterona. 3. Estradiol. 4. *Megaptera novaeangliae*. 5. Esteroides
sexuais. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso de gordura subcutânea como matriz biológica para dosagem de esteróides sexuais em baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*)", protocolado sob o nº 2221/2011, utilizando 180 (cento e oitenta) baleias jubarte, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/5/2011.

We certify that the Research "Subcutaneous blubber as a biological matrix for measurement of sex steroids in humpback whale (*Megaptera novaeangliae*)", protocol number 2221/2011, utilizing 180 (one hundred eighty) humpback whale, under the responsibility Prof. Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/18/2011.

São Paulo, 19 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27950-1	Data da Emissão: 07/04/2011 16:39
Dados do titular	
Nome: CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA	CPF: 041.973.678-64
Título do Projeto: Uso de gordura subcutânea como matriz biológica para dosagem de esteróides sexuais em baleia jubarte (Megaptera novaeangliae)	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras de animais de vida livre e de carcaças	06/2011	12/2011
2	Transporte de amostras para Laboratório USP	12/2011	12/2011
3	Análise laboratorial das amostras	01/2012	05/2012
4	Coleta de amostras de animais de vida livre e de carcaças	06/2012	12/2012
5	Transporte de amostras para Laboratório USP	12/2012	12/2012
6	Análise laboratorial das amostras	01/2013	05/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Priscila Vlau Furtado	Colaboradora	666.135.074-15	37831381-2 SSP-SP	Brasileira
2	DANIELA MAGALHAES DRUMMOND DE MELLO	Executora	700.404.271-53	21367248 SSP-AM	Brasileira
3	Milton Cesar Calzavara Marcondes	Colaborador	096.878.728-29	18080342 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		BA	PARQUE NACIONAL MARINHO DOS ABROLHOS	UC Federal
2		ES	Todo litoral do estado	Fora de UC
3		BA	Todo litoral do estado da Bahia	Fora de UC
4		AL	Todo litoral do estado do Alagoas	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 84514583

Página 1/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27950-1	Data da Emissão: 07/04/2011 16:39
Dados do titular	
Nome: CLAUDIO ALVARENGA DE OLIVEIRA	CPF: 041.973.678-64
Título do Projeto: Uso de gordura subcutânea como matriz biológica para dosagem de esteróides sexuais em baleia jubarte (Megaptera novaeangliae)	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

5	CE	Todo litoral do estado do Ceará	Fora de UC
6	MA	Todo litoral do estado do Maranhão	Fora de UC
7	PB	Todo litoral do estado da Paraíba	Fora de UC
8	PR	Todo litoral do estado do Paraná	Fora de UC
9	PE	Todo litoral do estado de Pernambuco	Fora de UC
10	PI	Todo litoral do estado do Piauí	Fora de UC
11	RJ	Todo litoral do estado do Rio de Janeiro	Fora de UC
12	RN	Todo litoral do estado do Rio Grande do Norte	Fora de UC
13	RS	Todo litoral do estado do Rio Grande do Sul	Fora de UC
14	SC	Todo litoral do estado de Santa Catarina	Fora de UC
15	SP	Todo litoral do estado de São Paulo	Fora de UC
16	SE	Todo litoral do estado de Sergipe	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Megaptera novaeangliae
2	Observação e gravação de imagem ou som	Megaptera novaeangliae

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Mamíferos Aquáticos: cetáceos, sirênios e pinípedes)	Fragmento de tecido/órgão, Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sêmen, Sangue
2	Método de captura/coleta (Mamíferos Aquáticos: cetáceos, sirênios e pinípedes)	Outros métodos de captura/coleta (Biópsia: fragmentos de gordura)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	laboratório de pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 84514583

Página 2/3

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
* INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
E DOS RECURSOS NATURAIS
RENOVÁVEIS - IBAMA
SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70818-900 - Brasília-DF

CONVENÇÃO SOBRE O
COMÉRCIO INTERNACIONAL
DE ESPÉCIES DA FLORA
E FAUNA SELVAGEM
EM PERIGO DE EXTINÇÃO

CONVENTION ON
INTERNATIONAL TRADE
IN ENDANGERED SPECIES
OF WILD FAUNA
AND FLORA

1) Pag. Nº 1/1

2) Data Emissão/Issuing Date: 22/01/2013

3) Válido Até/Valid Until: 22/07/2013

4) Licença nº/Permit nº: 13BR009860/DF	6) Selo nº/Stamp nº: 521512 	8) Controle/Check #: 5C6S6LLZ95U9PX3S
5) Licença de/Permit for Importação	9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority 	Assinatura/Signature

10) Importador/Importer DANIELA MAGALHAES DRUMMOND DE MELLO Rua Padre José Giomini, 91 apt 16 SAO PAULO - 05362090 fone: 01196041122 - danielamello@usp.br Brasil - BR	11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) Jorge Acevedo Ramírez 21 de Mayo, 1690 Punta Arenas - 737 fone: - Chile - CL	12) País Importador/Country of Import Brasil - BR	13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Chile - CL
---	---	--	---

14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction
S - Scientific/Fins científicos...

15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations	
--	--

16) Dados do Transporte/Transportation Data

Local/Place: ALF/Al São Paulo
Data Provável/Probable Date: 01/02/2013

ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/
THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.

17) Item		18) Produto/Product		19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name	21) Anexo/Origem Appendix/Source	22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date	24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
17) I 20) 1. Megaptera novaeangliae Baleia-jubarte Bunch	21) I W	18) ANIMAL MORTO - PARTE/BODY - PIECE 22) tecido/tissue 6,45 G -	19) 23) - - 24) - -	-- 6,45 G --

Fim dos Itens/Items End

25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement

Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.
------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------

ASSINATURA/SIGNATURE

1 Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: cites.sede@ibama.gov.br

1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil

2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country

3ª Via - Aduana / Customs

4ª Via - IBAMA

CONVENCIÓN SOBRE EL COMERCIO INTERNACIONAL DE ESPECIES AMENAZADAS DE FAUNA Y FLORA SILVESTRES		PERMISO No. 13CL000003WS ☒ EXPORTACIÓN ☐ REEXPORTACIÓN ☐ IMPORTACIÓN ☐ OTRO:		ORIGINAL 2. Válido hasta el 21 de octubre de 2013.											
3. Importador (nombre y dirección): DANIELA MAGALHAES DRUMMOND DE MELLO Rua Padre José Sao Pablo Brasil		4. Exportador/reexportador (nombre, dirección y país): JORGE ACEVEDO RAMIREZ Centro de Estudios del Cuaternario Fuego-Patagonia y Antártica 21 de mayo 1690 Punta Arenas Chile.													
3a. País de importación: Brasil		Firma del solicitante _____													
5. Condiciones especiales: Res. N° 2757 Subsecretaría de Pesca <small>Para animales vivos: este permiso o certificado es válido sólo si las condiciones de transporte se ajustan a las Directivas CITES para el transporte o, en caso de transporte aéreo, a la Reglamentación para el Transporte de Animales Vivos de la IATA.</small>		6. Nombre, dirección, sello/timbre nacional y país de la Autoridad Administrativa <div style="text-align: center;"> SERVICIO NACIONAL DE PESCA Victoria 2832, Valparaíso CHILE </div>													
5a. Propósito de la transacción: S <small>(véase al dorso)</small>		5b. Estampilla de seguridad No. 0525002													
7.B. Nombre científico (género y especie) y nombre común del animal o planta		9. Descripción de los especímenes:		10. Apéndice y origen (véase al dorso)											
7.B. Megaptera novaeangliae		9. Tejidos de grasa.		10. Apéndice I - W											
11a. Total exportador/Cupo		11. No. de especímenes (incluso la unidad de medida)													
11a. 19 muestras de tejido de grasa, 6,45 grs. en total.		11. Muestras de Tejidos de grasa preservados.													
12. País de origen * Permiso No. Fecha XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX		12a. País de la última reexportación Certificado No. Fecha XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX		12b. No. del establecimiento ** o fecha de adquisición *** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX											
7.B. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		9. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		10. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX											
12. País de origen * Permiso No. Fecha XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX		12a. País de la última reexportación Certificado No. Fecha XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX		12b. No. del establecimiento ** o fecha de adquisición *** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX											
7.B. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		9. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		10. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX											
12. País de origen * Permiso No. Fecha XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX		12a. País de la última reexportación Certificado No. Fecha XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX		12b. No. del establecimiento ** o fecha de adquisición *** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX											
7.B. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		9. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		10. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX											
12. País de origen * Permiso No. Fecha XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX		12a. País de la última reexportación Certificado No. Fecha XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX		12b. No. de la operación ** o fecha de adquisición *** XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX											
* País en el que los especímenes fueron recolectados en la naturaleza, criados en cautividad o reproducidos artificialmente (sólo en caso de reexportación) ** Solamente para los especímenes de especies incluidas en el Apéndice I criados en cautividad o reproducidos artificialmente con fines comerciales *** Para los especímenes preconvenidos															
13. Permiso/certificado expedido por: <div style="text-align: center;"> JUAN LUIS ANSOLEAGA BENGOCHEA DIRECTOR NACIONAL DE PESCA </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div> Valparaíso Lugar </div> <div> 22 de abril de 2013 Fecha </div> </div>															
14. Aprobación de la exportación:		15. Conocimiento de embarque/carta de porte aéreo No.:													
<table border="1"> <tr> <th>Sección</th> <th>Cantidad</th> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> </tr> <tr> <td>B</td> <td></td> </tr> <tr> <td>C</td> <td></td> </tr> <tr> <td>D</td> <td></td> </tr> </table>		Sección	Cantidad	A		B		C		D		<div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div> Puerto de exportación _____ </div> <div> Fecha _____ </div> <div> Firma _____ </div> <div> Sello oficial y título _____ </div> </div>			
Sección	Cantidad														
A															
B															
C															
D															

PERMISO CITES No. 13CL000003WS

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MELLO, Daniela Magalhães Drummond de
Título: Uso de gordura subcutânea como matriz biológica na dosagem de esteroides sexuais em baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

A pesquisa com baleias envolve a mobilização de muitas pessoas para que as coisas funcionem. A logística não é algo simples, tampouco as condições ambientais – muito sol, muito frio, muito balanço, muito trabalho, muito cansaço, muita concentração e muita baleia! Não me esquecerei dos inúmeros momentos em que colegas, parceiros, estagiários, voluntários, funcionários e amigos não mediram esforços para que os dados fossem colhidos da melhor maneira possível, **MUITO OBRIGADA PESSOAL!!!**

Gostaria de agradecer aos meus pais pelo apoio desde sempre, por me darem condições e coragem para estudar o que gosto. Agradeço em especial à minha mãe, minha inspiração e grande incentivadora.

Agradeço muitíssimo ao meu orientador e amigo Prof Cláudio Alvarenga de Oliveira por ter aceitado esse desafio de trabalhar com baleias. Agradeço a confiança em mim depositada e seu apoio sempre presente. Você foi um grande incentivador!

Agradeço à Priscila Viau por me ensinar a técnica de Enzimaimunoensio empregada neste estudo

Agradeço imensamente à FAPESP pela bolsa de estudo e também pelo financiamento do projeto. Agradeço a agilidade e profissionalismo da Fundação. Os recursos disponibilizados pela FAPESP foram cruciais à execução deste estudo.

Agradeço ao Instituto Baleia (IBJ) Jubarte pelo apoio logístico nas colheitas de campo e na base de Caravelas. Agradeço especialmente Milton Marcondes por "comprar" a ideia desde o início e por sua amizade.

Agradeço muitíssimo a Adriana Colosio, veterinária do IBJ pelas colheitas de campo e pela amizade, valeu paraguaia!

Agradeço a todos os funcionários do IBJ, especialmente aos motoristas Sr. Vavá e espigão por dirigir horas e horas atrás de carcaça de baleia.

Agradeço aos mestres e marinheiros presentes nas saídas de campo em Abrolhos, em especial Lecréu e Todynho.

Agradeço à colega de profissão e parceira na maior parte das colheitas em Abrolhos Kátia Groch

Agradeço muitíssimo às estagiárias do IBJ em 2011: Juliana Molás, Paula Coutinho, Bruna Buzzato e em especial à Geovanna Campos; aos estagiários de 2012: Arielle Bezerra, Isis Vuolo, Vinicius Melo e em especial Waltyane Bonfim; e aos estagiários de 2013: Yasmin Viana, Júlia Pierry e em especial à Cintia Brito e Fábio Mendes.

Agradeço a Jorge Acevedo e equipe da Fundación CEQUA pela parceria de pesquisa, e pelo apoio nas colheitas feitas na Patagônia chilena.

Agradeço a Nicholas Kellar por abrir as portas do laboratório do Southwest Fisheries Science Center em San Diego para que eu pudesse fazer treinamento laboratorial. Agradeço também a Marisa Trego por me ensinar as técnicas de extração e dosagem de hormônios da camada de gordura de cetáceos.

Agradeço às secretárias do VRA Harumi, Thaís, e Roberta por toda ajuda nestes quatro anos de doutorado.

Agradeço à Natacha Orteney pela ajuda nas extrações das amostras

Agradeço aos estagiários, funcionários, e ex-funcionários que trabalham com foto-identificação no Instituto Baleia Jubarte.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia não só pela disponibilidade de espaço físico, mas pelas muitas oportunidades de aperfeiçoamento.

Finalmente agradeço à Universidade de São Paulo pelas atividades curriculares e extracurriculares

RESUMO

MELLO, D. M. D. de. **Uso de gordura subcutânea como matriz biológica na dosagem de esteroides sexuais em baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*)**. [Use of blubber as matrix to measure sexual steroid levels of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*)]. 2015. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O presente estudo avaliou a possibilidade de extração e dosagem de esteroides sexuais em amostras de gordura de carcaças e biópsias de baleia jubarte. A progesterona (P4), testosterona (T) e estradiol (E2) puderam ser dosados em todas as amostras pela técnica de enzimaímmunoensaio. Amostras de carcaças foram utilizadas para validação da colheita. Uma série de experimentos foi realizada a fim de se avaliar: se o estado de decomposição da amostra altera os níveis hormonais; se os níveis de hormônios são diferentes em diferentes locais amostrados; se a profundidade de colheita (camadas externa, média e interna) altera os níveis hormonais; e finalmente o efeito do tamanho da amostra sobre as dosagens de hormônio. Todos estes elementos podem influenciar de maneira significativa a dosagem final. Também foram realizadas colheitas por meio de biópsias em 2011 e 2012 em área de reprodução no Atlântico Sul – o Parque Nacional Marinho de Abrolhos e seu entorno; e em área de alimentação em 2011 e 2012 no Pacífico Sul – o Parque Marino Francisco Coloane e seu entorno - localizado na Patagônia chilena. Como esperado, fêmeas apresentaram médias mais elevadas de P4 e E2 que machos, e machos apresentaram médias mais elevadas de T que fêmeas. Também foi observada sazonalidade reprodutiva com níveis mais elevados T em machos adultos em área de reprodução, especialmente nos meses de setembro e outubro. Os níveis de E2 em áreas de alimentação foram mais elevados que em área de reprodução tanto em machos quanto em fêmeas. Esta aparente inversão dos níveis de E2 com relação ao estado reprodutivo deve-se provavelmente ao tempo de metabolização deste hormônio na gordura. Algumas fêmeas adultas acompanhadas e desacompanhadas de filhotes apresentaram nível de P4 compatível com níveis de prenhez em outras espécies de cetáceos. Alguns dos animais biopsados tiveram seu comprimento corporal estimado através de fotogrametria. A menor fêmea acompanhada de filhote mediu 10.21 metros. Machos e fêmeas não apresentaram comprimentos corporais diferentes entre si, 12.96 e 12.04 metros, respectivamente. O tecido adiposo mostrou-se como uma matriz viável para dosagens de esteroides sexuais e estudos acerca da fisiologia reprodutiva de baleias de vida livre. A dosagem de hormônio da camada de gordura tem o potencial de indicar variações sazonais, estados de prenhez, picos de testosterona em machos, e diferenças entre machos e fêmeas. Quando combinada com

comprimento corporal e história de vida, a dosagem hormonal pode promover informações ainda mais robustas acerca do estado reprodutivo dos indivíduos de determinada população.

Palavras-chave: Progesterona. Testosterona. Estradiol. *Megaptera novaeangliae*. Esteroides sexuais.

ABSTRACT

MELLO, D. M. D. de. **Use of blubber as matrix to measure sexual steroid levels of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*)**. [Uso de gordura subcutânea como matriz biológica na dosagem de esteroides sexuais em baleias jubarte (*Megaptera novaeangliae*)]. 2015. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The current study evaluated the possibility of extracting and measuring steroid hormones from the blubber of carcasses and living animals. Progesterone (P4), testosterone (T) and estradiol (E2) were successfully measured through enzyme immunoassay technique. Stranded animals were sampled to validate the blubber collection. A set of experiments were performed: whether the state of decomposition of fat affects hormone levels; whether the body region from which samples were collected affects the levels of P4, E2, and T; whether the depth of the layer selected (outer, middle, inner) affects hormone levels; and finally the size of sample effect on hormone levels. All of these four elements can potentially alter the measurement final results. Also, biopsy sampling were done at a South Atlantic breeding Area, National Marine Park Abrolhos in 2011 and 2012; and in one feeding area, the Marine Park Francisco Coloane, located at Chilean Patagonia. As expected females had higher P4 and E2 means compared to males, and males exhibited higher means of T than females. Also a reproductive seasonality was detected in E2 and T levels. T levels were higher in adult males during breeding season, especially in September and October. E2 were higher in both females and males during feeding season. This apparent inversion of E2 level to the reproductive condition is probably a result of the lag of the hormone from blood to blubber and the time for its metabolism to occur. Part of the adult females with calves and without calves had P4 levels similar to some pregnant cetacean species. Some of the biopsied animals had their body length estimated. The smallest female with calf had 10.21 meters. Males and females did not differ in total body length: 12.96 and 12.04 respectively. The blubber showed to be a feasible biological matrix to measure sex hormones from free ranging humpback whales, and can indicate differences among sexes and reproductive states. When combined with total body length and life history, the hormone measurements can provide robust information on reproductive state of individuals.

Keywords: Progesterone. Testosterone. Estradiol. *Megaptera novaeangliae*. Sex steroids.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	A BALEIA JUBARTE	22
2.2	FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE BALEIAS JUBARTE	26
2.3	DOSAGENS HORMONAIS DA CAMADA DE GORDURA DE CETÁCEOS	29
2.4	ESTIMATIVA DO COMPRIMENTO CORPORAL	31
2.5	FOTOPERIODISMO	32
3	VIABILIDADE DO USO DE GORDURA SUBCUTÂNEA DE BALEIA JUBARTE NA DOSAGEM DE ESTEROIDES SEXUAIS.....	35
3.1	INTRODUÇÃO	35
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.2.1	Animais	38
3.2.2	Efeito decomposição	39
3.2.3	Efeito local do corpo	41
3.2.4	Efeito profundidade da amostra	42
3.2.5	Efeito tamanho da amostra	43
3.2.6	Extração hormonal	44
3.2.7	Análise hormonal	45
3.2.8	Unidades utilizadas	46
3.2.9	Paralelismo, controles e eficiência da extração	46
3.2.10	Análise dos resultados	48
3.3	RESULTADOS	48
3.3.1	Paralelismo, controles e eficiência da extração	48
3.3.2	Efeito decomposição	49
3.3.3	Locais do corpo	51
3.3.4	Camadas	51
3.3.4.1	Amostra de animal em decomposição	51
3.3.4.2	Amostras de animais frescos	55
3.3.5	Tamanho	55
3.3.5.1	Correção das dosagens de acordo com o peso da amostra	64
3.4	DISCUSSÃO	64
3.5	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS.....	68
4	DOSAGEM DE ESTEROIDES SEXUAIS DA CAMADA DE GORDURA DE BALEIAS JUBARTE EM ÁREA DE REPRODUÇÃO E ALIMENTAÇÃO.....	73
4.1	INTRODUÇÃO	73
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	75
4.2.1	Áreas de Estudo	75
4.2.2	Colheita de amostras	77
4.2.3	Extração hormonal	79
4.2.4	Análise hormonal	80

4.2.5	Unidades utilizadas.....	81
4.2.6	Correção do peso das amostras	81
4.2.7	Paralelismo, controles e eficiência da extração.....	58
4.2.8	Estimativa do comprimento corporal	58
4.2.9	História de vida	84
4.2.10	Fotoperiodismo	84
4.2.11	Análise dos resultados	85
4.3	RESULTADOS	85
4.3.1	Paralelismo, controles e eficiência da extração.....	85
4.3.2	Correção do peso das amostras	86
4.3.3	Progesterona.....	88
4.3.3.1	Área de Reprodução	88
4.3.3.2	Área de Alimentação	90
4.3.3.3	Área de Reprodução x Área de Alimentação	92
4.3.4	Testosterona	94
4.3.4.1	Área de Reprodução	69
4.3.4.2	Área de Alimentação	96
4.3.4.3	Área de Reprodução x Área de Alimentação	97
4.3.5	Estradiol	99
4.3.5.1	Área de Reprodução	99
4.3.5.2	Área de Alimentação	101
4.3.5.3	Área de Reprodução x Área de Alimentação	101
4.3.6	Comprimento corporal de baleias biopsadas.....	103
4.3.7	Identificação individual e história de vida	108
4.3.8	Fotoperiodismo	110
4.4	DISCUSSÃO	111
	REFERÊNCIAS.....	124
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121
	REFERENCIAS.....	124
	APÊNDICE	130

1 INTRODUÇÃO

Informações acerca da endocrinologia reprodutiva são de fundamental importância para se compreender como mamíferos marinhos são capazes de enfrentar ambientes, muitas vezes hostis, e como funciona sua capacidade de adaptação a estes ambientes como, p. ex. estações reprodutivas e de nascimento sincronizadas. Além disso, parâmetros reprodutivos são cruciais para entender a dinâmica de uma dada população e determinar taxas de prenhez e intervalo entre partos (AGLER et al., 1993; CLAPHAM; MAYO, 1987).

A atividade de órgãos endócrinos específicos, medida pelos níveis hormonais nos fluídos corporais e excreções, podem subsidiar informações acerca do estado interno de um indivíduo (ST AUBIN, 2001). Existe uma grande dificuldade, entretanto, em se obter amostras que reflitam de forma acurada o estado reprodutivo de cetáceos de vida livre. Ainda que o sangue seja o tecido mais comumente utilizado para análises hormonais, outras técnicas menos invasivas têm sido desenvolvidas para extração de hormônios de fezes, urina, saliva e leite de mamíferos marinhos (WEST et al., 2000; ROLLAND et al., 2005; TROUT, 2008; MURACO et al., 2010). Uma revisão mais aprofundada sobre o tema encontra-se no apêndice A deste trabalho. Apesar da grande utilidade e aplicabilidade destas técnicas, seria praticamente inviável a colheita de tais amostras em baleias selvagens. Não obstante, medidas corporais alométricas feitas a partir de fotografias aéreas têm proporcionado uma diferenciação clara entre baleias cinzentas (*Eschrichtius robustus*) gestantes e não gestantes Perryman e Lynn (2002). Entretanto, esta técnica só é realmente efetiva a partir do terço médio ou final da gestação, quando a proporção da circunferência para o comprimento corporal é muito maior nas fêmeas gestantes do que nas não gestantes. Uma alternativa para superar estas dificuldades seria a dosagem de hormônios acumulados na camada de gordura por meio da colheita de amostras de animais vivos por biópsia. É sabido que os hormônios esteroides têm uma afinidade com o tecido adiposo e tendem a se acumular na camada de gordura do animal (DOLEZEL et al., 1991). Os esteroides lipofílicos acumulam-se em grandes concentrações no tecido adiposo porque podem passivamente difundir dos capilares a este meio mais lipidinoso (DESLYPERE et al., 1985) onde os processos metabólicos e fisiológicos que os quebram ou removem são relativamente mais lentos do que aqueles que ocorrem no sangue.

A colheita de amostras por biópsias é uma técnica prática e barata que pode ser usada na maioria das espécies de cetáceos em seu ambiente natural (MANSOUR et al., 2002). Este tipo de amostra normalmente possui um fragmento de pele e gordura, e tem sido utilizado para análises genéticas (PALSBØLL et al., 1997; KRÜTZEN; BARRÉ 2002) pesquisas de contaminantes (HOBBS, 2003), inferências de níveis tróficos da dieta (HERMAN et al., 2005) e estudos de anatomia e histologia (REEB; BEST; KIDSON, 2007). Estudos anteriores comprovaram que estas amostras são viáveis para extração e dosagem de esteroides sexuais da camada de gordura de baleias e golfinhos (PÉREZ et al., 2011; KELLAR et al., 2013; TREGO et al., 2013).

Técnicas de extração e dosagens de esteroides sexuais da camada de gordura podem ser utilizadas e adaptadas ao estudo de diversas espécies de cetáceos (KELLAR et al., 2013; TREGO et al., 2013) e podem auxiliar no monitoramento da taxa reprodutiva de uma dada população. A técnica permite a comparação dos níveis hormonais entre diferentes classes etárias (adultos, juvenis e filhotes) e sexos; além de permitir a comparação de animais em diferentes *status* reprodutivos (p. ex. áreas de reprodução e alimentação, ou sazonalidade reprodutiva de uma população dentro de uma mesma área).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A BALEIA JUBARTE

A baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) pertence ao grupo das baleias de barbatanas (ordem Cetartiodactyla, subordem Mysticeti) (PRICE et al., 2005). É considerada a baleia mais “acrobática” de todas as espécies (CLAPHAM, 2009). Uma série de características morfológicas, tal como o comprimento das nadadeiras peitorais e largura da nadadeira caudal proporcionalmente grande em relação ao seu comprimento corporal, permite uma série de manobras hidrodinâmicas e saltos (WOODWARD et al., 2006). Sua coloração é negra no dorso e varia entre branca, mosqueado e preta no ventre.

Assim como a maioria das espécies de misticetos, a baleia jubarte migra sazonalmente entre áreas de alimentação localizadas em latitudes elevadas, e baixas latitudes para reprodução e cria em ambos os hemisférios (CRAIG; HERMAN, 2000; CRAIG et al., 2003). Uma exceção a este padrão de migração é a população do mar da Arábia que permanece em águas tropicais durante todo o ano (MIKHALEV, 1997). No hemisfério sul, a espécie possui sete sítios reprodutivos distintos, entre os quais o banco dos Abrolhos, no sul da Bahia é considerado a principal área de reprodução em todo o Atlântico Sul Ocidental (MARTINS et al., 2013).

Durante o século XX, cerca de 200.000 baleias jubarte foram caçadas na região da Antártica, levando a uma drástica diminuição das populações do hemisfério sul (ROCHA et al., 2014; IWC, 1994). A região representa um importante sítio de alimentação para as baleias entre o fim da primavera e início de outono (WINN; REICHLEY, 1985) onde ocorre pouca ou nenhuma atividade reprodutiva (CHITTLEBOROUGH, 1955; DAWBIN, 1966).

A migração da baleia jubarte é a mais longa dentre todos os mamíferos (RASMUSSEN et al., 2007). Indivíduos podem deslocar-se por até 10.000 quilômetros a cada ano entre as áreas de reprodução e alimentação (BAKER et al., 1990; RASMUSSEN et al., 2007). Sabe-se que a migração das baleias jubarte é segregada (BROWN et al., 1995; STEVICK et al., 2003). A caça comercial de baleias na Oceania gerou informações precisas sobre a segregação durante a migração naquela região. Fêmeas amamentando são as primeiras a deixarem as áreas de alimentação no final do verão - início do outono, seguidas por animais imaturos, machos adultos, fêmeas adultas e por último as fêmeas grávidas. Na primavera

ocorre o inverso, as fêmeas recém-grávidas são as primeiras a deixar as aéreas reprodutivas (DAWBIN, 1966). Já no Atlântico norte, foi observado que os machos são os primeiros a chegar às áreas de reprodução (STEVICK et al., 2003)

Os mamíferos marinhos refinaram as funções endócrinas básicas para atender à demanda imposta pelo meio ambiente (ATKINSON et al., 2009). Os fatores ecológicos por trás da dinâmica da migração ainda não foram totalmente esclarecidos, sabe-se que se os benefícios são maiores que os custos, a espécie tende a migrar (STERN, 2002).

2.2 REPRODUÇÃO EM MAMÍFEROS MARINHOS

As estruturas fundamentais e processos associados à reprodução são comuns dentre os mamíferos marinhos. O trato reprodutivo de baleias possui ovários, ovidutos, útero e abertura vaginal à vulva. O útero é bicornuado, e o feto se desenvolve em um dos cornos. Os ovários são igualmente funcionais nas baleias, ao contrário do que ocorre nos odontocetos, onde há maior frequência de atividade no ovário esquerdo, especialmente nos primeiros anos de vida. (BOYD; LOCKYER; MARSH, 1999). Nos machos são observados testículos, vasos deferentes, epidídimo e um pênis, que normalmente se encontra retraído na cavidade abdominal (BOYD; LOCKYER; MARSH, 1999).

Os ovários dos mamíferos desempenham funções exócrinas (liberação de óvulos) e endócrinas (esteroidogênese) (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Já os testículos são primariamente responsáveis pela produção de gametas (espermatozoides) e hormônios esteroides. O ciclo ovário das fêmeas compreende as fases de maturação folicular, ovulação, luteinização e involução do corpo lúteo (MIES FILHO, 1982). Tanto os ciclos ovarianos quanto atividades testiculares estão diretamente relacionadas a uma complexa interação entre hormônios e sistema nervoso central (SNC). Os hormônios têm a função básica de inibir, estimular ou regular a atividade funcional de seus órgãos ou tecidos alvo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A reprodução de mamíferos é regulada por uma série de mecanismos neurológicos e “feedbacks” hormonais que envolvem a ação do hipotálamo, hipófise e gônadas – também conhecida como eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (ROBECK et al., 2001) (Figura1). Determinadas circunstâncias, como por exemplo, variação do fotoperíodo, estimulam a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. Os receptores de

GnRH na hipófise anterior promovem a liberação dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) para circulação. O aumento da concentração de FSH no sangue resulta em recrutamento e crescimento folicular nos ovários, bem como no aumento do número de receptores de LH no folículo pré-ovulatório (folículo de Graaf). Concomitantemente ao crescimento folicular, ocorre aumento do estrogênio circulante, que é resultado de sua produção nas células da teca interna e camada granulosa do folículo em crescimento. Inicialmente, este aumento de estrogênio inibe a liberação LH e FSH pela hipófise. À medida que o folículo aproxima-se do período pré-ovulatório, o aumento de estrogênio circulante (também conhecida como onda pré-ovulatoria de estrogênio) exerce um estímulo positivo na frequência e amplitude da secreção de GnRH pelo hipotálamo. Esse aumento, por sua vez, resulta em uma onda pré-ovulatoria de LH. O LH no folículo estimula a produção do hormônio proteico inibina. A inibina não só inibe a produção de FSH, como aumenta a sensibilidade das células da teca ao LH. Esta combinação resulta em uma resposta adequada à onda de LH e consequente ovulação (ROBECK et al. 2001).

Após a ovulação, as células da teca e da granulosa convertem-se em células secretoras de progesterona - células luteínicas pequenas e grandes, respectivamente. As células luteínicas organizam-se para formar o corpo lúteo (CL). A progesterona liberada pelo CL inibe a secreção de LH e FSH através da diminuição da frequência de GnRH pelo hipotálamo. Em caso de ciclo infértil, o útero secreta prostanglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) que resultará em regressão do CL (ROBECK et al., 2001). Em caso de prenhez, o CL deverá manter-se até o final da gestação. Em cetáceos, o CL é principal produtor de progesterona durante a prenhez (MANSOUR et al., 2002).

Figura 1 - Esquema ilustrativo do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em mamíferos

Fonte: Kong et al. (2014)

Os hormônios reprodutivos podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas em: proteicos – hormônios polipeptídeos; esteroides - derivados principalmente do colesterol; ácidos graxos – derivados do ácido araquidônico; e aminas – derivados da tirosina ou triptofano. Os hormônios esteroides gonadais são produzidos primariamente nos ovários e nos testículos. Outros órgãos, como placenta e glândulas adrenais, também podem secretar hormônios esteroides em menor quantidade. Os ovários produzem dois esteroides: progesterona e estradiol, enquanto os testículos secretam testosterona (HAFEZ; ROSNINA, 2004).

A progesterona tem como principais funções atuar sinergicamente com estrógenos na promoção do comportamento de cio e preparação do trato reprodutivo para implantação e manutenção da prenhez. Já o estrógeno estimula o desenvolvimento das características sexuais secundárias, estimula o crescimento dos ductos galactóforos e desenvolvimento das glândulas mamárias, e possui efeitos anabólicos. A testosterona desenvolve e mantém as glândulas sexuais acessórias, estimula o desenvolvimento das características sexuais secundárias, estimula o comportamento sexual e a espermatogênese, e possui efeitos anabólicos (HAFEZ; ROSNINA, 2004).

2.3 FISILOGIA REPRODUTIVA DE BALEIAS JUBARTE

Apesar de a fisiologia reprodutiva apresentar parâmetros variados entre as diversas espécies de mamíferos, os hormônios envolvidos e suas funções gerais tendem a se conservar dentro a classe *mammalia* (ROBECK et al., 2001). Muito pouco se sabe a respeito da fisiologia de grandes cetáceos em função da impossibilidade de se manter estes animais em cativeiro. Informações acerca de parâmetros reprodutivos de mysticetos normalmente são oriundas de animais encalhados ou abatidos pela pesca comercial.

Basicamente, toda informação disponível sobre a biologia reprodutiva de baleias jubarte advém de dados coletados durante a caça comercial de baleia jubarte no hemisfério sul. Chittleborough (1955) utilizou-se de material biológico de baleias jubarte abatidas na década de cinquenta na Austrália para determinação do alcance da maturidade sexual nos machos. Cento e um animais foram classificados como sexualmente imaturos, púberes ou sexualmente maduros de acordo com exames histológicos: 1 – imaturos: todos os túbulos seminíferos sem luz ou com alguma abertura e sem espermatozócitos em divisão, 2 – púberes: maioria dos túbulos com luz e presença de alguns espermatozócitos, 3- maduros: todos os túbulos com luz e vários estágios da espermatogênese observados. Neste mesmo estudo, os animais foram classificados como fisicamente maduros ou imaturos de acordo com o grau de fusão das epífises vertebrais. O comprimento corporal total e maturidade sexual foram correlacionados exibindo uma grande variação entre os animais púberes. O peso dos testículos na puberdade das baleias da costa oeste da Austrália é bem próximo de 2000g. Não obstante, foram observados espermatozoides apenas no fluído seminal de baleias com testículos com peso igual ou superior a 2000 g, com exceção de um indivíduo. Utilizando-se este peso como valor médio do alcance da puberdade em 609 indivíduos, verificou-se que aos 11,3 metros de comprimento 50% das baleias macho são imaturas e outros 50% são púberes ou sexualmente maduras. Já a maturidade física e comprimento corporal total quando correlacionados apresentaram grande sobreposição, com vários animais sem fusão das epífises com maior comprimento que animais classificados como fisicamente maduros. Normalmente, a puberdade é atingida ao final do segundo ano de vida em machos.

Foi também demonstrado neste estudo, que dentre indivíduos sexualmente maduros, ocorreu uma diferença significativa entre o peso dos testículos, diâmetro dos túbulos seminíferos e número de espermatozoides dentro dos túbulos entre as épocas de reprodução

na costa australiana e áreas de alimentação na Antártica, sugerindo uma sazonalidade na atividade sexual da espécie. Tanto o peso testicular como seu comprimento relativo ao comprimento corporal total mostrou-se menor na Antártica. A quantidade de espermatozoides nos testículos de outras espécies de baleias, como a azul (*Balaenoptera musculus*) e a fin (*Balaenoptera physalus*) também previamente foram descritas, observando-se sazonalidade reprodutiva, Mackintosh e Wheeler¹ (1929 apud CHITTLEBOROUGH, 1955, p. 26). Dentro da época de reprodução de baleias jubarte, cortes histológicos dos testículos apresentaram maior quantidade de espermatozoides no final de julho e agosto, do que junho (início da temporada reprodutiva) e setembro e outubro (final da temporada reprodutiva) Matthews² (1937 apud CHITTLEBOROUGH, 1955, p. 2) não encontrou espermatozoides nos testículos de quatro machos adultos entre os meses janeiro, fevereiro e março (temporada de alimentação).

A função ovariana de baleias jubarte fêmeas também foi analisada por Chittleborough (1954) na década de cinquenta. Observações relacionadas à morfologia gonadal, maturidade física e sexual, e ciclo reprodutivo foram realizadas em mais de 400 fêmeas de baleias jubarte na área de reprodução da costa oeste da Austrália. Um pequeno aumento do peso dos ovários ocorre conforme aumenta o comprimento corporal em baleias imaturas, entretanto este aumento ocorre até certo ponto do comprimento corporal e exibe grande variação individual. Dentre as fêmeas sexualmente maduras, também se observou grande variação do peso dos ovários em diferentes estágios reprodutivos (p ex. recém-paridas, ovulando, primeiro terço da gestação, último terço da gestação, lactante). Apesar da grande variação entre o peso dos ovários, dos tamanhos dos folículos de Graaf e tamanho dos corpos lúteos dentre as fêmeas desta população, notou-se um aspecto morfológico das gônadas similar à maioria dos mamíferos nos diferentes estágios da ovulação.

Chittleborough (1954) também observou que fêmeas no terço final da gestação possuem folículos de Graaf bastante reduzidos (média = 6 mm), quando comparados ao folículo de fêmeas em repouso (20 mm), fato este que poderia estar correlacionado com diferentes níveis de estrógenos na circulação sanguínea. Em 60 fêmeas amostradas por Chittleborough (1954) em final de lactação, 82% não possuíam folículo em maturação (10-28 mm), e 18% sim (35-50 mm), indicando que em uma pequena porcentagem das fêmeas da população não ocorre anestro, o estro ocorre já no final da lactação. Os maiores CL foram observados no final da

¹ Mackintosh, N. A.; Wheeler, J. F. G. Southern blue and fin whales. **Discovery Reports**, v. 1, p. 257-540, 1929

² Matthews, L. H. The humpback whale (*Megaptera nodosa*). **Discovery Reports**, v. 17, p. 7-92, 1937

temporada reprodutiva. Ocorre um aumento acentuado nos primeiros meses (junho e julho), com uma diminuição da velocidade de crescimento até o alcance do tamanho médio (305 g a 2185 g) que assim permanece até o final da prenhez. É importante ressaltar que durante este estudo, embriões não foram encontrados, provavelmente devido ao seu diminuto tamanho e o tempo abreviado para procura do mesmo, portanto não se sabe até que ponto esse CL permanece sem a presença do feto. Também foi observado que a reabsorção do CL ocorre rapidamente após o parto.

Das 290 fêmeas adultas amostradas ainda por Chittleborough (1954) (exceto as de final de gestação e início de lactação), 90% estavam com ovários em condição quiescente em junho (70% destas foram capturadas no começo de junho e estavam em final de lactação). No final de junho o número de baleias em lactação diminuiu, bem como houve aumento de ovários com folículos de Graaf em maturação. Em meados de julho houve o pico da proporção de fêmeas com folículos maduros, seguido de uma queda juntamente com aumento da proporção de ovários em ovulação, ou seja, a maior parte das fêmeas ovulou na segunda metade de julho. Aparentemente o CL é formado após a ovulação em fêmeas não prenhes; 80% das fêmeas fora do estágio de prenhez ou começo de lactação, possuíam pelo menos um CL de agosto a outubro. A presença de CL em fêmeas não prenhes durante o diestro pode elevar significativamente os níveis de progesterona em algumas espécies, p. ex. cães (ETTINGER, 1992). Em cetáceos, um aumento significativo da progesterona parece ocorrer apenas no momento da gestação como foi reportado para diversas espécies de golfinhos (KELLAR; TREGO, 2006; TREGO et al., 2013). Geralmente as fêmeas prenhes de cetáceos apresentam uma elevação do nível de P4 na ordem de dezena, e sem sobreposição entre os estados reprodutivos (MANSOUR et al., 2002; KELLAR et al., 2013).

Fazendo uma correlação entre comprimento corporal e atividade ovariana, Chittleborough (1955) observou que algumas fêmeas sexualmente imaturas eram maiores que fêmeas sexualmente maduras. O comprimento corporal de fêmeas prestes a ovular pela primeira vez (presença de um folículo de Graaf de 30 mm ou maior) variou de 10.82 a 12.71 metros. Algumas fêmeas atingiram a maturidade sexual entre 10.97 e 11.89 metros, enquanto outras não amadureceram até atingirem 12.19 ou até mais que 12.5 metros. Esta incongruência entre comprimento corporal total e primeira ovulação provavelmente se deve a uma variação individual do crescimento corpóreo, e sugere que algumas fêmeas estejam sexualmente maduras aos dois anos de idade enquanto outras aos três anos de idade.

A maior parte das baleias jubarte ovula apenas uma vez, poucos indivíduos duas vezes, e raros três vezes por estação. Chittleborough (1954) pôde fazer uma inferência, após a colheita deste material, que o ciclo reprodutivo normal da baleia jubarte é de dois anos. O período de gestação é de quase doze meses, com a maioria das concepções ocorrendo no começo de agosto e partos em meados de agosto do ano seguinte. Chittleborough (1958) não observou prevalência entre cornos uterinos direito e esquerdo, nem ovários direito e esquerdo na ocorrência de gestação e ovulação, respectivamente.

Microscopicamente, as placentas dos mamíferos são classificadas de acordo com o número de tecidos que separa o sangue fetal do sangue materno como: epiteliocorial, endocorial ou hemocorial (CARTER; ENDERS, 2005). A estrutura básica inclui do lado materno, os vasos sangüíneos, tecido conjuntivo e epitélio e, do lado fetal, o epitélio coriônico, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Baleias possuem placentação do tipo epiteliocorial (CARTER; ENDERS, 2005) onde todas as camadas de tecido estão presentes (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Além disso, a placenta de baleias é classificada como difusa pelo formato da área de junção materno-fetal (CARTER; ENDERS, 2005), onde as vilosidades estão distribuídas sobre a superfície do saco cório-alantoide (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.4 DOSAGENS HORMONAIS DA CAMADA DE GORDURA DE CETÁCEOS

A dosagem de esteroides sexuais de extratos de gordura de cetáceos é uma técnica relativamente nova quem vem sendo validada e aperfeiçoada em diversas espécies. O primeiro estudo foi feito em baleias minke com animais abatidos em caça comercial (MANSOUR et al., 2002). Foi notado que em baleias minke (*Balaenoptera acutorostrata*) prenhes, os níveis de progesterona eram aproximadamente 60 vezes mais elevados que animais não prenhes.

A prenhez também pode ser detectada em três espécies de golfinhos - *Lissodelphis borealis*, *Lagenorhynchus obliquidens* e *Delphinus delphis*, onde neste último, as fêmeas prenhes apresentaram aproximadamente 16 vezes mais progesterona do que fêmeas não prenhes, sem sobreposição de valores entre os dois estados fisiológicos (KELLAR; TREGO, 2006). A prenhez também pôde ser detectada em fêmeas de golfinhos nariz de garrafa

(*Tursiops truncatus*) do Estreito de Gibraltar e Estreito de Cadiz por Pérez et al por meio da dosagem de P4 presente na gordura. (2011). As fêmeas prenhes possuíam níveis de progesterona nove vezes mais altos que fêmeas não prenhes. Para confirmação da prenhez, foi feito um acompanhamento dos animais por meio de foto-identificação e subsequentes avistagens ao longo dos meses. Os animais com alta concentração de progesterona foram vistos novamente na companhia de filhote meses após a biópsia.

A sazonalidade reprodutiva em machos de *Delphinus delphis* da costa da Califórnia pôde ser determinada por meio de dosagens de testosterona em sua camada de gordura. Kellar et al. (2009) demonstraram que a concentração de testosterona foi maior durante o verão do que outras épocas do ano. As diferenças encontradas por Chittleborough (1965) entre as áreas de alimentação e reprodução sugerem forte sazonalidade na reprodução das baleias jubarte.

Nos últimos anos foram publicados cinco artigos relacionados ao tema. A validação para diagnóstico de prenhez foi feita por Trego et al. (2013) para quatro espécies de golfinhos - *D. capensis*, *Stenella attenuata*, *S. longirostris*, *Phocoenoides dalli*, que utilizou carcaças de animais encalhados ou, em sua maioria, capturados acidentalmente em redes de pesca na costa da Califórnia. Neste estudo, os níveis de P4 para fêmeas prenhes foi muito similar entre as espécies, e cerca de 164 vezes mais elevados em fêmeas prenhes que fêmeas não prenhes e animais imaturos.

Kellar et al. (2013) estudando a dinâmica da progesterona entre diferentes matrizes de baleias “bowhead” (*Balaena mysticetus*) puderam perceber que a elevação deste hormônio durante a prenhez ocorre primeiramente no sangue, seguida da urina e gordura. As amostras foram colhidas de animais provenientes da caça de subsistência no Alaska entre 1999 e 2009: 67 amostras de sangue, 28 amostras de urina e 70 amostras de gordura (42 machos e 28 fêmeas). Kellar et al. (2013) perceberam uma correlação significativa entre os níveis de P4 do soro e da gordura quando todos os animais, incluindo as fêmeas prenhes, foram incluídas na análise. Já quando esta análise é feita sem a inclusão das fêmeas prenhes, esta concordância não é mais observada. Segundo os autores, isso se deve ao fato de que as flutuações diárias de P4 são mais acentuadas no sangue do que na gordura. Na gordura subcutânea, que é um tecido periférico, a P4 leva algum tempo para ser incorporada ao tecido, entrando passivamente por difusão. Assim, as variações diárias são provavelmente atenuadas quando comparadas às variações sanguíneas. Entretanto, em casos de prenhez, a P4 está mais acentuadamente aumentada em ambos tecidos, e em magnitude de tempo que flutuações diárias, permitindo uma relação entre as duas matrizes. Neste mesmo estudo, também foi percebido que machos

adultos e fêmeas adultas não prenhes apresentaram níveis mais elevados de P4 que animais imaturos.

Atualmente, estudos envolvendo dosagens de esteroides sexuais permitiram não somente a distinção entre status reprodutivo de indivíduos da uma mesma população, mas sua correlação com a época do ano e preferência de hábitat. Analisando duas espécies de golfinhos simpátricas do Pacífico norte, Kellar et al. (2014) notaram que determinadas áreas possuem proporcionalmente um número mais elevado de fêmeas prenhes, ou seja, existe uma predileção destas fêmeas por determinadas áreas. Uma das hipóteses pela escolha destas áreas está relacionada à maior disponibilidade de alimento. Ambas as espécies apresentaram proporcionalmente mais fêmeas prenhes em regiões com condições oceanográficas propícias à presença de anchovas, sardinhas e pescada; espécies de peixes predadas por golfinhos-comuns. Os autores também notaram que existe uma sazonalidade reprodutiva apenas para uma das espécies (*D. delphis*).

Em outro estudo, o efeito de impactos antrópicos, como a pesca do atum, puderam ser relacionado à menor taxa de prenhez em *S. attenuata* (KELLAR et al., 2013). Associações entre golfinhos e atuns são frequentes em função de apresentarem a mesma dieta (HALL, 1998). Neste tipo de pesca, muito frequentemente os cardumes de atuns são localizados e cercados juntamente com grandes grupos e golfinhos que posteriormente são liberados; ou vêm a óbito por sufocamento ou traumatismo (ARCHER et al., 2001). Kellar et al. (2013) perceberam que a maior proporção de fêmeas prenhes em determinadas áreas estava intimamente ligada à menor atividade de pesca na região. O estresse sofrido por repedidas perseguições e aprisionamento dos golfinhos, pode ter resultado em menor sucesso reprodutivo da população em algumas áreas. Em ambos os estudos, inferências que vão além do estudo de dosagens hormonais puderam ser feitas.

2.5 ESTIMATIVA DO COMPRIMENTO CORPORAL

Quando combinada com a estimativa de comprimento total, a dosagem hormonal pode fornecer informações ainda mais precisas com relação ao estado reprodutivo do animal. O conhecimento do comprimento corporal de baleias é importante para a maioria dos estudos ecológicos, populacionais e de comportamento (JAQUET, 2006). Segundo Waters e

Whitehead (1990), medidas de comprimento total promovem informações acerca da estrutura do estoque e estimativa de parâmetros populacionais como taxas de prenhez e idade da maturidade sexual. Jaquet (2006) desenvolveu uma técnica de fotogrametria relativamente simples para estimativa de tamanho corporal em baleias cachalotes (*Physeter macrocephalus*) que utiliza a fotografia da nadadeira caudal enquanto simultaneamente, com uso de laser, mede a distância do animal em relação à embarcação. Esta prática permite, além da identificação individual do animal, a estimativa de seu comprimento total de forma eficaz. Além disso, a precisão da estimativa não é alterada pela variação de distância entre animal e embarcação; e o tempo de processamento é tão baixo que permite várias tomadas do mesmo indivíduo em determinada ocasião.

A técnica da fotogrametria apresenta-se como uma alternativa para determinação aproximada da faixa etária dos animais. Até o presente, não existe uma maneira eficaz de se determinar a idade de baleias, mesmo utilizando-se de carcaças. Estudos anteriores utilizaram a contagem de camadas do “plug” auditivo para determinação da idade em baleias jubarte (CHITTLEBOROUGH, 1959) e baleias sei (*Balaenoptera borealis*) (LOCKYER, 1974), entretanto a técnica ainda é considerada controversa por muitos pesquisadores em função da incerteza sobre o número de camadas que cresce anualmente no ouvido de baleias jubarte (LOCKYER, 1984). De toda maneira, a técnica não poderia ser utilizada em animais vivos.

Em estudos de foto-identificação, observou-se que idade média do alcance da maturidade sexual em fêmeas de jubarte do Golfo de Maine acontece aos cinco anos (CLAPHAM, 1992). Stevick (1999) reportou que o comprimento médio de baleias jubarte encalhadas na costa do Atlântico norte é em média menor que o reportado para animais abatidos durante a década de 50 na Austrália. Existe uma correlação positiva entre a largura da cauda e o comprimento corporal de baleias jubarte (SOUSA-LIMA; GROCH, 2010). É possível estimar o comprimento corporal de baleias jubarte por meio da largura da cauda; e por meio da determinação do comprimento corporal, pode-se estimar a classe etária de uma baleia fotografada.

2.6 FOTOPERIODISMO

Muitas espécies de mamíferos marinhos que habitam ambientes sujeitos a drásticas mudanças sazonais na temperatura do ar ou fases claras e escuras do dia, são submetidas

também a mudanças fisiológicas drásticas. Mysticetos alimentam-se em águas frias bastante produtivas durante os longos dias de verão, mas retornam ao hábitat tropical no outono para ter filhotes em condições mais favoráveis. O comprimento dos dias parece ser um dos sinais para abandonar uma área que estará coberta de gelo em breve (ST AUBIN, 2001).

A melatonina é o hormônio mais comumente associado ao fotoperiodismo em mamíferos. Ela é produzida pela glândula pineal, localizada acima do terceiro ventrículo do cérebro. A luz do dia inibe a produção de melatonina, que regula a atividade do hipotálamo, da glândula pituitária, e, indiretamente, as gônadas e glândula tireoide (ST AUBIN, 2001). Desta forma, o comprimento das fases claras e escuras do dia poderia influenciar indiretamente a quantidade de melatonina secretada, que influenciaria a quantidade de hormônios esteroides produzidos em baleias jubarte.

3 VIABILIDADE DO USO DE GORDURA SUBCUTÂNEA DE BALEIA JUBARTE NA DOSAGEM DE ESTEROIDES SEXUAIS

3.1 INTRODUÇÃO

A baleia jubarte é uma das espécies de cetáceos mais estudadas hoje em dia em todo o mundo, entretanto, poucos estudos abordaram a endocrinologia reprodutiva da espécie. A colheita de matrizes comumente utilizadas na dosagem de esteroides sexuais de pequenos cetáceos, como sangue (ROBECK et al., 2005, 2009), urina (STEINMAN et al., 2012) e fezes (BIANCANI et al., 2009; KUSUDA et al., 2011), torna-se logisticamente muito difícil em baleias de grande porte. Dosagens de metabólitos fecais de cortisol e progesterona (ROLLAND et al., 2005; HUNT et al., 2006;) já foram realizadas em baleias francas do norte (*Eubalaena glacialis*), porém a técnica restringe-se às áreas de alimentação e populações foto-identificadas bem conhecidas. A gordura subcutânea apresenta-se como uma potencial matriz e pode ser colhida tanto de animais vivos como de carcaças. Trabalhos recentes mostram a viabilidade desta matriz na dosagem de progesterona em carcaças de golfinhos (KELLAR; TREGO, 2006; TREGO et al., 2013) e carcaças de baleias (MANSOUR et al., 2002; KELLAR et al., 2013); e na dosagem de testosterona em carcaças e biópsias de golfinhos (KELLAR et al., 2009). Mais recentemente, a dosagem de cortisol em carcaças de baleias beluga (*Delphinapterus leucas*) também foi analisada (TRANA et al., 2015). Até o presente, nenhuma espécie de baleia verdadeira em ambiente natural teve seus níveis hormonais estudados em biópsias de tecido. Além disso, o estradiol, hormônio de fundamental importância no ciclo reprodutivo nas fêmeas de mamíferos, não foi ainda dosado da camada de gordura de nenhuma espécie de mamíferos aquático.

Todos os anos, dezenas de carcaças de baleia jubarte vão dar à praia no litoral brasileiro (GROCH et al., 2012; MOURA et al., 2013), e apresentam-se potencialmente como uma enorme fonte de informação acerca do estado reprodutivo das baleias. Entretanto, não se sabia até que ponto o estado de decomposição destas amostras poderia influenciar a acurácia da extração de lipídios e sua dosagem hormonal. Geraci e Lounsbury (1993) criaram códigos que classificam as carcaças de cetáceos de acordo com seu estado de decomposição que varia desde animais vivos - código 1, até carcaças mumificadas ou restos de ossos representadas pelo código 5.

A colheita de gordura em animais vivos é normalmente realizada remotamente por meio de biópsias (Figura 2) e o ponto em que o dardo acerta a baleia pode ser bastante variável. Normalmente, a região atingida abrange a porção latero-superior do corpo, desde a nadadeira dorsal até próximo ao pedúnculo (GAUTHIER; SEARS, 1999). O “blubber”, tecido adiposo característico dos mamíferos marinhos, difere-se do tecido adiposo de outras classes de mamíferos especialmente por ser rico em fibras de colágeno e tecido elástico. A quantidade de lipídio presente nos adipócitos do “blubber” pode variar entre as camadas externa, média e interna em diversas espécies de cetáceos (IVERSON, 2002), inclusive em baleias jubartes (WAUGH et al., 2014). Além disso, uma amostra de “blubber” com mesmo volume pode ter mais ou menos lipídio, pois variações entre a quantidade de lipídio presente na gordura também podem estar relacionadas ao estado nutricional ou reprodutivo de baleias (MILLER et al., 2011). Até o presente não foi testado até que ponto a quantidade de lipídio extraído pode influenciar na dosagem de hormônio extraído e dosado. Nesse caso, a utilização da unidade ng de hormônio dosado por mg de lipídio extraído (ng/mg) aparece como uma alternativa para anular os efeitos de variações entre camadas externa, média e interna (estratificação), estado nutricional ou de decomposição dos animais amostrados.

Figura 2 - Biópsia em baleia jubarte com uso de balestra, flecha e ponteira de aço inoxidável

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2011)

O tamanho médio de amostras colhidas na ponteira de aço inoxidável por biópsias é de 150 mg (Figura 3), entretanto, variações podem ocorrer em função de vários fatores: o ângulo,

velocidade e a distância em que o dardo atinge a baleia são algumas das variáveis que influenciam na quantidade de material colhido (NOREN; MOCKLIN, 2012). Além disso, uma única amostra pode ser seccionada e utilizada em diferentes abordagens investigativas, tais como pesquisa de contaminantes (WAUGH et al., 2014), dieta (BOROBIA et al., 2008) e ecologia trófica (BUDGE et al., 2006). Sabermos se o tamanho da amostra pode influenciar nos resultados finais é de grande importância para uma interpretação fisiológica correta. Além disso, é necessário saber qual o tamanho mínimo de amostra necessário para uma dosagem adequada.

Figura 3 A e B - (A) Flecha atingindo a porção esquerda de uma baleia adulta durante a colheita por biópsia; (B) amostra aderida à ponteira de aço inoxidável.

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2011)

Nesse contexto, buscou-se avaliar: a) se gordura de baleias jubarte oriunda de carcaças e de animais vivos é viável na dosagem de três esteroides sexuais: progesterona, estradiol e testosterona; b) se o estado de decomposição da carcaça afeta os níveis hormonais; c) se a gordura em diferentes locais do corpo possuem diferentes concentrações hormonais; d) se a camada de colheita de gordura (externa, média ou interna) afeta a dosagem hormonal; e) se o tamanho da amostra influencia o resultado final das dosagens; f) e se existe diferença nos resultados obtidos quando se utiliza duas unidades de massa diferentes: ng/ g de gordura e ng/ mg de lipídio extraído.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados quatro diferentes experimentos interligados entre si e que avaliaram se as seguintes condições podem alterar de maneira significativa as dosagens de progesterona (P4), estradiol (E2) e testosterona (T): experimento 1 - o estado de decomposição da amostra; experimento 2 – a região do corpo de colheita da amostra; experimento 3 – a camada de colheita da amostra (externa, média ou interna); e 4 – o tamanho da amostra. Além disso, avaliou-se o emprego da unidade de concentração hormonal utilizando-se como unidade de massa mg de lipídio.

3.2.1 Animais

No experimento 1 foram utilizadas amostras de gordura de um filhote macho com histórico de morte recente. Nos experimentos 2 e 3 foram colhidas amostras de dois filhotes machos, também recém mortos. Já no experimento 4, foram utilizadas tanto amostras de carcaças como de biópsias de animais vivos.

As carcaças dos animais dos experimentos 1, 2, 3 e 4 foram recuperadas no litoral brasileiro na região sul da Bahia e norte do Espírito Santo entre as coordenadas 16°09'S, 38°56'W e 19°51'S, 40°04'W nos meses de julho e setembro dos anos de 2011 e 2012. Já as oito biópsias do experimento 4 pertenciam a seis machos adultos, uma fêmea adulta e um juvenil macho, e foram realizadas em outubro de 2012 na Região do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (17°49'S, 38°49'W), sítio onde ocorre a maior concentração de baleias jubarte durante o período reprodutivo (ANDRIOLO et al., 2010). Todas as amostras permaneceram em freezer a -20° desde a colheita até o processo de extração.

Figura 4 – Locais de colheita de gordura subcutânea dos experimentos 1, 2, 3, e 4 na região sul da Bahia e norte do Espírito Santo, 2011 - 2013

Fonte: (Google Earth)

Legenda: 1- Efeito da decomposição: 1 filhote macho recém morto; 2 - Efeito do local do corpo: 2 filhotes machos recém mortos; 3 - Efeito da camada colhida: 2 filhotes machos recém mortos (mesmo animais dos experimentos 1 e 2); 4 - Efeito do tamanho: 5 carcaças e 7 biópsias.

3.2.2 Efeito da decomposição

O primeiro experimento teve como objetivo investigar até que ponto é possível colher e dosar amostras de uma baleia em que sua carcaça já iniciou o processo de decomposição. Para isso, simulamos uma carcaça de baleia sofrendo as intempéries ambientais durante seis dias, ao mesmo tempo em temperatura ambiente era registrada continuamente por um termômetro digital. Um fragmento de gordura (30 x 30 cm aprox.) foi colhido da região dorso-lateral esquerda de um filhote macho recém-morto encalhado em Prado BA no dia 30 de setembro de 2013 (Figura 5 A). Este fragmento foi acondicionado no interior de uma caixa plástica vazada, em posição invertida, de forma que estivesse em contato direto com a areia do solo (Figura 5 B). Sub-amostras foram colhidas deste fragmento ao longo de seis dias (dia zero ao dia 6) e suas características físicas como cor, odor e espessura registradas (Tabela 1).

Figura 5 A, B e C – (A) Fragmento de gordura colhido de um filhote macho recém morto encalhado em Prado BA (17° 20' S; 39° 13' W) - 2013; (B) acondicionamento do fragmento de gordura em caixa plástica invertida; (C) termômetro o qual permaneceu no interior da caixa durante experimento

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2013)

Tabela 1 – Alterações morfológicas macroscópicas sofridas pela gordura da região lateral superior esquerda de um filhote macho de baleia jubarte durante decomposição por seis dias.

Dia	Tempo após morte (hrs)	Espessura (cm)	Cor	Pele	Temp min-máx (°C)	Código*
0	2	3,2	amarelo claro	aderida	26.6	2
1	26	3,0	amarelo claro	aderida	19.8-31.8	2
2	50	2,6	amarelo	aderida	21.4-33.9	3
3	74	2,5	Amarelo escuro	aderida	22.8-36.2	3
4	98	2,5	Amarelo/laranja	aderida	23.8-35.1	3
5	122	1,8	laranja	descolada	23.4-35.1	4
6	146	1,8	Laranja/marrom	descolada	21.8-40.4	4

* Código de decomposição estabelecido por Geraci & Lounsbury ,1993.

Além da descrição do estado da amostra, sua classificação de acordo com os códigos estabelecidos por Geraci e Lounsbury (1993) encontra-se na tabela 1. O código 1 corresponde a animais encalhados vivos; código 2 - carcaça de animais recém mortos; código 3 - carcaça decomposta com órgãos intactos; código 4 – carcaça em avançado estado de decomposição com órgãos não distinguíveis; e código 5 – carcaça mumificada ou restos de ossos.

As cores descritas na tabela representam a camada mais superficial da amostra. Quando em corte mais interno (mais distante das bordas externas), a camada de gordura colhida ao longo de todos os dias possuía uma única coloração rosa claro (Figuras 6A, 6B e 6C). Não se notou macroscopicamente uma distinção/separação entre as camadas externa, média e interna.

Figura 6 A, B e C – (A) Sub amostra de gordura colhida do fragmento maior no dia 0; (B) Sub amostra de gordura colhida do fragmento maior no dia 2; (C) Sub amostra de gordura colhida do fragmento maior no dia 6.

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2014)

3.2.3 Efeito local do corpo

No segundo experimento, 48 amostras foram colhidas de oito diferentes regiões do dorso dos dois filhotes machos recém-mortos, de maneira a simular as colheitas feitas com uso da balestra em biópsias de animais vivos. Um dos animais encalhou em Barra do Riacho (município de Aracruz) ES no dia 08 de setembro de 2013. O outro filhote macho encalhou no município de Prado BA no dia 30 de setembro de 2013 (mesmo filhote utilizado no experimento 3.2.2 efeito da decomposição). A identificação de cada ponto de colheita foi feita por cores (Figuras 7 B e 8 B). Em cada um dos oito locais foi colhida uma amostra das camadas externa, média e interna. O objetivo foi verificar se existe diferença significativa na dosagem de P4, E2 e T entre os pontos coletados.

Figura 7 A e B – Carcaça de filhote macho encalhado no dia 08 de setembro em Barra do Riacho, ES (19° 49' S; 40° 3' W) - 2012

Fonte: (Instituto Baleia Jubarte, 2013)

Figura 8 A e B – Carcaça de filhote macho encalhado no dia 30 de setembro em Prado, BA ($17^{\circ} 20' S$; $39^{\circ} 13' W$) - 2012

Fonte: (Instituto Baleia Jubarte, 2013)

3.2.4 Efeito camada de gordura

Aqui, foram utilizadas amostras dos animais dos dois experimentos anteriores: efeito da decomposição (3.2.2) e efeito local do corpo (3.2.3), a fim de se verificar se ocorre uma variação dos níveis hormonais conforme a camada de gordura amostrada: externa, média ou interna. Os fragmentos de gordura foram seccionados transversalmente de forma que as camadas estivessem proporcionalmente espaçadas entre pele e músculo. Amostras da camada externa (próxima à pele); média; e interna (próxima à camada muscular) foram colhidas com peso aproximado de 150 mg (Figura 9). A profundidade da amostra colhida de cada camada foi proporcional à espessura total da camada de gordura.

Figura 9 - Secção das camadas externa, média e interna de amostra colhida da carcaça de um filhote macho recém morto em Prado, BA ($17^{\circ} 20' S$; $39^{\circ} 13' W$) - 2013

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2014)

Após a secção de amostras de cada camada em aproximadamente 150 mg, estas foram ainda seccionadas em fragmentos menores (aproximadamente 25 mg) para facilitar o processo de homogenização.

A comparação entre as camadas foi feita em dois passos distintos: no primeiro compararam-se as camadas externa, média e interna ao longo dos dias; e no segundo comparou-se as camadas externa, média e interna entre os oito diferentes locais do corpo.

3.2.5 Efeito tamanho da amostra

As carcaças dos cinco animais pertenciam a três filhotes machos, uma fêmea adulta e um macho adulto classificadas de acordo com código de decomposição segundo Geraci e Lounsbury (1993) em 2, 4, 4, 4, e 4.

As cinco amostras de carcaças e as sete amostras biopsias foram seccionadas em tamanhos progressivamente menores e agrupadas por classes de tamanho: 25-50 mg; 50-100 mg; 100-150 mg e 150-300 mg para carcaças; e 25-50 mg; 50-100 mg; 100-150 mg; 150-200 mg para biópsias. As amostras colhidas via biópsia possuíam aproximadamente 1 cm de pele e 3 cm de tecido adiposo (Figura 10 A), enquanto que as amostras de carcaças foram seccionadas de forma a simular este mesmo tamanho, ou seja, até 4 cm abaixo da pele (Figura 10 B). As amostras aqui utilizadas correspondem à parte mais externa na gordura, até 1,5 cm abaixo da pele (Figura 10 C). Depois de separadas em classes de tamanhos, todas as amostras foram seccionadas ainda congeladas em pequenos fragmentos de aproximadamente 25 mg para otimizar o processo de homogenização e consequente extração hormonal.

Figura 10 A, B e C – (A) Fragmento de gordura colhido via biópsia; (B) Fragmento de gordura colhido de carcaça com tamanho aproximado ao fragmento colhido via biópsia; (C) Colheita da camada externa de um fragmento de gordura colhido de carcaça

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2014)

A eleição da camada externa para este experimento decorre do fato de que amostras colhidas por biópsia estão contidas nesta camada. A espessura média da camada de gordura na região do dorso de uma baleia jubarte adulta é de aproximadamente 15 cm, e de uma baleia juvenil de 9 cm (ACKMAN et al., 1975). Caso ocorra diferença significativa entre as dosagens dos diferentes tamanhos, um fator de correção será proposto com o objetivo de adequar os valores à classe de tamanho 100 – 150 mg.

3.2.6 Extração hormonal

A extração hormonal foi baseada no método descrito por Kellar et al. (2006) com algumas modificações. As amostras foram homogeneizadas no aparelho Omni Bead Ruptor® por 10 vezes em velocidade de 5.5m/s, intervalos de 45 segundos em tubos contendo 1 ml de etanol e aproximadamente 1 g de 0.7 mm “Garnet Bulk Beads”® (contas de pedra granada). (Figura 11 A). Após a transferência desta solução para um novo tubo, já sem os “beads”, 2 ml de uma solução 4:1 etanol acetona foi adicionada ao tubo e levada ao aparelho vortex por 7 min a uma velocidade de 2200 rpm. A solução foi então levada à centrífuga (3 G durante 15 min) e o sobrenadante transferido a um novo tubo. A solução contida neste novo tubo foi levada ao fluxo de ar para secagem em banho-maria a 45°C. Nesta etapa do processo de extração, ocorre a separação dos lipídios do resto do tecido. Após secagem, pôde-se visualizar uma gota de lipídio no fundo do tubo (Figura 11 B). Uma importante modificação ao protocolo de Kellar et al. (2006) foi a pesagem desta quantidade de lipídio: pesou-se o tubo vazio antes do processo de extração, e posteriormente com a gota de lipídio. O peso do lipídio foi determinado pela diferença entre o tubo com lipídio pelo peso do tubo vazio. Após esta etapa, 2 ml de éter foi adicionado ao tubo e este levado ao aparelho vortex por 7min a uma velocidade de 2500 rpm. A solução foi centrifugada (3 G durante 15 min) e o sobrenadante transferido a um novo tubo. Após secagem do sobrenadante em fluxo de ar, o resíduo foi ressuspensionado em 1,5 ml de acetonitrila e levado ao aparelho vortex por 7 min a uma velocidade de 2500 rpm. Adicionou-se 1,5 ml de hexano ao tubo que foi novamente levado ao aparelho vortex por 7 min a uma velocidade de 2000 rpm, e posteriormente à centrífuga (3 G durante 15 min). A camada de acetonitrila foi aspirada para um novo tubo, e o processo de agitação no aparelho vortex e centrifugação foi repetido com mais 1,5 ml de hexano. A

porção final de acetonitrila foi transferida a um novo tubo e evaporada em fluxo de ar em banho-maria (45°C). O extrato final foi congelado a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

Figura 11 A e B - (A) “Garnet Bulk Beads”® (contas de pedra granada) utilizadas na homogenização das amostras de gordura; (B) Gota de lipídio pesada durante o processo de extração hormonal

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2013)

3.2.7 Análise hormonal

Os extratos das amostras foram suspensos uma hora antes do início das dosagens em 500 µl de tampão fosfato-salino (PBS) para a dosagem de testosterona. Após 30 min em aparelho vortex, 250 µl deste volume foram adicionados a mais 250 µl de PBS para a dosagem de estradiol e progesterona. Algumas amostras tiveram ainda que ser diluídas em 2000 µl de PBS para estar dentro do alcance de detecção da curva padrão do kit de progesterona.

A técnica de enzimaímunoensaio (EIE) foi empregada na dosagem dos três hormônios utilizando-se os kits comerciais da Enzo Life Sciences® os quais foram escolhidos/selecionados por apresentar o melhor desempenho dentre os kits comerciais testados em dosagens hormonais de gordura de golfinhos e baleias (KELLAR et al., 2013; TREGO et al., 2013). Os protocolos dos kits dos três hormônios foram seguidos sem modificações. As sensibilidades dos ensaios para progesterona, testosterona e estradiol foram 8.57 pg/ml, 2.6 pg/ml e 14.0 pg/ml, respectivamente; enquanto os limites das curvas de

controle/padrão estiveram entre 15.62 - 500 pg/ml para P4; 3.9 – 1000 pg/ml para testosterona e 15.6 - 1000 pg/ml para E2. Segundo o fabricante, as reações cruzadas do kit para progesterona são de 100% para progesterona e 5 α -Pregnane-3,20-diona, 3.46% para 17-OH- Progesterona e 1.43% para 5-Pregnen-3 β -ol-20-ona. As reações cruzadas do kit para testosterona são de 16.4% para Androstenedione, 7.6% para 19-Hydroxytestosterone e 2.7% para Dihydrotestosterone ; e do kit para E2 são de 17.8% para Estrona e 0.9% para Estriol. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 7.6 – 4.9 para P4; 2.3 – 4.1 para testosterona e 2.1 – 5.7 para E2. Já os coeficientes inter-ensaio foram de 2.7 – 6.8 para P4; 7.4– 10.2 para Testosterona e 8.3 – 14.2 para E2.

3.2.8 Unidades utilizadas

As análises foram feitas utilizando-se duas unidades de concentração de hormônio: a mais comumente utilizada, que é ng de hormônio por g de amostra – ng/g; e outra que leva em consideração a quantidade de hormônio em ng por miligrama de lipídio extraído - ng/mg.

3.2.9 Paralelismo, controles e eficiência da extração

Uma série de análises foi empregada para testar a qualidade e acurácia dos ensaios hormonais. Os pontos de controle da curva, bem como as amostras foram dosados em duplicata. Caso as amostras apresentassem resultados com coeficiente de variação (CV) > 30 %, seriam extraídas e dosadas novamente. Um “pool” de amostras com baixa concentração hormonal foi dosado ao final de todas as placas.

O teste de paralelismo foi realizado diluindo-se de forma progressiva dois “pools” de amostras na mesma proporção que a diluição dos pontos da curva padrão dos kits (fator 2 para P4 e E2; e fator 4 para T). O coeficiente de correlação de Pearson entre os pontos da curva e os “pools” diluídos foi testado para avaliar o paralelismo entre as duas medidas. Já a eficiência de extração, que testou a interferência da matriz sobre as dosagens hormonais, foi testada adicionando-se quantidades conhecidas de hormônios que foram obtidas por meio da

diluição dos padrões dos kits. Foi adicionado 0, 25 e 50 ng para P4; 0, 12.5 e 25 ng para T; e 12.5 e 25 ng para E2, imediatamente antes do processo de extração das amostras. Após a leitura das placas, a eficiência da extração foi determinada subtraindo-se as amostras com quantidades de hormônios conhecidas pelas amostras sem adição de hormônio, todas divididas pela quantidade inicial de hormônio adicionado.

3.2.10 Análise dos resultados

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados. A homocedasticidade das variâncias das amostragens foi verificada com o uso do teste de Levene. As análises que envolvem a comparação entre três ou mais médias foi feita por meio da análise de variância (ANOVA) one-way no caso de amostras homocedásticas, ou Kruskal-Wallis quando não homocedásticas, ambas seguidas por um teste post-roc de Tukey. A ANOVA de medidas repetidas foi utilizada em comparações de amostras ao longo dos dias. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado no teste de paralelismo. Todas as comparações estatísticas do presente estudo foram consideradas em um nível de significância de $p \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica versão 7.0 (StatSoft®, EUA). Algumas análises de dispersão e regressão simples foram analisadas com o programa Statistica versão 7.0 (StatSoft®, EUA) e demonstradas graficamente com o uso do programa Microsoft Excel®.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Paralelismo, controles e eficiência da extração

Os coeficientes de correlação do teste de paralelismo foram 0.98740 para P4, 0.9978 para T, e 0.9906 para E2, demonstrando paralelismo entre os pontos da curva e a diluição das amostras (Gráfico 1). A média da eficiência de extração foi de 76% para progesterona; 91% para testosterona e 61% para E2.

Gráfico 1 - Testes de paralelismo e correlação entre os pontos da curva padrão dos kits e pools de amostras diluídas para progesterona, testosterona e estradiol

3.3.2 Efeito da decomposição

Quando comparamos os níveis hormonais das amostras colhidas do filhote macho desde o dia 0 até o dia 6, não observamos diferença significativa: $F(6, 12) = 1.58$, $p = 0.24$ para P4, $F(6, 12) = 2.91$, $p = 0.05$ para T, e $F(6, 12) = 1.41$, $p = 0.29$ para E2. Interessante

observar no gráfico 2 (A) os que os valores P4 e E2 exibiram a tendência similar, enquanto os níveis de testosterona permanecem mais baixos (Gráfico 2B).

Gráfico 2 – Níveis de progesterona (A), testosterona (B) e estradiol (A) em ng/g de gordura de um filhote macho de baleia jubarte ao longo de seis dias

Quando a análise foi realizada na unidade de concentração ng/mg de lipídio extraído, também não houve diferença significativa entre as médias dos dias: $F(6, 12) = 0.37$, $p = 0.88$ para P4; $F(6, 12) = 2.04$, $p = 0.14$ para T; e $F(6, 12) = 0.82$, $p = 0.58$ para E2 (Gráfico 3). Ficou evidente que até seis dias após a morte, ou até o estado de decomposição código 4, amostras de gordura podem ainda ser colhidas em carcaças de filhotes de baleia jubarte sem apresentar uma diferença significativa entre as dosagens de P4, E2 e T.

Gráfico 3 – Níveis de progesterona (A), testosterona (B) e estradiol (A) em ng/mg de lipídio de um filhote macho de baleia jubarte ao longo de seis dias

3.3.3 Locais do corpo

A nadadeira dorsal dos dois filhotes machos apresentou nível mais elevado de testosterona que as demais localidades quando em ng/g ($F = 2.47$; $p = 0.04$). Quando a unidade considerada é ng/mg de lipídio extraído, a diferença permanece significativa (KW-H = 16.49; $p = 0.02$) (Figura 12). As dosagens de P4 e E2 não foram significativamente diferentes entre as regiões amostradas.

Figura 12 – Níveis hormonais de testosterona em oito diferentes locais do corpo de dois filhotes machos. Amostras das camadas externa, média e interna de cada ponto foram utilizadas. * média significativamente mais elevada que as demais localidades (Ilustração baseada em Kellar et al., 2006)

3.3.4 Camadas

3.3.4.1 Amostra de animal em decomposição

Quando comparamos as camadas externa, média e interna da gordura de um filhote ao longo dos dias 0 a 6, a camada externa apresentou níveis significativamente mais elevados de

P4 ng/g: $F(2,18) = 17.2547$, $p = 0.00007$ e E2 ng/g: $F(2,18) = 3.8816$, $p = 0.0397$. (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Concentrações médias de progesterona, testosterona e estradiol em ng/g de gordura das camadas externa, média e interna de um filhote macho de baleia jubarte ao longo de seis dias. As caixas representam a média $\pm$ o erro padrão da média (SE); e os whiskers a média $\pm$ o desvio padrão da média (SD). * Médias de P4 e E2 significativamente mais elevadas que as demais classes de tamanho

Quando levamos em conta a quantidade de hormônio por lipídio extraído, essa diferença deixa de ser significativa: P4 ng/mg lip: $F(2,18) = 2.9101$, $p = 0.0803$, T ng/mg lip: $F(2,18) = 2.6165$, $p = 0.1006$ e E2 ng/mg lip: $F(2,18) = 0.6407$, $p = 0.5385$ (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Concentrações de progesterona, testosterona e estradiol em ng/mg de lipídio extraído das camadas externa, média e interna de gordura de um filhote macho de baleia jubarte ao longo de seis dias. As caixas representam a média $\pm$ o erro padrão da média (SE); e os whiskers a média $\pm$ o desvio padrão da média (SD)

Observamos nos gráficos 6 A, B e C que a quantidade de lipídio extraída da camada mais externa aumentou progressivamente com o passar dos dias. Entretanto, esse aumento não foi acompanhado por um aumento de P4 ou E2 que mantiveram níveis mais significativamente mais elevados na camada externa desde o dia 0.

Gráfico 6 – Níveis de progesterona, testosterona, estradiol e quantidade de lipídio extraído das camadas externa (A), média (B) e interna (C) da gordura de um filhote macho ao longo de seis dias

3.3.4.2 Amostra de animais frescos

Já quando as camadas externa, média e interna de dois animais filhotes encalhados frescos foram comparadas, esta tendência não se fez presente para nenhum dos hormônios analisados, bem como em nenhuma das unidades utilizadas: P4 ng/g: $F(2,41) = 1.6994$, $p = 0.1954$, T ng/g: $F(2,33) = 2.8154$, $p = 0.0743$, E2 ng/g: $F(2,27) = 1.293$, $p = 0.2909$; e P4 ng/mg lip: $F(2,41) = 0.0574$, $p = 0.9443$, T ng/mg lip: $F(2,33) = 0.7819$, $p = 0.4658$, E2 ng/mg lip: $F(2,27) = 0.0644$, $p = 0.9377$.

3.3.5 Tamanho da amostra

Existiu uma tendência muito evidente de aumento da quantidade de hormônios à medida que o tamanho das amostras oriundas de carcaças diminui na dosagem de P4, E2 e T (Gráfico 7).

Gráfico 7 –

Dosagens de progesterona, estradiol e testosterona em amostras de carcaças de uma fêmea adulta, um macho adulto e dois filhotes machos de baleias jubarte separadas em quatro classes de tamanhos de amostras distintas. * Dosagem abaixo do limite de detecção da curva do kit

Pensando na hipótese de que o processo de homogenização pudesse ser mais eficiente em amostras menores, e, portanto mais hormônio extraído da amostra, uma correlação entre o peso da amostra e o peso do lipídio extraído foi feita em amostras provenientes de biópsias. O gráfico 8 demonstra uma relação direta e significativa entre o peso da amostra e o peso de lipídio extraído, ou seja, amostras menores têm menos lipídios extraídos e vice-versa.

Gráfico 8 – Aumento da quantidade de lipídio extraído em função do aumento do peso da amostra ($p = 0.0003$; $r = 0.67$; $r^2 = 0.45$)

Nota-se também, que assim como para as amostras de carcaças, se observou um aumento significativo da dosagem de hormônio conforme o tamanho da amostra de biópsia diminui (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Dosagens de progesterona (A), testosterona (B) e estradiol (C) em biópsias de uma fêmea adulta, 4 machos adultos e um juvenil macho (P4, E2); e uma fêmea adulta, 6 machos adultos e um juvenil macho (T) de baleias jubarte amostradas no PARNA dos Abrolhos em outubro de 2012, Brasil. Amostras seccionadas em 4 classes de tamanhos distintas

A

B

C

Apesar de o gráfico 9 (A) mostrar uma clara tendência das amostras de menor tamanho (25 – 50 mg) apresentarem os maiores valores de P4, uma diferença significativa não foi encontrada entre as classes de tamanho: P4 ng/g: $F(3,20) = 2.40$, $p = 0.09$. Já para E2 e T, a classe de tamanho 25 - 50 mg exibiu média significativamente mais alta que as demais: T ng/g: $F(3,20) = 4.02$, $p = 0.02$, e E2 ng/g: $F(3,20) = 26.07$, $p = 0.0000004$ (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Médias das dosagens de progesterona, testosterona e estradiol em ng/g de amostras de biópsias de uma fêmea adulta, 4 machos adultos e um juvenil macho (P4, E2); e uma fêmea adulta, 6 machos adultos e um juvenil macho (T) de baleias jubarte. As caixas representam a média $\pm$ o erro padrão da média (SE); e os whiskers a média $\pm$ o desvio padrão da média (SD). * Médias de T e E2 significativamente mais elevadas que as demais classes de tamanho

Quando analisadas em ng/mg de lipídio, as dosagens de P4, E2 e T não exibiram diferença entre as classes de tamanhos, ou seja, o efeito “tamanho da amostra” parece estar sendo anulado: P4 ng/mg lip: $F(3,20) = 1.85$, $p = 0.17$, T ng/mg lip: $F(3,20) = 0.47$, $p = 0.71$, E2 ng/mg lip: $F(3,20) = 1.79$, $p = 0.18$ (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Médias das dosagens de progesterona, testosterona e estradiol em ng/mg de lipídio extraído de amostras de biópsias de uma fêmea adulta, um juvenil macho e 4 machos adultos (P4 e E2), e uma fêmea adulta, um juvenil macho e 6 machos adultos (T). As caixas representam a média $\pm$ o erro padrão da média (SE); e os whiskers a média $\pm$ o desvio padrão da média (SD)

Existe uma relação de causalidade muito evidente entre o peso da amostra e a quantidade de lipídio extraída em amostras de biópsia. Observamos no gráfico 12 que a quantidade de lipídio extraído é proporcional ao peso da amostra, ou seja, a quantidade de lipídio extraída não afeta de maneira direta a dosagem.

Os gráficos de regressão entre classe de peso e dosagem de hormônio evidenciam que as linhas de tendência são diferentes para cada hormônio ($p = 0.02$ para P4; $p = 0.0003$ para T; e $p = 0.000003$ para E2), e que por esse motivo, os valores das dosagens devem se ajustar aos ensaios específicos, especialmente as amostras com peso abaixo de 25 mg. As linhas de regressão foram mais significativas para as amostras provenientes de biópsia quando o hormônio foi analisado em ng/g (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Regressão entre o peso das amostras e as dosagens de progesterona (A), testosterona (B) e estradiol (C) de biópsias de uma fêmea adulta, um juvenil macho e quatro machos adultos (P4 e E2); e de uma fêmea adulta, um juvenil macho e seis machos adultos (T)

3.3.5.1 Correção das dosagens hormonais de acordo com peso das amostras

Como ficou evidenciado no item 3.3.5, amostras com peso inferior a 50 mg apresentaram níveis de hormônio significativamente mais elevado que as outras classes de tamanho. Deste modo, sugere-se a correção destes níveis seguindo-se uma regra de três simples para elaboração de um fator de correção (FC), onde a classe de tamanho 100 – 150 mg é eleita como referência por ser a mais comumente colhida por biópsia. Os níveis hormonais da classe de tamanho 100 – 150 mg correspondem a 100%. Os níveis hormonais das outras classes de tamanho, especialmente da classe 25 -50 mg, devem ser multiplicados pelo FC conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1 – Fatores de correção dos níveis de P4, T e E2 de acordo com as classes de tamanho para amostras colhidas de baleias jubarte por meio de biópsia no PARNA de Abrolhos, 2011- 2012

Classe de tamanho	P4 (ng/g) (n = 6)	%	Fator de correção P4	T (ng/g) (n = 8)	%	Fator de correção T	E2 (ng/g) (n = 6)	%	Fator de correção E2
25 - 50	1.47	140	0.71	2.58	178	0.56	1.44	351	0.28
50 - 100	1.27	120	0.83	1.73	119	0.83	0.81	198	0.50
100 - 150	1.05	100	-	1.45	100	-	0.41	100	-
150 - 200	0.95	90	1.1	1.15	79	1.26	0.39	95	1.05

3.4 DISCUSSÃO

A determinação do status reprodutivo de cetáceos pode trazer informações valiosas acerca dos parâmetros reprodutivos de populações. O exame e colheita de gônadas de animais encalhados apresentam-se como uma forma eficiente de estudo da biologia reprodutiva, especialmente em pequenos cetáceos (URIAN et al., 1996; WESTGATE; READ, 2006). Entretanto, o tamanho do animal, o estado de decomposição e o local de encalhe nem sempre permitem a execução de uma necropsia completa para colheita ou observação desse material. A colheita de gordura para dosagem hormonal de carcaças pode ser uma boa alternativa para determinação do estágio reprodutivo de baleias com uma manobra de colheita relativamente simples.

O estradiol é um importante sinalizador da atividade ovárica e maturidade sexual em fêmeas de mamíferos (SENGER, 2003). Variações sazonais dos níveis de E2, como o aumento de sua concentração, já puderam ser correlacionados ao período de estro e implantação em soro de leões marinhos da Califórnia (*Zalophus californianus*). Oscilações sazonais de estrogênios urinários conjugados também já foram reportadas em belugas (ROBECK et al., 2010), e golfinhos-de-laterais-brancas-do-pacífico de cativeiro (*Lagenorhynchus obliquidens*) (ROBECK et al., 2009). O presente estudo dosou este hormônio em extratos de gordura de baleias jubarte por meio da técnica de EIE tanto em amostras de carcaças como em biópsias. Os resultados demonstraram a viabilidade de extração e dosagem deste hormônio em baleias jubarte, e sua potencial utilização como ferramenta no monitoramento endócrino na espécie.

Todos os anos centenas de carcaças de baleias vão dar à praia em diferentes estados de decomposição (WILEY et al., 1995; COLE; HARTLEY; MERRICK, 2005; MOORE et al., 2005) e a camada de gordura, quase sempre presente, é uma matriz com grande potencial de informações. Entretanto, até o presente, não é sabido até que estado de decomposição este material pode ser utilizado para diversas análises, dentre elas a dosagem de hormônios. Kellar et al. (2006) reportaram que até 52 horas em temperatura de 22°C, o estado de decomposição não afetou de maneira significativa a dosagem de progesterona em uma fêmea de *Lissodelphis borealis*. Já em baleias belugas, onde a gordura (“blubber”), nos mais variados estados de decomposição foi analisada, foi observado que o estado de decomposição compromete de

maneira negativa dosagens de cortisol (TRANA et al., 2015). Nosso estudo demonstrou que até 146 horas após a morte, entre temperaturas de 19.8 a 40.4°C, a gordura de carcaças de baleias jubarte pode ser utilizada na dosagem de P4, E2 e T. Recomenda-se que a amostra seja colhida das camadas média e interna; e que as camadas mais superficiais, com bordas mais escuras e/ou degradadas sejam descartadas, já que a camada externa de amostras degradadas apresentou níveis significativamente mais elevados de P4 e E2.

Assim como para outras espécies de golfinhos, a nadadeira dorsal da baleia jubarte apresentou níveis de testosterona de extratos da nadadeira dorsal diferentes do tecido adiposo do corpo. Ao contrário do que aconteceu em dosagens de testosterona de *Delphinus delphis*, que possuem concentrações menos elevadas na nadadeira dorsal (KELLAR et al., 2009), a nadadeira dorsal dos filhotes de jubarte apresentaram níveis mais elevados que o restante do corpo. As razões por trás disso envolvem talvez maiores quantidades de sangue e, portanto mais hormônio no tecido; ou uma influência do estágio de desenvolvimento, já que se trata de um filhote com os tecidos ainda em desenvolvimento; ou ainda uma influência direta da matriz sobre a dosagem. De todas as maneiras, a nadadeira dorsal é uma região que deve ser evitada para realização de biópsias em animais de vida livre para dosagem de esteroides sexuais.

A camada de gordura onde é feita a colheita pode influenciar o resultado final de uma dosagem. Esta tendência mostrou-se mais evidente quando a amostra está mais decomposta. Em animais frescos, os níveis de hormônios não diferiram significativamente entre as camadas externa, média e interna. Entretanto, a camada externa de animais em decomposição apresentou níveis mais elevados de P4 e E2, provavelmente devido a uma maior eficiência de extração dos hormônios desta camada ao longo dos dias. Possivelmente, o colágeno e as fibras elásticas do “blubber” em decomposição “liberem” mais facilmente os hormônios esteroides no momento de sua homogenização.

O tamanho da amostra influenciou de maneira significativa as dosagens hormonais quando expressas em ng/g. Ao contrário do que normalmente se esperaria, houve uma relação inversa entre o peso das amostras e a quantidade de hormônio dosada. Dada à multiplicidade de estudos em cetáceos que utilizam a gordura como matriz, como por exemplo, estudos de contaminantes (AGUILAR; BORRELL, 1991), dieta (HOOKER et al., 2001), e morfologia (MONTIE et al., 2007); e o volume limitado de amostra colhida em uma biópsia, muitas vezes a partição da amostra se faz necessária entre diversos grupos de pesquisa. Saber o tamanho mínimo da amostra, ou de que maneira esse tamanho pode influenciar os resultados,

é de fundamental importância para uma correta interpretação dos dados. No presente estudo, observamos que amostras com menor peso tendem a apresentar níveis de hormônio mais elevados, ocorrendo uma relação inversa entre peso da amostra e dose hormonal. Amostras com peso entre 25-50 mg apresentaram níveis hormonais consideravelmente mais elevados que as outras classes de tamanho. Nesse caso, recomendamos que seja feita uma correção dos valores por meio de uma regra de três simples para elaboração de um fator de correção (FC), onde a classe de tamanho 100 – 150 mg seja eleita como referência. Os níveis de hormônios das classes que apresentarem diferença significativa em relação à classe de referência (nesse caso 25 – 50 mg) devem ser multiplicados pelo FC correspondente (vide quadro 1) . Esta tendência desaparece quando a unidade de massa utilizada é ng por mg de lipídio extraído. Nesse caso, o fator “tamanho da amostra” está sendo anulado, e pode ser uma alternativa mais confiável na apresentação dos dados. Da mesma maneira, quando na comparação entre camadas a unidade utilizada é ng/mg de lipídio, o fator “efeito decomposição” é anulado e a quantidade de hormônio dosada restringe-se apenas à quantidade de lipídio extraído. Esta falta de diferença significativa quando se emprega a unidade ng/mg de lipídio também pode ser consequência de uma menor variação da unidade de massa lipídio em função do seu pequeno peso. A unidade ng/mg deve ser utilizada em casos específicos, quando não se pode controlar ou corrigir o tamanho da amostra ou em casos de amostras muito decompostas.

3.5 CONCLUSÕES

O local do corpo influencia na dosagem hormonal de T tanto em ng/g como em ng/mg de lipídio extraído, e a nadadeira dorsal deve ser evitada como local de colheita de amostra por apresentar níveis significativamente mais elevados. O estado de decomposição da carcaça até o sexto dia (144 horas) após a morte do animal em condições naturais, não afeta de maneira significativa a dosagem de progesterona, testosterona e estradiol.

As camadas podem apresentar concentrações de hormônios diferentes, especialmente em animais em decomposição. A camada externa apresentou valores significativamente maiores de P4 e E2 quando comparada às camadas média e interna, ao mesmo tempo em que, esta camada também apresentou quantidade de lipídio extraído mais elevado que as outras duas camadas. Entretanto, quando a comparação foi feita em animais frescos, esta diferença

não foi mais observada. Quando a dosagem é feita tendo como unidade de massa ng/mg de lipídio extraído, o efeito da variação entre as camadas e o efeito do tamanho é anulado, e não mais se observa diferença entre as camadas ou entre os tamanhos.

O tamanho da amostra alterou de maneira significativa as dosagens de testosterona e E2 quando em categoria de peso 25-50 mg. Ocorreu uma relação inversa da dosagem de hormônio sobre o peso da amostra e também sobre a quantidade de lipídio extraído. Quando a unidade ng/mg de lipídio extraído é utilizado essa diferença não é mais observada.

Sugere-se que para diminuir o efeito do tamanho e da origem (camadas externa, média ou interna) da matriz sobre as dosagens, utilize-se amostras do mesmo tamanho e colhidas da mesma camada. Alternativamente, a unidade de massa ng/mg de lipídio pode ser empregada para amenizar estes efeitos. Quando em utilização da unidade ng/g sugere-se uma correção dos valores para amostras de peso entre 25-50mg.

REFERÊNCIAS

- ACKMAN, R. G.; HINGLEY, J. H.; EATON, C.A.; SIPOS, J. C.; MITCHELL, E. D. Blubber fat deposition in mysticeti whales. **Canadian Journal of Zoology**, v. 53, n. 9, p. 1332–1339, 14 set. 1975.
- AGUILAR, A.; BORRELL, A. Heterogeneous distribution of organochlorine contaminants in the blubber of baleen whales: implications for sampling procedures. **Marine Environmental Research**, v. 31, n. 4, p. 275–286, jan. 1991.
- ANDRIOLO, A.; KINAS, P.; ENGEL, M.; ALBUQUERQUE, C. M.; RUFINO, A. Humpback whales within the Brazilian breeding ground: distribution and population size estimate. **Endangered Species Research**, v. 11, n. 3, p. 233–243, 2010.
- ARCHER, F.; GERRODETTE, T.; DIZON, A. Unobserved kill of nursing dolphin calves in a tuna purse-seine fishery. **Marine Mammal Science**, v. 17, n. July, p. 540–554, 2001.
- BIANCANI, B.; DA DALT, L.; LACAVE, G.; ROMAGNOLI, S.; GABAI, G. Measuring fecal progesterone as a tool to monitor reproductive activity in captive female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1282–92, dez. 2009.
- BOROBIA, M.; GEARING, P. J.; SIMARD, Y.; GEARING, J. N. Blubber fatty acids of finback and humpback whales from the Gulf of St. Lawrence. **Marine Biology**, v. 122, n. 3, p. 341–353, 2008.
- CARTER, A.; ENDERS, A. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 15, p. 1–15, 2004.
- BOYD, I.L.; LOCKYER, C.H.; MARSH, H. Reproduction in marine mammals. In: REYNOLDS, J.E.; ROMMEL, S.A. **Biology of Marine Mammals**. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, 1999. Cap. 6, p. 218–286.
- BUDGE, S. M.; IVERSON, S. J.; KOOPMAN, H. N. Studying Trophic Ecology in Marine Ecosystems Using Fatty Acids: a Primer on Analysis and Interpretation. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 4, p. 759–801, 29 out. 2006.
- COLE, T. V. N.; HARTLEY, D. L.; MERRICK, R. L. Mortality and Serious Injury Determinations for Large Whale Stocks along the Eastern Seaboard of the United States, 1999–2003. **Northeast Fisheries Science Center Ref. Doc. 05-08**. National Marine Fisheries Service, Woods Hole, MA, USA, July, 2005.
- GAUTHIER, J.; SEARS, R. Behavioral response of four species of baleenopteran whales to biopsy sampling. **Marine Mammal Science**, v. 15, n. 1, p. 85–101, jan. 1999.
- GROCH, K. R.; MARCONDES, M. C. C.; COLOSIO, A. C.; CATÃO-DIAS, J. L. Skeletal abnormalities in humpback whales *Megaptera novaeangliae* stranded in the Brazilian breeding ground. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, n. 2, p. 145–58, 8 nov. 2012.

HALL, M. A. An ecological view of the tuna-dolphin problem: impacts and trade-offs. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 8, p. 1-34, 1998.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, B.; HAFEZ E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 2004. cap. 2, p. 21-67.

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.

HOOKE, S. K.; IVERSON, S. J.; OSTROM, P.; SMITH, S. C. Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty-acid and stable-isotope analyses of biopsy samples. **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, n. 8, p. 1442–1454, 2001.

HUNT, K. E.; ROLLAND, R. M.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Analysis of fecal glucocorticoids in the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 260–72, 1 set. 2006.

IVERSON, S. J. Blubber. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN J. G. M. **Encyclopedia of marine mammals**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 107–112

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

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

KELLAR, N.; TREGO, M. Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2006.

KONG, L.; TANG, M.; ZHANG, T.; WANG, D.; HU, K.; LU, W.; WEI, C.; LIANG, G.; PU, Y. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 21253–69, 2014.

KUSUDA, S.; KAKIZOE, Y.; KANDA, K.; SENGOKU, T.; FUKUMOTO, Y.; ADACHI, I., WATANABE, Y.; DOI, O. Ovarian cycle approach by rectal temperature and fecal progesterone in a female killer whale, *Orcinus orca*. **Zoo Biology**, v. 30, n. 3, p. 285–295, 2011.

MANSOUR, A. A. H.; MKAY, D. W.; LIEN, J.; ORR, J. C.; BANOUB, J. H.; OIEN, N.; STENSON, G. Determination of Pregnancy Status From Blubber Samples in Minke Whales (*Balaenoptera Acutorostrata*). **Marine Mammal Science**, v. 18, n. 1, p. 112–120, jan. 2002.

MIES FILHO, A. Fisiologia do aparelho genital feminino. In: MIES FILHO. **Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial**. Porto Alegre: Editora Sulina S/A, 1987. cap. 4, p. 66-85.

- MIKHALEV, Y. A. Humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Arabian Sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 149, p. 13–21, 1997.
- MILLER, C.; REEB, D.; BEST, P. B.; KNOWLTON, A. R.; BROWN, M. W.; MOORE, M. J. Blubber thickness in right whales *Eubalaena glacialis* and *Eubalaena australis* related with reproduction, life history status and prey abundance. **Marine Ecology Progress Series**, v. 438, p. 267–283, 5 out. 2011.
- MONTIE, E. W.; GARVIN, S. R.; FAIR, P. A.; BOSSART, G. D.; MITCHUM, G. B.; MCFEE, W. E.; SPEAKMAN, T.; STARCZAK, V. R.; HAHN, M. E. Blubber Morphology in Wild Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeastern United States : Influence of Geographic Location, Age Class, and Reproductive State. **Journal of Morphology**, v. 269, n. 4, p. 496–511, 2007.
- MOORE, M. J. KNOWLTON, A. R.; KRAUS, S. D.; MCLELLAN, W. A.; BONDE, R. K. Morphometry , gross morphology and available histopathology in North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) mortalities. **Journal of Cetacean Research Management**, v. 6, n. 3, p. 1–16, 2005.
- MOURA, J. F. de; RODRIGUES, D. P.; ROGES, E. M.; SOUZA, R. L.; OTT, P. H.; TAVARES, M. L.; LEILA S.; TAVARES, D. C.; SICILIANO, S. Humpback whales washed ashore on the coast of rio de janeiro , southeastern Brazil : stranding patterns and microbial pathogens survey. **Biologia**, v. 68, n. 5, p. 992–999, 2013.
- NOREN, D. P.; MOCKLIN, J. A. Review of cetacean biopsy techniques: Factors contributing to successful sample collection and physiological and behavioral impacts. **Marine Mammal Science**, v. 28, n. 1, p. 154–199, 2012.
- PRICE, S. A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; GITTLEMAN, J. L. A complete phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (Cetartiodactyla). **Biological Reviews**, v. 80, n. 03, p. 445, 2005.
- ROBECK, T. R.; ATKINSON, S. C.; BROOK, F. Reproduction. In: DIERAUF, L.; GULLAND, F. M. D.: **CRC Handbook of marine mammal medicine**. Boca Raton: CRC Press, 2001. Cap 11, p. 193–236.
- ROBECK, T. R.; MONFORT, S. L.; CALLE, P. P.; DUNN, J. L.; JENSEN, E.; BOEHM, J. R.; YOUNG, S.; CLARK, S. T. Reproduction, Growth and Development in Captive Beluga (*Delphinapterus leucas*). **Zoo Biology**, v. 24, n. 1, p. 29–49, fev. 2005.
- ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; GREENWELL, M.; RAMIREZ, K.; VAN BONN, W.; YOSHIOKA, M. KATSUMATA, E.; DALTON, L.; OSBORN, S.; O'BRIEN, J. K. Seasonality, estrous cycle characterization, estrus synchronization, semen cryopreservation, and artificial insemination in the Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 138, n. 2, p. 391–405, ago. 2009.
- ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; MONTANO, G. A.; KATSUMATA, E.; OSBORN, S.; DALTON, L.; OSBORN, S.; O'BRIEN, J. K. Deep intra-uterine artificial inseminations using

cryopreserved spermatozoa in beluga (*Delphinapterus leucas*). **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 989–1001, 1 out. 2010. Elsevier Inc.

ROCHA, R.; CLAPHAM, P.; IVASHCHENKO, Y. Emptying the oceans: a summary of industrial whaling catches in the 20th century. **Marine Fisheries Review**, v. 76, n. 4, p. 37–48, 2014.

ROLLAND, R. M.; HUNT, K. E.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 308–17, jul. 2005.

STEINMAN, K. J.; O'BRIEN, J. K.; MONFORT, S. L.; ROBECK, T. R. Characterization of the estrous cycle in female beluga (*Delphinapterus leucas*) using urinary endocrine monitoring and transabdominal ultrasound: Evidence of facultative induced ovulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, n. 3, p. 389–97, 2012.

TRANA, M. R.; ROTH, J. D.; TOMY, G. T.; ANDERSON, W. G.; FERGUSON, S. H. 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, jan. 2015.

TREGO, M. L.; KELLAR, N. M.; DANIL, K. Validation of blubber progesterone concentrations for pregnancy determination in three dolphin species and a porpoise. **PloS One**, v. 8, n. 7, p. e69709, jan. 2013.

WAUGH, C. A.; NICHOLS, P. D.; SCHLABACH, M.; NOAD, M.; BENGTON NASH, S. Vertical distribution of lipids, fatty acids and organochlorine contaminants in the blubber of southern hemisphere humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). **Marine Environmental Research**, v. 94, p. 24–31, 2014.

WESTGATE, A. J.; READ, A. J. Reproduction in short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) from the western North Atlantic. **Marine Biology**, v. 150, n. 5, p. 1011–1024, 2006.

WILEY, D. N.; ASMUTIS, R. A.; PITCHFORD, T. D.; GANNON, D. P. Stranding and mortality of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, in the mid-Atlantic and southeast United States, 1985-1992. **Fishery Bulletin**, v. 93, n. 1, p. 196–205, 1995.

4 DOSAGEM DE ESTEROIDES SEXUAIS DA CAMADA DE GORDURA DE BALEIAS JUBARTE EM ÁREA DE REPRODUÇÃO E ALIMENTAÇÃO

4.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento de parâmetros reprodutivos de populações de cetáceos selvagens é importante para o desenvolvimento do manejo aplicado a conservação (KERLEY; GOODRICH, 2003). A dosagem hormonal é uma ferramenta, já bem estabelecida, na avaliação da atividade endócrina de animais selvagens (SCHWARZENBERGER; BROWN, 2013). Entretanto, o acesso a matrizes comumente utilizadas nestas nem sempre é possível em cetáceos de vida livre, especialmente em baleias.

Taxas de natalidade, sobrevivência e prenhez podem ser acessadas por meio de estudos de foto-identificação, técnica que funciona de maneira eficiente em populações pequenas estudadas ao longo dos anos (THAYER et al., 2003; ROLLAND et al., 2005). A colheita de gônadas de animais abatidos pela caça, capturados acidentalmente em redes de pesca (FERRERO; WALKER, 1994; NEUENHAGEN et al., 2007) ou encalhados (THAYER et al., 2003) também serviram como fonte de informação sobre maturidade sexual, taxas de prenhez e sazonalidade reprodutiva em diversos estudos. Embora de grande contribuição para o entendimento da dinâmica reprodutiva de populações, estes parâmetros só podem ser acessados em animais já excluídos da população.

Uma maneira eficiente de se acessar estados reprodutivos de cetáceos é por meio de da dosagem hormonal (ROBECK et al., 2001). A maior parte dos estudos realizados, até o presente, foi feita em animais de cativeiro utilizando o sangue e a urina como matrizes biológicas. A dosagem de esteroides sexuais em grandes espécies de cetáceos limita-se a matrizes menos convencionais pela impossibilidade de colheita de sangue e urina. P4 e T foram dosados do borribo de baleias jubarte na costa leste da Austrália (HOGG et al., 2009). Metabólitos fecais de progestinas, andrógenos e estrogênio foram determinados em extratos fecais de baleias Franca do norte (*Eubalaena glacialis*) (ROLLAND et al., 2005), colheita que se limita a áreas de alimentação. A dosagem de hormônio também já foi realizada em barbatanas (HUNT et al., 2014) e gordura, sangue e urina de baleia boreal (*Balaena mysticetus*) (KELLAR, et al., 2013) utilizando-se animais abatidos pela caça de subsistência no Ártico. Recentemente, o “plug” auditivo de baleias azuis (*Balaenoptera musculus*) foi

utilizado para dosagem de testosterona (TRUMBLE et al., 2013). Nos três últimos casos, a dosagem de hormônios limitou-se a animais já mortos. A determinação de esteroides sexuais acumulados na camada de gordura não foi dosada até o presente em nenhuma baleia filtradora de vida livre.

Nos estudos de parâmetros reprodutivos de uma população, além de dosagens hormonais, informações relacionadas ao sexo e idade dos animais, sazonalidade reprodutiva e história de vida são complementares entre si e fundamentais para uma correta interpretação dos dados. Até o presente não existe uma técnica eficaz para estimativa de idade em cetáceos de vida livre. Alguns estudos utilizaram o “plug” auditivo para determinação de idade em baleias jubarte (CHITTLEBOROUGH, 1959) e baleias sei (*Balaenoptera borealis*) (LOCKYER, 1974), entretanto a técnica é considerada controversa em função da incerteza sobre o número de camadas que cresce anualmente no ouvido destas espécies. A estimativa do comprimento corporal aparece como uma alternativa para determinação de classes etárias (adultos, juvenis e filhotes), já que existe uma relação direta entre o comprimento corporal e maturidade física e sexual em baleias jubarte (STEVICK, 1999; SOUSA-LIMA; GROCH, 2010). O comprimento corporal de baleias jubarte pode ser determinado por meio da estimativa da largura de sua nadadeira caudal (SOUSA-LIMA; GROCH, 2010). Por sua vez, a largura da nadadeira caudal pode ser estimada por uma técnica desenvolvida por Jaquet (2006) para determinação do comprimento corporal em baleias cachalote. Desta forma, é possível fazer uma inferência sobre a classe etária dos animais, e combinar estas informações com níveis hormonais de baleias de vida livre.

A baleia jubarte realiza migrações sazonais entre áreas de reprodução e alimentação (CLAPHAM, 1999) em ambos os hemisférios. Segundo a Comissão Internacional da Baleia (IWC), existem sete populações (A – G) no Hemisfério sul que deixam as áreas de alimentação em regiões polares e subpolares a partir do final do outono rumo às regiões tropicais para cria e reprodução (GALES et al., 2011). As causas proximais pelas quais as baleias migram não estão totalmente esclarecidas, mas o estopim do início da migração parece estar intimamente relacionado à duração das fases claras e escuras do dia (ST AUBIN, 2001).

Nesse contexto, o presente estudo se propõe a dosar progesterona, testosterona e estradiol de amostras de gordura obtidas por biópsias de baleias jubarte da população A em área de reprodução, e da população G em área de alimentação. Serão realizadas comparações entre classes etárias, sexo; bem como análises de correlação entre níveis hormonais e comprimento corporal e fotoperíodo. Além disso, a ocorrência de variação hormonal seguida

de uma sazonalidade reprodutiva será avaliada por meio da comparação dos níveis de hormônio entre amostras de área de reprodução e área de alimentação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Áreas de Estudo

As áreas de estudos compreendem a região de reprodução de baleias jubarte da população A e da região de alimentação da população G segundo a IWC (Figura 13).

Figura 13 – Rotas de migração entre áreas de reprodução e áreas de alimentação dos estoques A e G de baleias jubarte do hemisfério sul

Migration routes of the humpback whale
(Source: CAFFs Arctic Flora & Fauna - 2001)

Fonte: (CAFFs Arctic Flora and Fauna)

Costa Brasileira

A área de estudo no Brasil compreende a plataforma continental dos estados da Bahia e norte do Espírito Santo. A área costeira de maior amostragem está localizada próxima à cidade de Caravelas, especialmente o Parque Nacional Marinho (PARNA) dos Abrolhos e seu entorno ($17^{\circ} 49' S$, $38^{\circ} 49' W$) (Figura 14).

Figura 14 – Colheitas de gordura por biópsia no PARNA de Abrolhos e seu entorno - 2011

Fonte: (Google Earth)

Legenda: - machos; - fêmeas

Patagônia chilena

A área de estudo na Patagônia chilena compreende a região do Estreito de Magalhães, especialmente o Parque Marino Francisco Coloane e seu entorno ($53^{\circ} 50' S$, $71^{\circ} 48' W$) (Figura 15).

Figura 15 – Localização da Ilha Carlos III situada dentro do Parque Marinho Francisco Coloane na Patagônia chilena

Fonte: (Google Earth)

4.2.2 Colheita de amostras

Área de Reprodução

As colheitas de amostras de tecido gorduroso e registros fotográficos no Brasil foram feitas no durante a época de reprodução de baleias jubarte no Brasil (julho a novembro) na região dos Abrolhos, BA. Foram colhidas 187 amostras em 2011 e 2012: 122 machos e 65 fêmeas, sendo destes 178 adultos, 7 juvenis e 2 filhotes. Após o registro fotográfico, fez-se uma aproximação ao animal de forma que amostras de tecido pudessem ser coletadas com uso de uma balestra Barnett Wildcat®. Os dardos de aço inoxidável, possuem 8 mm de diâmetro por 50 mm de comprimento para uso em filhotes, e 8 mm de diâmetro por 60 mm de comprimento para uso em adultos. Para cada baleia amostrada foi registrada a data, localização (com uso de GPS), composição do grupo, número de animais e presença de filhotes, em planilha de avistagem padrão do IBJ. Os disparos foram feitos de embarcação de uma calha em 2011, e do tipo catamarã em 2012 em distâncias que variaram de 10 a 28 metros (Figura 16). Logo após a colheita, a amostra de aproximadamente 300 mg, era armazenada em freezer a -20°C até o momento da extração hormonal.

Os dados relativos ao sexo dos animais amostrados foram informados por pesquisadores associados ao Instituto que o determinaram por meio de sexagem molecular (PALSBØLL et al., 1992; CYPRIANO-SOUZA et al., 2010).

Figura 16 – Colheita de amostra por biópsia no PARNA de Abrolhos a partir de uma embarcação tipo catamarã - 2012

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2013)

Área de alimentação

As amostras colhidas na área de alimentação foram feitas com uso de um rifle Paxarms® e ponteiros de aço inoxidável acoplados a dardos específicos do equipamento de colheita entre fevereiro de maio de 2011. Já em 2012, as amostras foram colhidas com uso de flechas e balestra Barnett Wildcat® apenas no mês de maio. Os disparos foram realizados a partir de embarcações de apoio tipo bote inflável (Figura 17). As amostras permaneceram em freezer a -20°C até o momento da extração. Foram colhidas 21 amostras de gordura, sendo 9 fêmeas e 12 machos.

Figura 17 - Colheita de amostra por biópsia no Parque Francisco Coloane, Chile a partir de uma embarcação tipo bote inflável - 2012

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2013)

4.2.3 Extração hormonal

A extração hormonal foi baseada na metodologia descrita por Kellar e Trego (2006) com algumas modificações. As amostras foram homogeneizadas no aparelho Omni Bead Ruptor® por 10 vezes em velocidade de 5.5 m/s, intervalos de 45 segundos em 1 ml de etanol e aproximadamente 1 g de 0.7 mm Garnet Bulk Beads® (contas/grãos de pedra granada). Após a transferência desta solução para um novo tubo, já sem os “beads”, 2 ml de uma solução 4:1 etanol acetona foi adicionada ao tubo e levada ao aparelho vortex multi-tubo por 7 min a uma velocidade de 2200 rpm. A solução foi então levada à centrífuga por 15 min e o sobrenadante transferido a um novo tubo. Uma importante modificação ao protocolo de Kellar e Trego (2006) foi a pesagem de tubos vazios em que a solução anteriormente descrita foi transferida. Após secagem em fluxo de ar em banho-maria (45°C), estes tubos são novamente pesados, e a quantidade de lipídio extraída é calculada pela subtração da primeira pesagem pela segunda pesagem. Neste momento, pode-se notar uma gota de lipídio no fundo do tubo. Após esta etapa, 2 ml de éter foi adicionado ao tubo e este levado ao aparelho vortex por 7 min a uma velocidade de 2500 rpm. A solução foi centrifugada por 15 min e o sobrenadante transferido a um novo tubo. Após secagem do sobrenadante em fluxo de ar, o resíduo foi ressuscitado em 1,5 ml de acetonitrila e levado ao aparelho vortex por 7 min a uma velocidade de 2500 rpm. Adicionou-se 1,5 ml de hexano ao tubo que foi novamente

levado ao aparelho vortex por 7 min a uma velocidade de 2000 rpm, e depois centrífugado por 15 min. A camada de acetonitrila foi aspirada para um novo tubo, e o processo de agitação no vortex e centrifugação foi repetido com mais 1,5 ml de hexano. A porção final de acetonitrila foi transferida a um novo tubo e evaporada em fluxo de ar em banho-maria (45°C). O extrato final foi congelado a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

4.2.4 Análise hormonal

Os extratos das amostras foram suspensos uma hora antes do início das dosagens em 500 µl de tampão fosfato-salino (PBS) para a dosagem de testosterona. Após 30 min em aparelho vortex, 250 µl deste volume foram adicionados a mais 250 µl de PBS para a dosagem de estradiol e progesterona. Algumas amostras tiveram ainda que ser diluídas em 2000 µl, 4000 µl, 8000 µl, 16000 µl e 32000 µl de PBS para estar dentro do alcance de detecção da curva padrão do kit de progesterona.

A técnica de enzima-imunoensaio foi empregada na dosagem dos três hormônios utilizando-se os kits comerciais da Enzo Life Sciences® o qual foi escolhido por apresentar o melhor desempenho dentre os kits comerciais testados em dosagens hormonais de gordura de golfinhos e baleias (KELLAR et al., 2013; TREGO et al., 2013). Os protocolos dos kits dos três hormônios foram seguidos sem modificações. As sensibilidades dos ensaios para progesterona, testosterona e estradiol foram 8.57 pg/ml, 2.6 pg/ml e 14.0 pg/ml, respectivamente; enquanto os limites das curvas de controle/padrão estiveram entre 15.62 - 500 pg/ml para P4; 3.9 - 1000 pg/ml para testosterona e 15.6 - 1000 pg/ml para E2. Segundo o fabricante, as reações cruzadas do kit para progesterona são de 100% para progesterona e 5α-Pregnane-3,20-dione, 3.46% para 17-OH-Progesterona e 1.43% para 5-Pregnen-3β-o1-20-ona. As reações cruzadas do kit para testosterona são de 16.4% para Androstenedione, 7.6% para 19-Hydroxytestosterone e 2.7% para Dihydrotestosterone ; e do kit para E2 são de 17.8% para Estrona e 0.9% para Estriol. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 7.6 - 4.9 para P4; 2.3 - 4.1 para testosterona e 2.1 - 5.7 para E2. Já os coeficientes inter-ensaio foram de 2.7 - 6.8 para P4; 7.4 - 10.2 para Testosterona e 8.3 - 14.2 para E2.

Picos hormonais foram considerados como valores acima da média das dosagens de todos os animais mais dois desvios-padrão (BROWN et al., 1995). Não foi possível dosar os

três hormônios em todas as amostras, a dosagem foi feita de acordo com a disponibilidade da quantidade de amostra e da quantidade de kits comerciais no momento da análise.

4.2.5 Unidades utilizadas

As análises foram feitas utilizando-se de duas unidades de concentração de hormônio: a mais comumente utilizada, que é nanograma de hormônio por g de amostra – ng/g; e outra que leva em consideração a quantidade de hormônio em ng por miligrama de lipídio extraído - ng/mg.

4.2.6 Correção do peso das amostras

As amostras colhidas em área de reprodução com peso inferior a 100 mg tiveram seu peso corrigido de acordo com o fator de correção descrito no capítulo 1. O intervalo de peso 100 – 150 mg foi utilizado como referência. As correções dos pesos das amostras de área de reprodução seguiram o fator de correção (FC) estabelecido no capítulo 1 – “efeito do tamanho da amostra” em dosagens de amostras obtidas por biópsias.

Já para amostras provenientes da Patagônia chilena, elaborou-se um novo FC com a finalidade de ajustar as dosagens de hormônio a este grupo de amostras. A classe de tamanho 150 – 200 mg não foi incluída nesta análise por falta de amostra disponível. O método para elaboração do fator de correção foi o mesmo descrito no capítulo anterior.

4.2.7 Paralelismo, controles e eficiência da extração

Uma série de análises foi empregada para testar a qualidade e acurácia dos ensaios hormonais. Os pontos de controle da curva, bem como as amostras foram dosados em duplicata. Caso as amostras apresentassem resultados com $CV > 30 \%$, seriam extraídas e

dosadas novamente. Um “pool” de amostras com baixa concentração hormonal foi dosado ao final de todas as placas.

O teste de paralelismo foi realizado diluindo-se de forma progressiva dois “pools” de amostras na mesma proporção que a diluição dos pontos da curva padrão dos kits (fator 2 para P4 e E2; e fator 4 para T). O coeficiente de correlação de Pearson entre os pontos da curva e os “pools” diluídos foi empregado para avaliar o paralelismo entre as duas medidas. Já a eficiência de extração, que testou a interferência da matriz sobre as dosagens hormonais, foi testada adicionando-se quantidades conhecidas de hormônios que foram obtidas por meio da diluição dos padrões dos kits. Foi adicionado 0, 25 e 50 ng para P4; 0, 12.5 e 25 ng para T; e 0, 12.5 e 25 ng para E2, imediatamente antes do processo de extração das amostras. Após a leitura das placas, a eficiência da extração foi determinada subtraindo-se as amostras com quantidades de hormônios conhecidas pelas amostras sem adição de hormônio, todas divididas pela quantidade inicial de hormônio adicionado.

4.2.8 Estimativa do comprimento corporal

Calibração das câmeras e lentes

Para se estimar com precisão a distância entre a câmera e a nadadeira caudal da baleia, e a largura da nadadeira caudal, fez-se necessário a calibração da câmera e lentes. Isto foi feito através da técnica descrita por Jaquet (2006) com modificações. Fotografou-se um objeto de comprimento conhecido (4 metros de largura) a distâncias que variaram de 30 a 150 metros com distâncias focais que variaram de 70 a 400 mm (Figura 18). Quatro fotografias de cada distância (30 a 150 metros) foram feitas com duas velocidades do obturador da câmera (800 e 1250), totalizando oito fotos para cada situação (distância em metros + distância focal). O número total de imagens registradas foi de 1616. As fotos foram visualizadas no programa Adobe Photoshop® CS6 e por meio de do recurso de contagem, o número de pixels de uma extremidade a outra do objeto foi registrado. Estas informações foram utilizadas para calcular o número de pixels da imagem digital por centímetros do objeto de comprimento conhecido. Após isso, fez-se uma regressão entre o número de pixels e a largura do objeto conhecido para

cada distância focal (zoom) em diferentes distâncias ao objeto (30, 60, 90, 120 e 150 metros). Derivou-se então uma equação para calcular a largura da nadadeira caudal por meio de uma imagem feita de uma distância conhecida.

Figura 18 - * indicação do objeto de comprimento conhecido durante os registros fotográficos feitos com Nikon D40 a uma distância de 60 metros, e distâncias focal de 70 mm, 100 mm, 135 mm, 200 mm e 300 mm, respectivamente

Estimativa do comprimento corporal

A técnica de fotogrametria seguiu a metodologia criada por Jaquet (2006) para determinação do tamanho corporal de baleias cachalote (*Physeter macrocephalus*). A embarcação fez uma aproximação lenta por trás do animal a uma distância de 30 a 150 metros. A fotografia da nadadeira caudal foi feita com uso de quatros diferentes modelos de câmeras Nikon® (D70, D80, D90, D7000 e D300) e dois modelos de lentes Nikon AF-S VR 70-300® e 80 – 400 mm f/4.5-5.6 VR ED AF-D com foco ajustado em diversas distâncias focais desde 70 mm a 400 mm (Tabela 9). Simultaneamente ao registro fotográfico, a distância da câmera com relação à nadadeira caudal foi aferida utilizando-se binóculos com lasers acoplados (Nikon Forestry 550 Hypsometer Rangefinder®).

Depois de tomadas as distâncias das baleias com relação à embarcação, aplicou-se a fórmula resultante da regressão específica para cada modelo de câmera, lente e distância (Tabela 9). Desta forma foi possível o cálculo da largura da nadadeira caudal. Seguindo a metodologia descrita por SOUSA-LIMA e GROCH (2010), o comprimento corporal das baleias foi estimado a partir da largura da nadadeira caudal. Apenas as imagens consideradas adequadas, ou seja, dentro do foco e nadadeira caudal em posição perpendicular com relação ao fotógrafo foram consideradas nas análises do presente estudo.

4.2.9 História de vida

A pesquisa sobre a história de vida foi possível em animais biopsados e também foto-identificados por meio de do padrão de coloração da nadadeira caudal que pode variar de branca a totalmente preta. Os padrões são classificados de 1 a 5 de acordo com a proporção entre as cores (ROSENBAUM et al., 1995). Um animal é considerado capturado no momento em que é fotografado pela primeira vez e subsequentemente identificado. Eventuais avistagens posteriores deste mesmo animal são consideradas recapturas (SMITH et al., 1999).

A triagem foi feita utilizando-se o catálogo do Instituto Baleia Jubarte que hoje conta com mais de 5000 baleias identificadas individualmente. A pesquisa da correspondência entre as nadadeiras caudais foi feita por três pesquisadores de maneira independente a fim de se obter resultados sem viés. Os animais acompanhados de filhotes ou com pelo menos três anos de intervalo entre a captura e recaptura foram considerados adultos.

4.2.10 Fotoperiodismo

Dados relativos ao fotoperíodo nos locais de coleta, tanto em área de reprodução, quanto em área de alimentação, foram obtidos no site da marinha dos Estados Unidos – “US Navy Observatory/Astronomical Applications Department” (<http://aa.usno.navy.mil>). As coordenadas geográficas dos locais de colheita, bem como respectivos dados do Tempo Universal Coordenado (UTC) foram inseridos em campo apropriado do site para liberação da planilha. Os dados disponibilizados em formato de horário de nascer e por do sol, foram transformados em fase clara e fase escura do dia, utilizando hora como unidade. Feito isso, uma média da duração das fases foi feita em intervalos de quinze dias.

4.2.11 Análise dos resultados

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados, e o teste de Levene foi empregado para verificar a homocedasticidade das variâncias das amostragens. As análises entre duas médias foram feitas com a aplicação do teste t de Student quando as variâncias foram homocedásticas e Mann-Whitney quando não homocedásticas. As análises que envolvem a comparação entre três ou mais médias foi feita por meio da análise de variância one-way ANOVA no caso de variâncias homocedásticas, ou Kruskal-Wallis quando não homocedásticas, ambas seguidas por um teste post-hoc de Tukey. Análises de regressão linear simples foram empregadas para estabelecer as fórmulas de estimativa de comprimento corporal. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado nos testes de paralelismo e na avaliação de relação entre comprimento corporal e nível de hormônios. Todas as comparações estatísticas do presente estudo serão consideradas em um nível de significância de $P \leq 0.05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistica versão 7.0 (StatSoft®, EUA). Algumas análises de dispersão e regressão simples foram analisadas com o programa Statistica versão 7.0 (StatSoft®, EUA) e demonstradas graficamente com o uso do programa Microsoft Excel®.

Filhotes e juvenis foram agrupados como “imaturos” enquanto animais sexualmente maduros foram agrupados como “adultos” nas comparações entre animais sexualmente maduros e imaturos. A classificação de acordo com a classe etária (adulto, juvenil, e filhote) foi feita através da observação direta durante os trabalhos de campo.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Paralelismo, controles e eficiência da extração

Os coeficientes de correlação do teste de paralelismo foram 0.98740; 0.9978; e 0.9906 nas dosagens de P4, T e E2, respectivamente, demonstrando paralelismo entre os pontos da

curva e a diluição das amostras. A média da eficiência de extração foi de 76% para progesterona; 91% para testosterona e 82% para E2.

4.3.2 Correção do peso das amostras

As amostras obtidas de baleias jubarte em área de alimentação (população G) com intervalo de peso entre 25 – 50 mg tiveram uma correção dos níveis hormonais de acordo com os fatores de correção demonstrados no quadro 2. Os gráficos 13 A, B e C representam a relação de causalidade entre peso da amostra e dosagem de hormônio das amostras colhidas em área de alimentação na Patagônia chilena.

Quadro 2 – Fatores de correção dos níveis de P4, T e E2 de acordo com as classes de tamanho para amostras colhidas de baleias jubarte por meio de biópsia no Parque Francisco Coloane, Chile 2011- 2012

Classe de tamanho	P4 (ng/g) (n = 3)	%	Fator de correção P4	T (ng/g) (n = 3)	%	Fator de correção T	E2 (ng/g) (n = 3)	%	Fator de correção E2
25 - 50	7.50	194	0.51	5.96	402	0.25	3.75	194	0.51
50 - 100	3.78	97	1.02	3.15	212	0.47	1.89	98	1.02
100 - 150	3.87	100	-	1.48	100	-	1.93	100	-

Gráfico 13 –

Relação de causalidade entre peso da amostra e dosagem de progesterona (A), testosterona (B) e estradiol (C) em três amostras de baleias jubarte colhidas por biópsia em área de alimentação (população G segundo a IWC).

4.3.3 Progesterona

4.3.3.1 Área de Reprodução

A média dos níveis de progesterona da gordura de fêmeas em área de reprodução foi significativamente mais elevada que a média dos machos em ng/g e ng/mg de lipídio (df = 142; $p = 0.0000005$ e $p = 0.000006$, respectivamente) (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança dos níveis de progesterona em ng/g e ng/mg de lipídio da camada de gordura de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil 2011 – 2012

Adultos e animais sexualmente imaturos não diferiram entre si em ambas as unidades e em ambos os sexos: df = 53, $t = 0.99$, $p = 0.32$ para fêmeas em ng/g e df = 53, $t = 0.92$, $p = 0.35$ para fêmeas em ng/mg lip; e df = 87, $t = 0.16$, $p = 0.86$ para machos em ng/g e df = 87, $t = 0.35$, $p = 0.72$ para machos em ng/mg lip (Tabela 2). Observamos médias mais elevadas para fêmeas adultas que fêmeas imaturas na área de reprodução, entretanto, uma diferença significativa não foi detectada (Tabela 2). Também não ocorreu diferença entre os níveis de progesterona entre fêmeas adultas acompanhadas de filhotes e sem filhotes (df = 50, $t = -0.48$, $p = 0.62$ em ng/g; e df = 50, $t = -1.22$, $p = 0.22$ em ng/mg lip) (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias $\pm$ erro padrão da média dos níveis de P4 em ng/g de gordura e ng/mg de lipídios em machos e fêmeas de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil, 2011 - 2012

	N	ng/g	ng/mg lip
Machos	89	0.94 ± 0.15	5.28 ± 1.59
Fêmeas	55	13.62 ± 3.06	74.22 ± 18.48
Machos			
Adultos	84	0.94 ± 0.12	5.42 ± 1.69
Imaturos	5	0.86 ± 0.18	2.92 ± 0.93
Fêmeas			
Adultas	52	14.36 ± 3.21	78.36 ± 19.40
Imaturas	3	0.86 ± 0.25	2.61 ± 0.99
Fêmeas adultas			
com filhote	32	13.11 ± 2.79	59.63 ± 14.13
sem filhote	20	16.34 ± 7.17	108.32 ± 45.05

Observa-se no gráfico 15 que o valor mais elevado de P4 na gordura de machos em área de reprodução foi de 3.62 ng/g. Já o gráfico 16 representa os níveis de P4 de todos os animais dosados em área de reprodução. O nível mais elevado de P4 foi de uma fêmea adulta (158 ng/g).

Gráfico 15 – Nível de progesterona da camada de gordura de 89 machos de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil 2011 – 2012.

Gráfico 16 – Nível de progesterona da camada de gordura de 89 machos, 20 fêmeas e 32 fêmeas com filhote de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil 2011 – 2012

4.3.3.2 Área de Alimentação

Machos ($n = 10$) e fêmeas ($n = 8$) na área de alimentação também apresentaram médias significativamente diferentes de P4: as fêmeas apresentaram médias mais elevadas tanto em ng/g ($df = 16$, $t = 2.39$ e $p = 0.02$) quanto em ng/mg lip ($df = 16$, $t = 2.78$ e $p = 0.01$) (Gráfico 17).

Gráfico 17 - Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança dos níveis de progesterona em ng/g e ng/mg de lipídio da camada de gordura de baleias jubarte no Parque Francisco Coloane, Chile 2011 – 2012

As médias de P4 dos machos adultos e imaturos não diferiram entre si ($df = 8$, $t = -0.7$, $p = 0.46$ em ng/g; e $df = 8$, $t = -0.35$, $p = 0.73$ em ng/mg lip), assim como as médias das fêmeas adultas e imaturas ($df = 6$, $t = -0.3$, $p = 0.77$ em ng/g; e $df = 6$, $t = -0.36$, $p = 0.72$ em ng/mg lip) e fêmeas com filhote e sem filhote ($df = 6$, $t = -0.75$, $p = 0.47$ em ng/g; e $df = 6$, $t = -0.82$, $p = 0.44$ em ng/mg lip) (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias $\pm$ erro padrão da média dos níveis de P4 em ng/g de gordura e ng/mg de lipídios em machos e fêmeas de baleias jubarte no Parque Marinho Francisco Coloane, Chile, 2011 - 2012

	N	ng/g	ng/mg lip
Machos	10	2.17 ± 0.48	12.12 ± 2.29
Fêmeas	8	21.81 ± 9.23	129.92 ± 47.61
Machos			
Adultos	5	1.78 ± 0.47	11.28 ± 2.52
Imaturos	5	2.55 ± 0.87	12.97 ± 4.12
Fêmeas			
Adultas	5	19.52 ± 13.83	115.53 ± 63.10
Imaturas	3	25.62 ± 12.06	153.91 ± 86.15
Fêmeas adultas			
com filhote	3	31.12 ± 21.68	181.61 ± 88.30
sem filhote	5	16.22 ± 8.76	98.91 ± 58.02

4.3.3.3 Área de Reprodução x Área de Alimentação

O intervalo de confiança de 95% dos valores de P4 foi de 10.78 – 25.20 ng/g para as fêmeas; e de 1.01 – 1.34 ng/g para os machos quando as médias das duas áreas são consideradas. Comparando-se as médias dos machos e fêmeas entre os meses, não foi observada diferença significativa ($F(7, 90) = 5,40$ e $p = 0.05$; $F(7, 55) = 0.94$ e $p = 0.48$ para machos e fêmeas, respectivamente) (Gráfico 18). Quando os meses são agrupados em área de alimentação e área de reprodução, também não há diferença significativa entre as médias de fêmeas em ng/g ou ng/mg de lipídio ($t = 0.40$, $p = 0.68$; e $t = 1,07$, $p = 0.28$, respectivamente); ou de machos ($t = 4.46$, $p = 0.06$; e $t = 1.41$, $p = 0.16$, respectivamente) (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias $\pm$ erro padrão da média dos níveis de P4 em ng/g de gordura e ng/mg de lipídios em machos e fêmeas de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil, e Parque Marinho Francisco Coloane, Chile 2011 - 2012

	N	ng/g	ng/mg lip
Fêmeas			
Alimentação	8	21.81 $\pm$ 9.23	129.92 $\pm$ 47.61
Reprodução	55	17.43 $\pm$ 9.92	74.22 $\pm$ 18.48
Machos			
Alimentação	10	2.17 $\pm$ 0.48	11.12 $\pm$ 2.29
Reprodução	89	1.20 $\pm$ 0.15	5.28 $\pm$ 1.59

Gráfico 18 – Médias e intervalos de confiança de 0.95 dos níveis de P4 de fêmeas e machos ao longo dos meses em área de alimentação (população G) e área de reprodução (população A), 2011 – 2012

No gráfico de dispersão 19, observamos os níveis de P4 de todos os animais em área de alimentação e área de reprodução. O valor mais elevado para machos foi de 5.59 ng/g em área de alimentação e 3.62 ng/g em área de reprodução. Picos de P4 (média $\pm$ 2DP), ou seja,

valores $\geq 46,87$ ng/g foram observados em fêmeas adultas e fêmeas com filhotes, e sugerem um estado de prenhez.

Gráfico 19 – Nível de progesterona da camada de gordura de 99 machos, 28 fêmeas e 35 fêmeas com filhote de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil 2011 – 2012; e Parque Marinho Francisco Coloane, Chile 2011 – 2012

4.3.4 Testosterona

4.3.4.1 Área de Reprodução

Machos ($n = 121$) apresentaram média significativamente mais elevada de T que as fêmeas ($n = 30$) na área de reprodução quando em ng/g ($df = 149$, $t = 3.39$, $p = 0.0009$) (Gráfico 20).

Gráfico 20 - Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança dos níveis de testosterona em ng/g da camada de gordura de 121 machos e 30 fêmeas de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil 2011 – 2012

Não houve diferença entre as médias mensais de T entre os machos ou entre as fêmeas na área de reprodução (julho – outubro) (Gráfico 21) quando em ng/g $F(3, 143) = 1.04$, $p = 0.39$ ou em ng/mg lip $F(3, 143) = 0.47$, $p = 0.71$. As classes etárias também não apresentaram médias diferentes. Apesar de a média dos animais machos imaturos ser inferior que a média dos animais maduros, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($df = 119$, $t = 0.79$, $p = 0.43$ quando em ng/g; e $df = 119$, $t = 1.21$, $p = 0.33$ quando em ng/mg lip) (Tabela 5). A comparação entre as médias de fêmeas adultas e imaturas não foi possível devido ao baixo n amostral de fêmeas imaturas ($n = 2$).

Gráfico 21 - Média e intervalos de confiança de 0.95 do nível de T de machos e fêmeas ao longo dos meses em área de reprodução, PARNA Abrolhos, Brasil, 2011 – 2012

Tabela 5 – Médias $\pm$ erro padrão da média dos níveis de T em ng/g de gordura e ng/mg de lipídios em machos e fêmeas de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil, 2011 - 2012

	N	ng/g	ng/mg lip
Machos	121	0.83 $\pm$ 0.06	3.84 $\pm$ 0.30
Fêmeas	30	0.37 $\pm$ 0.03	2.84 $\pm$ 0.88
Machos			
Adultos	115	0.84 $\pm$ 0.06	3.92 $\pm$ 0.31
Imaturos	6	0.60 $\pm$ 0.13	2.22 $\pm$ 0.67

4.3.4.2 Área de Alimentação

Ao contrário do que ocorreu na área de reprodução, aqui não houve diferença entre os níveis de T de machos e fêmeas ($df = 19$, $t = -0.81$, $p = 0.42$ quando em ng/g; e $df = 19$, $t = 0.21$, $p = 0.83$ quando ng/mg lip). Também não foram observadas diferenças entre machos maduros e imaturos em ng/g ($df = 10$, $t = -2.74$, $p = 0.06$) e ng/mg lip ($df = 10$, $t = -0.51$, $p = 0.62$); e fêmeas maduras e imaturas ($df = 7$, $t = 1.35$, $p = 0.22$ quando em ng/g; e $df = 7$, $t = 1.12$, $p = 0.29$ quando ng/mg lip) (Tabela 6).

Tabela 6 – Médias $\pm$ erro padrão da média dos níveis de T em ng/g de gordura e ng/mg de lipídio em machos e fêmeas de baleias jubarte no Parque Marinho Francisco Coloane, Chile, 2011 - 2012

	N	ng/g	ng/mg lip
Machos	12	0.88 $\pm$ 0.08	4.79 $\pm$ 0.83
Fêmeas	9	0.79 $\pm$ 0.06	5.03 $\pm$ 0.71
Machos			
Adultos	7	0.73 $\pm$ 0.09	4.41 $\pm$ 1.22
Imaturos	5	0.93 $\pm$ 0.07	5.30 $\pm$ 1.15
Fêmeas			
Adultas	6	0.85 $\pm$ 0.08	5.59 $\pm$ 0.98
Imaturas	3	0.68 $\pm$ 0.01	3.91 $\pm$ 0.60

4.3.4.3 Área de Reprodução x Área de Alimentação

O tecido adiposo dos machos em área de reprodução não apresentou níveis de T diferentes da média dos machos em área de alimentação quando expresso em ng/g ($df = 131$, $t = 0.25$, $p = 0.80$) ou em ng/mg lip ($df = 131$, $t = 0.94$, $p = 0.34$) (Gráfico 22). Quando comparamos as médias mensais dos níveis de T dos machos também não observamos diferença significativa entre os meses: $F(14, 248) = 1.55$ e $p = 0.09$ quando em ng/g; e $F(7,125) = 1.39$ e $p = 0.21$ quando em ng/mg lip. Entretanto, quando comparamos as médias entre os meses apenas dos machos adultos, observamos níveis de T significativamente mais elevados em setembro com média de 1.19 ng/g ($F(12, 228) = 1.83$, $p = 0.03$) (Gráfico 25).

Já as fêmeas apresentaram médias de T significativamente mais elevadas em área de alimentação tanto quando os níveis são expressos em ng/g ($df = 37$, $t = 5.65$, $p = 0.000002$) quando em ng/mg lip ($df = 37$, $t = 3.59$, $p = 0.0009$) (Gráfico 23). As médias mensais dos valores de T foram significativamente mais elevadas em maio que setembro e outubro ($F(14, 58) = 3.01$, $p = 0.002$) quando em ng/g (Gráfico 24).

O intervalo de confiança (95%) do nível de T foi de 0.38 – 0.55 ng/g para as fêmeas; e de 0.72 – 0.96 ng/g para os machos; e 1.93 – 3.58 ng/mg lip para as fêmeas e 3.35 – 4,50 ng/mg lip para machos quando as médias das duas áreas são consideradas.

Gráfico 22 – Média, média $\pm$ intervalo de confiança de 0.95 dos níveis de testosterona em ng/g da camada de gordura de 15 machos em área de reprodução (população A); e 7 machos em área de alimentação (população G) ao longo dos meses, 2011 - 2012

Gráfico 23 - Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança de 0.95 dos níveis de testosterona em ng/g e ng/mg lip da camada de gordura de 30 fêmeas em área de reprodução (população A); e 9 fêmeas em área de alimentação (população G), 2011 - 2012

Gráfico 24 - Média e intervalo de confiança de 0.95 dos níveis de testosterona em ng/g e ng/mg lip da camada de gordura de 30 fêmeas em área de reprodução (população A); e 9 fêmeas em área de alimentação (população G) ao longo dos meses, 2011 - 2012

Observando-se 133 machos e 38 fêmeas no gráfico de dispersão 25, notamos que picos de testosterona, ou seja, média $\pm$ 2 DP (2.02 ng/g) foram observados apenas em machos na área de reprodução. As médias dos machos mais elevadas corresponderam ao mês de setembro (dias 244 a 273).

Gráfico 25 - Nível de testosterona da camada de gordura de 38 fêmeas e 133 machos de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil e Parque Marinho Francisco Coloane, Chile 2011 – 2012

4.3.5 Estradiol

4.3.5.1 Área de Reprodução

A média de estradiol de todas as fêmeas biopsadas em área de reprodução foi mais elevada que a média de todos os machos tanto em E2 em ng/g quando em ng/mg de lipídio extraído ($df = 110$, $t = -4,13$, $p = 0.00007$; e $df = 110$, $t = -2.68$, $p = 0.008$, respectivamente) (Gráfico 26 e Tabela 7).

Gráfico 26 - Média, média $\pm$ erro padrão da média e intervalo de confiança dos níveis de estradiol em ng/g e ng/mg de lipídio da camada de gordura de machos e fêmeas de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil, 2011 - 2012

Fêmeas com filhote e fêmeas sem filhotes não apresentaram médias significativamente distintas ($df = 37$, $t = -1.24$, $p = 0.22$ em ng/g; e $df = 37$, $t = -1.20$, $p = 0.23$ em ng/mg lip). A comparação entre fêmeas imaturas e adultas não foi possível devido ao baixo n amostral de fêmeas imaturas. Quando comparamos o nível de estradiol entre machos adultos e imaturos, também não observamos diferença em ng/g ($df = 71$, $t = 0.19$, $p = 0.85$) ou ng/mg de lipídio ($df = 71$, $t = 0.76$, $p = 0.8544$).

Tabela 7 – Médias $\pm$ erro padrão da média dos níveis de E2 em ng/g de gordura e ng/mg de lipídios em machos e fêmeas de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil, 2011 - 2012

	N	ng/g	ng/mg lip
Machos	73	0.74 ± 0.06	3.88 ± 0.54
Fêmeas	39	1.26 ± 0.12	6.36 ± 0.75
Machos			
Adultos	69	0.74 ± 0.06	3.98 ± 0.56
Imaturos	4	0.69 ± 0.22	2.15 ± 0.58
Fêmeas			
com filhote	28	1.16 ± 0.07	5.79 ± 0.83
sem filhote	11	1.51 ± 0.42	7.80 ± 1.63

4.3.5.2 Área de Alimentação

Ao contrário do que foi observado na área de reprodução, machos e fêmeas biopsados na área de alimentação não apresentaram médias significativamente diferentes entre si em ng/g ou ng/mg lip (df = 19, t = -0.49, p = 0.62; e df = 19, t = 0.43, p = 0.67, respectivamente) (Tabela 8). As médias de fêmeas com filhote e sem filhote não foram diferentes entre si em ng/g (df = 7, t = -1.81, p = 0.11) ou ng/mg lip (df = 7, t = -1.01, p = 0.34). Machos e fêmeas adultos e imaturos também não apresentaram médias diferentes: df = 10, t = 0.08, p = 0.93 em ng/g; e df = 10, t = -0.76, p = 0.46 em ng/mg lip para machos; e df = 7, t = 0.39, p = 0.70 em ng/g; e df = 7, t = 1.08, p = 0.31 em ng/mg lip para fêmeas (Tabela 8).

Tabela 8 – Médias $\pm$ erro padrão da média dos níveis de E2 em ng/g de gordura e ng/mg de lipídios em machos e fêmeas de baleias jubarte no Parque Marinho Francisco Coloane, Chile, 2011 - 2012

	N	ng/g	ng/mg lip
Machos	12	2.02 $\pm$ 0.25	10.05 $\pm$ 1.65
Fêmeas	9	1.85 $\pm$ 0.21	11.45 $\pm$ 3.05
Machos			
Adultos	7	2.01 $\pm$ 0.42	11.13 $\pm$ 2.65
Imaturos	5	2.05 $\pm$ 0.24	8.53 $\pm$ 1.47
Fêmeas			
Adultas	6	1.91 $\pm$ 0.31	13.77 $\pm$ 4.37
Imaturas	3	1.73 $\pm$ 0.14	6.79 $\pm$ 0.88
Fêmeas			
com filhote	3	2.31 $\pm$ 0.51	15.84 $\pm$ 8.91
sem filhote	6	1.62 $\pm$ 0.12	9.25 $\pm$ 1.91

4.3.5.3 Área de Reprodução x Área de Alimentação

Os níveis de estradiol na área de alimentação foram maiores do que os níveis de estradiol em área de reprodução tanto em machos (KW-H(1,85) = 22.8801, p = 0.000002 em ng/g; e KW-H(1,85) = 17.0323, p = 0.00004 em ng/mg lip) quanto em fêmeas (KW-H(1,48) = 8.5193, p = 0.0035 em ng/g; e KW-H(1,48) = 5.5889, p = 0.0181) (Gráfico 27).

Gráfico 27 - Média, média $\pm$ erro padrão da média e média $\pm$ desvio-padrão dos níveis de estradiol em ng/g de gordura e ng/mg de lipídio da camada de gordura de 12 machos e 9 fêmeas de baleias jubarte em área de alimentação, e 73 machos e 39 fêmeas em área de reprodução, 2011 – 2012

Quando as médias dos meses de alimentação e reprodução são comparadas, pode-se observar diferença significativa entre os meses de março e maio com relação aos meses de julho, setembro e outubro nos machos quando em ng/g ($F(7, 73) = 7.72, p = 0.00006$); e entre março e maio com relação a todos os meses da área de reprodução quando em ng/mg lip também nos machos ($F(7, 73) = 2.88, p = 0.01$) (Gráfico 28). O intervalo de confiança dos valores de E2 quando as duas áreas foram agrupadas foi de 1.12 – 1.59 ng/g para as fêmeas, e de 0.71 – 1.02 ng/g para os machos; e 5.56 – 9.14 ng/mg lip para fêmeas, e 3.35 – 5.60 ng/mg lip para machos.

Gráfico 28 - Média e erro padrão da média dos níveis de E2 em ng/g de gordura e ng/mg de lipídio de 12 machos e 9 fêmeas de baleias jubarte em área de alimentação, e 73 machos e 39 fêmeas em área de reprodução ao longo dos meses, 2011 – 2012

4.3.6 Comprimento corporal de baleias biopsadas

Das 61 baleias biopsadas e individualmente identificadas em 2011 e 2012, 45 imagens de 28 indivíduos tiveram registro fotográfico que atende as necessidades para estimativa do comprimento corporal por meio de da fotogrametria: determinação da distância da baleia até

o fotógrafo com o uso de telêmetro (Range Finder®), posição da nadadeira caudal perpendicular ao fotógrafo, e foco apropriado da imagem (Figura 19). Algumas baleias puderam ser fotografadas em mais de uma ocasião (Tabela 9).

Figura 19 – Indivíduo adulto biopsado no dia 03/10/2012, individualmente identificado e com os requisitos para a uma fotogrametria correta (Zoom 280 mm; distância baleia-fotógrafo: 75 m)

Fonte: (MELLO, D.M.D., 2011)

Todos os animais foram previamente identificados como adultos no momento da biópsia por meio da observação direta. O comprimento corporal médio estimado foi de 12.96 metros para os machos e 12.04 metros para as fêmeas, sem diferença significativa entre os sexos ($df = 19$, $t = -1.29$, $p = 0.21$) (Gráfico 29). A menor fêmea acompanhada de filhote mediu 10.21 metros (Tabela 9). Apenas os animais com registros fotográficos classificados como ideal foram considerados nas análises estatísticas.

Tabela 9 – Câmeras, distância focal, distância à baleia, largura da cauda, comprimento do corpo, intervalo de confiança e fórmulas utilizadas na determinação do comprimento corporal de baleias jubarte em área de reprodução, PARNA Abrolhos, Brasil 2011 – 2012.

Ano	Biópsia	Sexo	C E	Ideal	Câmera	Dist. Focal (mm)	Dist. (m)	N pixels	L C (cm)	C C (m)	Int. Conf. (m)	Fórmula utilizada
2011	726	M	adt	não	D70	300	56	2398	491.83	14.26	12.00 - 16.51	$CC = ((0.0019 * x + 0.0987) * NP$
2011	727	M	adt	não	D70	300	48	3212	609.96	17.68	15.17 - 20.19	$CC = ((0.0019 * x + 0.0987) * NP$
2011	737	M	adt	não	D70	300	101	1322	384.17	11.14	9.14 - 13.13	$CC = ((0.0019 * x + 0.0987) * NP$
2011	741	F	adt	sim	D70	300	120	1410	460.65	13.35	11.17 - 15.53	$CC = ((0.0019 * x + 0.0987) * NP$
2011	741	F	adt	não	D70	300	72	1938	456.40	13.23	11.06 - 15.40	$CC = ((0.0019 * x + 0.0987) * NP$
2011	741	F	adt	sim	D70	300	122	1424	470.63	13.64	11.44 - 15.85	$CC = ((0.0019 * x + 0.0987) * NP$
2011	744	F	adt	sim	D70	70	45	916	439.59	12.74	10.61 - 14.87	$CC = ((0.0107 * x) - 0.0016) * NP$
2011	773	M	adt	sim	D90	400	165	1574	359.50	10.42	8.49 - 12.35	$CC = ((0.0014 * x) - 0.0026) * NP$
2011	776	M	adt	não	D90	130	26	3642	316.85	9.19	7.38 - 11	$CC = ((0.0036 * x - 0.0066) * NP$
2011	776	M	adt	não	D90	200	69	2778	524.49	15.20	12.87 - 17.53	$CC = ((0.0028 * x) - 0.0044) * NP$
2011	795	?	?	sim	D80	135	29	3348	426.54	12.36	10.26 - 14.46	$CC = ((0.0045 * x - 0.0031) * NP$
2012	848	M	adt	não	D80	300	170	1110	395.05	11.45	9.43 - 13.47	$CC = ((0.0021 * x) - 0.0011) * NP$
2012	848	M	adt	sim	D80	300	64	3415	455.22	13.20	11.03 - 15.36	$CC = ((0.0021 * x) - 0.0011) * NP$
2012	848	M	adt	sim	D80	300	121	1894	479.18	13.89	11.66 - 16.12	$CC = ((0.0021 * x) - 0.0011) * NP$
2012	865	F	adt	não	D7000	130	25	2116	388.92 **	11.27	9.27 - 13.28	$CC = ((0.0037 * x) - 0.0006) * NP$
2012	866	F	mãe	não	D7000	270	89	2899	472.83	13.71	11.49 - 15.92	$CC = ((0.0018 * x) + 0.0029) * NP$
2012	866	F	mãe	sim	D7000	210	58	2772	353.81	10.26	8.34 - 12.17	$CC = ((0.0022 * x) + 3.8504E-5) * NP$
2012	866	F	mãe	sim	D7000	230	54	3245	352.08	10.21	8.30 - 12.12	$CC = ((0.0021 * x) - 0.0049) * NP$
2012	870	F	adt	não	D7000	80	35	1999	395.00	11.45	9.43 - 13.47	$CC = ((0.0058 * x) - 0.0054) * NP$
2012	893	M	adt	sim	D7000	270	93	1277	434.94 **	12.61	10.49 - 17.73	$CC = ((0.0018 * x) + 0.0029) * NP$
2012	893	M	adt	sim	D7000	116	25	3812	376.24	10.91	8.93 - 12.88	$CC = ((0.0043 * x) - 0.0088) * NP$
2012	899	M	adt	não	D7000	400	86	3206	345.93	10.03	8.14 - 11.92	$CC = ((0.0013 * x) - 0.0039) * NP$
2012	900	M	adt	sim	D7000	165	47	3513	475.66	13.79	11.57 - 16.01	$CC = ((0.003 * x) - 0.0056) * NP$
2012	900	M	adt	não	D7000	100	21	1621	153.35	4.45	3.19 - 5.71	$CC = ((0.0049 * x) - 0.0083) * NP$
2012	900	M	adt	sim	D7000	110	49	2310	535.46	15.52	13.17 - 17.87	$CC = ((0.0049 * x) - 0.0083) * NP$
2012	901	M	adt	sim	D7000	330	101	3470	519.11	15.05	12.73 - 17.36	$CC = ((0.0015 * x) - 0.0019) * NP$
2012	902	M	adt	não	D7000	130	38	2710	379.40	11.00	9.02 - 12.98	$CC = ((0.0037 * x) - 0.0006) * NP$
2012	903	M	adt	não	D7000	185	47	2427	298.76	8.66	6.90 - 10.42	$CC = ((0.0027 * x) - 0.0038) * NP$

2012	903	M	adt	não	D7000	80	54	718	442.00**	12.81	10.67 - 14.95	CC = ((0.0058*x) - 0.0054) * NP
2012	910	F	mãe	não	D7000	116	28	3136	349.98	10.15	8.24 - 12.05	CC = ((0.0043*x) - 0.0088) * NP
2012	911	F	mãe	não	D7000	135	47	1995	329.77	9.56	7.71 - 11.41	CC = ((0.0036*x) - 0.0039) * NP
2012	911	F	mãe	sim	D7000	135	88	1270	397.38	11.52	9.49 - 13.55	CC = ((0.0036*x) - 0.0039) * NP
2012	916	M	adt	sim	D7000	165	57	2774	458.82	13.30	11.12 - 15.48	CC = ((0.003*x) - 0.0056) * NP
2012	922	F	mãe	não	D7000	400	184	2545	598.84	17.36	14.87 - 19.84	CC = ((0.0013*x) - 0.0039) * NP
2012	922	F	mãe	sim	D7000	400	85	4077	434.61	12.60	10.48 - 14.72	CC = ((0.0013*x) - 0.0039) * NP
2012	922	F	mãe	não	D7000	230	65	1673	220.17	6.39	4.87 - 7.90	CC = ((0.0021*x) - 0.0049) * NP
2012	922	F	mãe	não	D7000	130	30	2038	225.00	6.53	5.0 - 8.05	CC = ((0.0037*x) - 0.0006) * NP
2012	925	M	adt	sim	D7000	400	224	1632	468.87	13.59	11.39 - 15.79	CC = ((0.0013*x) - 0.0039) * NP
2012	927	F	adt	não	D7000	150	46	2726	398.27	11.55	9.52 - 13.57	CC = ((0.0032*x) - 0.0011) * NP
2012	928	M	adt	sim	D7000	95	46	2066	479.31	13.89	11.66 - 16.12	CC = ((0.0052*x) - 0.0072) * NP
2012	929	M	adt	sim	D7000	270	105	2296	440.60	12.77	10.64 - 14.91	CC = ((0.0018*x) + 0.0029) * NP
2012	929	M	adt	não	D7000	80	18	2776	274.82	7.97	6.28 - 9.66	CC = ((0.0058*x) - 0.0054) * NP
2012	931	F	mãe	não	D7000	80	12	4213	270.47	7.84	6.17 - 9.52	CC = ((0.0058*x) - 0.0054) * NP
2012	931	F	mãe	não	D7000	210	38	4282	358.14	10.38	8.46 - 12.31	CC = ((0.0022*x) + 3.8504E-5) * NP
2012	942	M	adt	não	D7000	400	149	2138	405.79	11.76	9.71 - 13.81	CC = ((0.0013*x) - 0.0039) * NP

Legenda:

C E = classe etária; Dist (m) = distância em metros; N pixels = número de pixels da imagem; L C = largura da nadadeira caudal; C C = comprimento corporal; Int. Conf. = intervalo de confiança. ** Largura da cauda determinada pela medida de apenas um lobo segundo Santoro e Groch (2010).

Gráfico 29 - Média, média $\pm$ erro padrão da média e média $\pm$ desvio-padrão dos comprimentos corporais de 14 machos e 7 fêmeas de baleias jubarte no PARNA Abrolhos, Brasil, 2011-2012

Houve correlação significativa entre a quantidade de P4 dosada e o comprimento corporal dos machos ($r = -0.89$, $p = 0.0025$) (Gráfico 30). Os níveis de T não apresentaram correlação significativa com o comprimento corporal dos machos ($r = -0.24$, $p = 0.4$). O baixo n amostral de comprimentos corporais determinados para as fêmeas não permitiu a realização de análises de correlação com os níveis de hormônio.

Gráfico 30 – Correlação entre o comprimento corporal e níveis de P4 da gordura de 8 machos em área de reprodução, PARNA Abrolhos, 2011 - 2012

4.3.7 Identificação individual e história de vida

Dentre as 199 baleias biopsadas em 2011 e 2012, 61 foram individualmente identificadas pelo padrão de coloração da nadadeira caudal. Destas, sete são animais de recaptura, ou seja, foram identificadas em anos anteriores. O quadro 3 ilustra alguns dados relativos à história de vida destes animais. A idade mínima dos indivíduos variou de 2 a 23 anos.

Os machos foram vistos em frequências variadas ao longo dos anos, e quatro (#3162AB, #3095AB; 1546AB; e 1710AB) dos seis animais apresentaram níveis de testosterona mais elevados que a média dos machos adultos do presente estudo na área de reprodução (Quadro1). A única fêmea deste estudo com história de vida conhecida (# 0452AB) foi vista pela primeira vez em 1997, e novamente nos anos de 2004 e 2011. Foi vista em outubro de 2012 acompanhada de um filhote pequeno.

Quadro 3 – Capturas e recapturas de sete animais individualmente identificados e seus respectivos níveis de hormônio na camada de gordura no momento da biópsia no PARNA Abrolhos, Brasil, 2011 – 2012. *Não dosado

2011
CAPTURA	RECAPTURAS		ID: #3162AB Sexo: M Cl. etária: Adt P4: 1.57 ng/g T: 2.05 ng/g E2: *
	2009	2011
2008	2011		ID: #3095AB Sexo: M Cl. etária: Adt P4: 1.81 ng/g T: 1.31 ng/g E2: 0.78 ng/g
2003	2006 2008 2011		ID: #1546AB Sexo: M Cl. etária: Adt P4: 0.64 ng/g T: 1.41 ng/g E2: 0.56 ng/g
2012
CAPTURA	RECAPTURAS		ID: #0020AB Sexo: M Cl. etária: Adt P4: 0.69 ng/g T: 0.36 ng/g E2: 0.31 ng/g
	1989	1991/1993 1996/1997 1998/2012 2012
2004	2005 2012		ID: #1710AB Sexo: M Cl. etária: Adt P4: 1.36 ng/g T: 2.48 ng/g E2: *
2007	2012		ID: #2730AB Sexo: M Cl. etária: Adt P4: 0.83 ng/g T: 0.57 ng/g E2: 0.43 ng/g
1997	2004 2011 2012		ID: #0452AB Sexo: F mãe Cl. etária: Adt P4: 2.24 ng/g T: 0.61 ng/g E2: 1.08 ng/g

4.3.8 Fotoperiodismo

A variação das fases claras e escuras do dia no ano de 2012 e as médias de P4, T e E2 podem ser observadas no gráfico 31. Uma análise de correlação entre o fotoperíodo e os níveis hormonais da camada de gordura não foi possível devido ao baixo n amostral de amostras na área de alimentação.

Gráfico 31 - Média mensal dos níveis de P4 (99 machos e 63 fêmeas); T (133 machos e 39 fêmeas); e E2 (85 machos e 48 fêmeas) ao longo dos meses, 2011 – 2012; e duração das fases clara e escura do dia ao longo dos meses em área de reprodução e área de alimentação - 2012

4.4 DISCUSSÃO

O presente estudo descreveu pela primeira vez níveis de P4, T e E2 de amostras de gordura de baleias jubarte de vida livre. Como esperado, percebeu-se diferenças dos níveis de hormônio entre machos e fêmeas, bem como em estados fisiológicos distintos – repouso e atividade sexual, em áreas de alimentação e reprodução, respectivamente. Também foi estimado o comprimento corporal em baleias jubartes vivas, demonstrando a viabilidade da técnica de fotogrametria para este fim. Por fim, a combinação entre dosagens hormonais, história de vida e fotoperíodo demonstrou que a complementariedade destes estudos tem o potencial de fornecer informações robustas acerca da fisiologia reprodutiva da espécie.

Como esperado, machos apresentaram médias de testosterona mais elevadas que fêmeas em área de reprodução. De maneira interessante, essa diferença não foi significativa na área de alimentação onde os animais estão fora do período reprodutivo. Chittleborough (1955a) observou em baleias abatidas pela caça comercial na Austrália, que machos adultos em área de alimentação apresentaram menores diâmetros dos túbulos seminíferos que animais em atividade sexual. O peso dos testículos também foi significativamente maior em área de reprodução do que área de alimentação, e reforça o caráter sazonal da reprodução de baleias jubarte. No presente estudo, também foi observado que os níveis de testosterona de machos adultos das áreas de reprodução, especialmente nos meses de setembro e outubro, estavam mais elevados que em área de alimentação, o que representaria uma dinâmica hormonal condizente ao esperado do estado fisiológico das baleias. Da mesma forma, Kellar et al. (2009) observaram sazonalidade reprodutiva por meio de da dosagem de testosterona da camada de gordura em golfinhos comuns da costa da Califórnia. Animais adultos apresentaram média de testosterona mais elevada no verão que no restante do ano. Kellar et al. (2009) também notaram que adultos machos apresentaram níveis mais elevados de T que animais imaturos. No presente estudo houve uma diferença entre machos imaturos e machos adultos, com os animais jovens apresentando médias menores. Entretanto, esta diferença não foi significativa. Provavelmente um n amostral maior possa indicar uma diferença ontogenética que, neste caso, seria evidenciada em colheitas feitas em área de reprodução onde ocorre uma variação sazonal dos machos adultos.

Nesse estudo foi possível dosar pela primeira vez estradiol da camada de gordura de um cetáceo de vida livre. As técnicas de colheita, extração e dosagem não só se mostraram

viáveis, como indicaram diferenças sazonais, e diferenças entre machos e fêmeas. Neste caso, as fêmeas apresentaram médias de estradiol mais elevadas em área de reprodução. Fêmeas e machos apresentaram médias mais elevadas em áreas de alimentação que em áreas de reprodução. Observou-se uma tendência à diminuição dos níveis de estradiol ao longo dos meses. A sazonalidade reprodutiva já foi reportada em baleias beluga de cativeiro (STEINMAN et al., 2012) onde o nível de metabólitos de estradiol urinário foi mais elevado de março a junho, mesmo período em que ocorreram ovulações. O estado reprodutivo pode ser acessado de maneira instantânea quando o hormônio é dosado no sangue, e com intervalos de poucas horas quando seus metabólitos são dosados na urina (WALKER et al., 1988). Já na gordura parece haver um tempo de difusão do hormônio do sangue para a gordura e vice-versa. Essa aparente inversão dos níveis de estradiol com relação ao estado reprodutivo dos animais pode ser o feito do tempo da metabolização deste hormônio na gordura. Kellar et al. (2013) notaram que em baleias “bowhead”, a elevação dos esteroides no sangue é seguida por uma elevação na urina e posteriormente na gordura, e neste último caso, o intervalo é de meses. Nesse contexto, o nível mais elevado de E2 que observamos ao longo dos meses na área de alimentação parece corresponder ao acúmulo de hormônios que ocorreu na estação reprodutiva do ano anterior.

Picos de E2 (média $\pm$ 2DP) não puderam ser percebidos nas fêmeas do presente estudo. O processo de depósito e remoção dos esteroides ocorre de maneira mais lenta em gordura do que no sangue (HILLBRAND; ELSAESSER, 1983) e urina, e muito provavelmente a detecção de picos hormonais que duram poucos dias ou horas, como no caso de E2, não seja percebível nesta matriz fisiológica.

Diferenças dos níveis de P4 entre machos e fêmeas também puderam ser relatados no presente estudo. A média das fêmeas foi significativamente mais elevada tanto em área de reprodução quanto em área de alimentação. De maneira interessante, observamos picos deste hormônio (média $\pm$ 2DP) apenas em fêmeas adultas e fêmeas acompanhadas de filhotes. A média significativamente mais elevada destes dois grupos provavelmente levou à grande diferença entre os sexos nas duas áreas. Não obstante, estes picos sugerem forte indicativo de prenhez. No caso de fêmeas com filhotes, a P4 ainda não totalmente metabolizada, aparece em níveis altos na gordura. Em fêmeas desacompanhadas de filhotes, a P4 teve tempo suficiente para atingir níveis elevados na gordura em uma possível prenhez, que dura cerca de 11 meses (CHITTLEBOROUGH, 1954). Fêmeas com nível de P4 acima ou igual a 46.87 ng/g estão dentro do grupo de animais com provável gravidez recente ou presente.

A ocorrência de prenhez por meio de da dosagem de P4 da camada de gordura foi descrita pela primeira vez em 2002 por Mansour et al. (2002) em baleias minke abatidas pela caça. Fêmeas prenhes apresentavam média de 132.96 ± 22.46 ng/g, enquanto machos e animais imaturos em torno de 1.86 ± 0.27 . Desde então alguns estudos demonstraram que fêmeas de cetáceos prenhes chegam a apresentar 164 vezes mais P4 que animais não prenhes (TREGO et al., 2013). Pérez et al. (2011) observaram que níveis de P4 foram cerca de nove vezes mais elevados em fêmeas prenhes de *T. truncatus* (54.82 ± 22.86 ng/g) que as demais classes. Também já foi demonstrado que a prenhez ocorre de forma sazonal em *D. delphis* de vida livre, e que existe preferência de hábitat por animais nesta condição (KELLAR et al., 2014). Taxas de prenhez de golfinhos pintados pantropicais (*S. attenuata*) do Pacífico Oriental não só foram estimadas, como sua relação com a atividade de pesca ao longo dos anos pôde ser analisada. Áreas com maior atividade pesqueira apresentam proporcionalmente menor número de fêmeas prenhes, indicando um impacto antrópico direto sobre a reprodução destes animais (KELLAR et al., 2013).

A fotogrametria mostrou-se com uma técnica viável para a determinação do comprimento corporal de baleias jubarte em ambiente natural. O comprimento médio das fêmeas (12.04 metros) está acima do comprimento mínimo observado por Chittleborough (1955b) quando estas atingem a maturidade sexual. Isto indica que o comprimento da maior parte das baleias ou de sua totalidade do presente estudo foi determinado em indivíduos adultos. A mesma tendência foi observada nos machos que tiveram uma média de 12.96 metros de comprimento. Chittleborough (1955a) observou que machos da costa australiana alcançam a maturidade sexual a partir de 11.3 metros de comprimento. Machos e fêmeas do presente estudo não apresentaram diferença significativa entre as médias dos comprimentos, enquanto o esperado seria que fêmeas tivessem maior comprimento maior que machos (CLAPHAM et al., 1997). O comprimento médio de machos e fêmeas foi bastante similar às médias encontradas por Spitz, Herman e Pack (2006) por meio de vídeo-fotogrametria no Havaí, onde 19 machos e 26 fêmeas mediram 11.72 metros e 12.67 metros, respectivamente.

Os níveis hormonais dos machos e fêmeas que tiveram seu comprimento determinado no presente estudo se encontraram dentro do intervalo observado em adultos da espécie (Tabelas 2, 5 e 7). Houve uma correlação significativa entre o nível de P4 e o comprimento corporal dos machos, quanto maior o comprimento do animal, menor o nível de P4 em sua gordura. Entretanto, o pequeno n amostral requer cautela na interpretação desta informação.

Alguns dos animais do presente estudo puderam ser identificados individualmente, e sete destes, são animais de recaptura, ou seja, já haviam sido catalogados antes. Estas informações permitiram um primeiro passo no sentido de investigação da história de vida de alguns indivíduos da população e seu estado reprodutivo atual. Estudos futuros permitirão inferências como intervalo entre partos, e alcance de maturidade sexual. Análises quantitativas não foram realizadas devido ao baixo “n” amostral, consequência também da baixa taxa de recaptura da população da Bahia (14.3%). Os fatores por trás desta baixa taxa de recaptura na população do Brasil estão provavelmente relacionados ao grande tamanho da população, baixa fidelidade ao uso de hábitat e alta taxa de crescimento populacional (WEDEKIN et al., 2010).

A variação entre as fases claras e escuras do dia foi mais evidente nas áreas de alimentação. Sua maior proximidade ao polo sul determina uma diferença mais drástica dos períodos de luz e escuridão ao longo dos meses. Os animais que habitam essas regiões seguem padrões de comportamento, reprodução e uso de hábitat de acordo com a variação do fotoperíodo (BENOIT et al., 2010). Experimentos relacionados à sazonalidade reprodutiva e fotoperíodo são muitas vezes realizados em ambientes com as fases claras e escuras controladas (YELLON; TRAN, 2002; DIXIT; SINGH, 2013). No presente estudo, apesar do baixo n amostral em área de alimentação, demonstramos uma potencial combinação entre dosagens hormonais e variação das fases claras e escuras do dia. St aubin (2001) acredita que o fator determinante para o início da migração em baleias jubarte é o comprimento da fase escura do dia. Estudos futuros abordando diferentes aspectos da fisiologia, como dosagem de hormônios, combinados com fatores ambientais como o fotoperíodo, tem o potencial de promover uma contribuição para elucidar o desconhecimento existente por trás da migração das grandes baleias.

REFERÊNCIAS

- BENOIT, D.; SIMARD, Y.; GAGNÉ, J.; GEOFFROY, M.; FORTIER, L. From polar night to midnight sun: photoperiod, seal predation, and the diel vertical migrations of polar cod (*Boreogadus saida*) under landfast ice in the Arctic Ocean. **Polar Biology**, v. 33, n. 11, p. 1505–1520, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00300-010-0840-x>>. Acesso em: 25 nov. 2014.
- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L. H.; BYERS, A. P.; COLLINS, L.; BARRET, S.; JOGAYLE, H. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the Clouded Leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v. 102, p. 93–102, 1995.
- CYPRIANO-SOUZA, A. L.; FERNÁNDEZ, G. P.; LIMA-ROSA, C. A. V.; ENGEL, M. H.; BONATTO, S. L. Microsatellite genetic characterization of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) breeding ground off Brazil (breeding stock A). **The Journal of heredity**, v. 101, n. 2, p. 189–200, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889721>>. Acesso em: 30/3/2015.
- CHITTLEBOROUGH, R. Studies on the ovaries of the Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre), on the Western Australian coast. **Marine and Freshwater Research**, v. 5, n. 1, p. 35, 1954. CSIRO PUBLISHING. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=126&f=MF9540035>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- CHITTLEBOROUGH, R. Aspects of reproduction in the male Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre). **Marine and Freshwater Research**, v. 6, n. 1, p. 1, 1955. CSIRO PUBLISHING. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=126&f=MF9550001>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- CHITTLEBOROUGH, R. Puberty, physical maturity, and relative growth of the female Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre), on the Western Australian coast. **Marine and Freshwater Research**, v. 6, n. 3, p. 315, 1955. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=MF9550315>>. Acesso em: 21 out. 2014.
- CHITTLEBOROUGH, R. Determination of age in the Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre). **Marine and Freshwater Research**, v. 10, n. 2, p. 125, 1959. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=MF9590125>>. Acesso em: 21 out. 2014.
- CLAPHAM, P. J. Humpback whale. In: PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (ed.). **Encyclopedia of marine mammals**. San Diego, California: Academic Press, 2009. p.589–592.

DIXIT, A. S.; SINGH, N. S. Photoperiod and circadian rhythmicity in testicular response of the tree sparrow. **Biological Rhythm Research**, v. 44, n. 3, p. 369–376, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09291016.2012.692253>>. Acesso em: 25 nov. 2014.

FERRERO, R. C.; WALKER, W. A. Age, growth, and reproductive patterns of the Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*) taken in high seas drift nets in the central North Pacific Ocean. **Canadian Journal of Zoology**, v. 74, n. 9, p. 1673–1687, 1994.

GALES, N.; BANNISTER, J.; FINDLAY, K.; ZERBINI, A. N.; DONOVAN, G. P. Humpback Whales : Status in the Southern Hemisphere Cambridge 2011. **Journal of Cetacean Research and Management**, , v. 3, p. 317p., 2011, Special Issue.

HILLBRAND, F. W.; ELSAESSER, F. Concentrations of progesterone in the backfat of pigs during the oestrous cycle and after ovariectomy. **Journal of reproduction and fertility**, v. 69, n. 1, p. 73–80, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6887142>>. .

HOGG, C. J.; ROGERS, T. L.; SHORTER, A.; BARTON, K.; MILLER, P. J. O.; NOWACEK, D.. Determination of steroid hormones in whale blow: It is possible. **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 3, p. 605–618, jul. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2008.00277.x>>. Acesso em: 20 nov. 2012.

HUNT, K. E.; STIMMELMAYR, R.; GEORGE, C.; HANNS, C.; SUYDAM, R.; BROWER, H.; ROLLAND, R. M. Baleen hormones : a novel tool for retrospective assessment of stress and reproduction in bowhead whales (*Balaena mysticetus*). **Conservation Physiology**, v. 2, n. April, p. 1–12, 2014.

JAQUET, N. A simple photogrammetric technique to measure sperm whales at sea. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 4, p. 862–879, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2006.00060.x>>. Acesso em: 26 jun. 2011.

KELLAR, N.; TREGO, M. Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-7692.2006.00001.x/full>>. Acesso em: 6 out. 2014.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; MARKS, C. I.; CHIVERS, S. J.; DANIL, K.; ARCHER, F. I. Blubber testosterone: a potential marker of male reproductive status in short-beaked common dolphins. **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 3, p. 507–522, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2009.00291.x>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

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

KELLAR, N.; TREGO, M.; CHIVERS, S. 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**, v. 113, n. 2, p. 58–80, 2014. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.3160/0038-3872-113.2.58>>. Acesso em: 6 nov. 2014

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; CHIVERS, S. J.; ARCHER, F. I. 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**, v. 160, n. 12, p. 3113–3124, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00227-013-2299-0>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

KERLEY, L.; GOODRICH, J. Reproductive parameters of wild female Amur (Siberian) tigers (*Panthera tigris altaica*). **Journal of Mammalogy**, v. 84, n. 1, p. 288–298, 2003. Disponível em: <[http://www.asnjournals.org/doi/abs/10.1644/1545-1542\(2003\)084%3C0288%3ARPOWFA%3E2.0.CO%3B2](http://www.asnjournals.org/doi/abs/10.1644/1545-1542(2003)084%3C0288%3ARPOWFA%3E2.0.CO%3B2)>. Acesso em: 11 nov. 2014.

KONG, L.; TANG, M.; ZHANG, T.; WANG, D.; HU, K.; LU, W.; WEI, C.; LIANG, G.; PU, Y. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 11, p. 21253–69, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4264223&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/3/2015.

LOCKYER, C. Investigation of the ear plug of the southern sei whale, *Balaenoptera borealis*, as a valid means of determining age. **ICES Journal of Marine Science**, v. 36, n. 1, p. 71–81, 1974. Disponível em: <<http://icesjms.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/icesjms/36.1.71>>. Acesso em: 16 out. 2014.

MANSOUR, ATEF A. H.; MKAY, DONALD W.; LIEN, JON; ORR, JAMES C.; BANOUB, J. H.; OIEN, N.; STENSON, G. Determination of Pregnancy Status From Blubber Samples in Minke Whales (*Balaenoptera Acutorostrata*). **Marine Mammal Science**, v. 18, n. 1, p. 112–120, 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01022.x>>. Acesso em: 2 ago. 2011.

NEUENHAGEN, C.; GARCIAHARTMANN, M.; GREVEN, H. Histology and morphometrics of testes of the white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) in bycatch samples from the northeastern Atlantic. **Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 72, n. 5, p. 283–298, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1616504707000031>>. Acesso em: 2 ago. 2011.

PALSBØLL, P. J.; VADER, A.; BAKKE, I.; EL-GEWELY, M. R. Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 11, p. 2166–2170, 1992.

REEB, D.; BEST, P. B.; KIDSON, S. H. Structure of the integument of southern right whales, *Eubalaena australis*. **Anatomical record**, v. 290, n. 6, p. 596–613, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17516424>>. Acesso em: 6/4/2015.

ROBECK, T. R.; ATKINSON, S. K. C.; BROOK, F. Reproduction. In: DIERAUF, L. A.; F. M. D. GULLAND (Eds.). **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. p.193–236.

ROLLAND, R. M.; HUNT, K. E.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 308–17, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648005000365>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

ROSENBAUM, H. C.; CLAPHAM, P. J.; ALLEN, J.; NICOLE-JENER, M.; JENNER, C.; FLORES-GONZÁLEZ, L.; URBÁN, J. R.; LADRÓN, P.; MORI, K.; YAMAGUCHI, M.; BAKER, C. S. Geographic-variation in ventral fluke pigmentation of humpback whale *Megaptera novaeangliae* populations worldwide. **Marine Ecology Progress Series**, v. 124, p. 1–7, 1995. Disponível em: <<http://repositorio.fcien.unam.mx:8080/xmlui/handle/11154/3004>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

SCHWARZENBERGER, F.; BROWN, J. Hormone monitoring: an important tool for the breeding management of wildlife species. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift - Veterinary Medicine Austria**, v. 100, p. 209–225, 2013. Disponível em: <http://www.wtm.at/explorer/WTM/Archiv/2013/WTM_09-10-2013_Artikel_1_SchwarzenbergerBrown.pdf>. Acesso em: 7 nov. 2014.

SMITH, T.; ALLEN, J.; CLAPHAM, P. J.; HAMMOND, P. S.; KATONA, S.; LARSEN, F.; LIEN, J.; MATTILA, D.; PALSBOJLL, P. J. An ocean-basin-wide mark-recapture study of the North Atlantic humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). **Marine Mammal Science**, v. 15, p. 1–32, 1999. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00779.x/abstract>>. Acesso em: 7/4/2015.

SOUSA-LIMA, R. S.; GROCH, K. R. Correlation between body length and fluke width in humpback whales, *Megaptera novaeangliae*. **Marine Mammal Science**, v. 26, n. 4, p. 977–981, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2010.00373.x>>. Acesso em: 14/11/2014.

ST AUBIN, D. J. Endocrinology. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Ed.). **CRC handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation**. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. p.165–187.

STEINMAN, K. J.; O'BRIEN, J. K.; MONFORT, S. L.; ROBECK, T. R. Characterization of the estrous cycle in female beluga (*Delphinapterus leucas*) using urinary endocrine monitoring and transabdominal ultrasound: Evidence of facultative induced ovulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, n. 3, p. 389–97, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134179>>. Acesso em: 27 out. 2012.

STEVICK, P. T. Age-length relationships in Humpback Whales: a comparison of strandings in the Western North Atlantic with commercial catches. **Marine Mammal Science**, v. 15, n. 3, p. 725–737, 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00839.x>>. .

THAYER, V. G.; READ, A. J.; FRIEDLAENDER, A. S.; COLBY, D. R.; HOHN, A. A.; MCLELLAN, W. A.; PABST, D.; DEAROLF, J. L.; BOWLES, N. I.; RUSSELL, J. R.; RITTMASER, K. A. Reproductive seasonality of Western Atlantic bottlenose dolphins off North Carolina, U.S.A. **Marine Mammal Science**, v. 19, n. 4, p. 617–629, out. 2003.

TREGO, M. L.; KELLAR, N. M.; DANIL, K. Validation of blubber progesterone concentrations for pregnancy determination in three dolphin species and a porpoise. **PloS One**, v. 8, n. 7, p. e69709, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3728358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27/3/2014.

TRUMBLE, S. J.; ROBINSON, E. M.; BERMAN-KOWALEWSKI, M.; POTTER, C. W.; USENKO, S. Blue whale earplug reveals lifetime contaminant exposure and hormone profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. 16922–6, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3801066&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 17/10/2014.

WALKER, L. A.; CORNELL, L.; DAHL, K. D.; CZEKALA, N. M.; DARGEN, C. M.; JOSEPH, B.; HSUEH, J. W.; LASLEY, B. L.; HSUEH, A. J. Urinary concentrations of ovarian steroid hormone metabolites and bioactive follicle-stimulating hormone in killer whales (*Orcinus orca*) during ovarian cycles and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 5, p. 1013–1020, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3146355>>. Acesso em: 6/11/2014.

WEDEKIN, L. L.; NEVES, M. C.; MARCONDES, M. C. C.; BARACHO, C.; ROSSI-SANTOS, M. R.; ENGEL, M. H.; SIMÕES-LOPES, P. C. Site fidelity and movements of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the Brazilian breeding ground, southwestern Atlantic. **Marine Mammal Science**, v. 26, n. 4, p. 787–802, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2010.00387.x>>. Acesso em: 3/11/2014.

YELLON, S. M.; TRAN, L. T. Photoperiod, Reproduction, and Immunity in Select Strains of Inbred Mice. **Journal of Biological Rhythms**, v. 17, n. 1, p. 65–75, 2002. Disponível em: <<http://jbr.sagepub.com/content/17/1/65.short>>. Acesso em: 25 nov. 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou a possibilidade de extração e dosagem de esteroides sexuais em amostras de gordura de carcaças e biópsias de baleia jubarte. A progesterona, testosterona e estradiol puderam ser dosados em todas as amostras.

Dada a grande disponibilidade de material advindo de carcaças de jubarte no Brasil, não só a colheita da gordura, mas fatores que podem alterar as dosagens tais como o estado de decomposição da carcaça, o local e profundidade de colheita, e o tamanho da amostra foram avaliados no presente estudo. Estes quatro fatores podem modificar o resultado final de uma dosagem. A situação ideal é que se colha gordura de animal fresco, da camada média ou interna, em tamanho padronizado. Deve-se evitar a nadadeira dorsal, pois esta apresentou níveis mais elevados de testosterona que os demais locais do corpo. Quando a padronização dos tamanhos das amostras colhidas tanto por biópsias como em carcaças não for possível, sugere-se uma correção dos valores das dosagens através de fatores de correção estimados para cada conjunto de amostras, pois amostras com tamanho de 25 – 50 mg apresentaram níveis de hormônio significativamente mais elevados que as demais classes de tamanho.

A relação entre as unidades de concentração de hormônio testadas - ng/g de gordura e ng/mg de lipídio extraído - sofre maiores variações em amostras de carcaças que amostras de biópsias. Muito provavelmente, a uniformidade de colheita e armazenamento de amostras de biópsias anula o efeito deletério que amostras de carcaças possam vir a sofrer como ressecamento e decomposição.

A dosagem hormonal feita em amostras de gordura colhidas por biópsias possibilitou uma série comparações entre indivíduos em estados reprodutivos distintos. Como esperado, fêmeas apresentaram níveis mais elevados de progesterona e estradiol que machos. Da mesma maneira, machos apresentaram níveis mais elevados de testosterona que fêmeas. Foi demonstrado o intervalo de confiança para cada classe e gênero, valores que podem servir de referência em futuros estudos. Também foi observada uma sazonalidade reprodutiva com níveis mais elevados de testosterona em machos na área de reprodução, em especial os meses de setembro e outubro. Este achado corrobora com a hipótese de machos em período

reprodutivo possuem níveis mais elevados de testosterona que fora do mesmo. Algumas fêmeas com filhotes e fêmeas adultas apresentaram nível de progesterona pelo menos seis vezes mais elevado que o restante dos animais. Picos de P4 foram estabelecidos pelo valor da média (7,71 ng/g) de todos os animais mais duas vezes o desvio-padrão (19,58), e sugere um estado de prenhez. O nível mais elevado de P4 foi de uma fêmea adulta (158 ng/g).

A dosagem de hormônio, quando combinada com informações sobre história de vida e comprimento corporal dos animais, demonstrou a potencial combinação de diferentes estudos para obtenção de informações robustas e complementares entre si. O comprimento corporal de alguns animais biopsados pôde ser estimado por meio da fotogrametria. A menor fêmea acompanhada de filhote mediu 10.21 metros. Macho e fêmeas não apresentaram diferença significativa entre os comprimentos corporais, 12.96 e 12.04, respectivamente. Os animais de recaptura, e/ou que tiveram o comprimento corporal determinado, apresentaram níveis hormonais dentro do esperado para o sexo e classe etária correspondente. Finalmente, o fotoperíodo apresentou-se como mais um elemento com potencial a ser combinado no estudo da reprodução e sazonalidade de baleias jubarte. Um n amostral adequado permite uma análise de correlação entre a duração das fases claras e escuras com a dosagem de esteroides sexuais de animais em áreas de alimentação e reprodução ao longo dos meses.

O tecido adiposo mostrou-se como uma matriz bastante viável para dosagens de esteroides sexuais e estudos acerca da fisiologia reprodutiva de baleias de vida livre. Pode ainda indicar variações sazonais, estados de prenhez, picos de testosterona em machos e diferenças entre machos e fêmeas. Quando a dosagem de hormônios é combinada com outras informações como tamanho do comprimento corporal e história de vida, pode promover informações ainda mais robustas acerca de uma população. Estudos visando aumentar o esforço de amostragem em área de alimentação devem ser conduzidos futuramente para melhor demonstração das variações sazonais, e proporcionar análises de correlação entre fotoperíodo e níveis de esteroides sexuais.

O presente trabalho apresentou um testemunho histórico acerca do perfil hormonal da espécie. Esses dados servirão como base para futuros estudos comparativos das mesmas populações ao longo do tempo no sentido de se avaliar possíveis influências de variações ambientais, tais como: flutuações nas médias das temperaturas e condições climáticas

estacionais ao longo dos anos, flutuações na densidade populacional, na oferta de alimentos e outros eventuais fatores ambientais.

REFERÊNCIAS

- AGLER, B.; SCHOOLEY, R.; FROHOCK, S.; KATONA, S. K.; SEIPT, I. Reproduction of photographically identified fin whales, *Balaenoptera physalus*, from the Gulf of Maine. **Journal of Mammalogy**, v. 74, n. 3, p. 577–587, 1993. Disponível em: <<http://jmmammal.oxfordjournals.org/content/74/3/577.abstract>>. Acesso em: 7/4/2015.
- ATKINSON, S.; ST. AUBIN, D. J.; ORTIZ, R. M. Endocrine Systems. In: PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (Ed.). San Diego, California. **Encyclopedia of Marine Mammals**. 2nd ed. Academic Press. p.375–382, 2009.
- BROWN, M. R.; CORKERON, P. J.; HALE, P. T.; SCHULTZ, K. W.; BRYDEN, M. M. Evidence for a sex-segregated migration in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). **Proceedings Biological Sciences / The Royal Society**, v. 259, n. 1355, p. 229–34, 1995. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/259/1355/229.short>>. Acesso em: 6 nov. 2014.
- CHITTLEBOROUGH, R. Studies on the Ovaries of the Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre), on the Western Australian Coast. **Marine and Freshwater Research**, v. 5, n. 1, p. 35, 1954.
- CHITTLEBOROUGH, R. Aspects of Reproduction in the Male Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre). **Marine and Freshwater Research**, v. 6, n. 1, p. 1, 1955a. CSIRO PUBLISHING. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=126&f=MF9550001>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- CHITTLEBOROUGH, R. Puberty, Physical Maturity, and Relative Growth of the Female Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre), on the Western Australian Coast. **Marine and Freshwater Research**, v. 6, n. 3, p. 315, 1955b. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=MF9550315>>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- CHITTLEBOROUGH, R. The Breeding Cycle of the Female Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre). **Marine and Freshwater Research**, v. 9, n. 1, p. 1, 1958. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=126&f=MF9580001>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- CHITTLEBOROUGH, R. Determination of Age in the Humpback Whale, *Megaptera nodosa* (Bonnaterre). **Marine and Freshwater Research**, v. 10, n. 2, p. 125, 1959. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=MF9590125>>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- CHITTLEBOROUGH, R. Dynamics of two populations of the humpback whale, *Megaptera novaeangliae* (Borowski). **Marine and Freshwater Research**, v. 16, n. 1, p. 33, 1965. CSIRO PUBLISHING. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=126&f=MF9650033>. Acesso em: 23 nov. 2014.

CLAPHAM, P. J. Age at attainment of sexual maturity in humpback whales, *Megaptera novaeangliae*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, n. 7, p. 1470–1472, 1992.

CLAPHAM, P. J. Humpback whale. In: PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (ed.). **Encyclopedia of Marine Mammals**. San Diego, California: Academic Press, 2009. p.589–592.

CLAPHAM, P. J.; LEATHERWOOD, S.; SZCZEPANIAK, I.; BROWNELL, R. L. Catches of humpback and other whales from shore stations at Moss Landing and Trinidad, California, 1919–1926. **Marine Mammal Science**, v. 13, n. 3, p. 368–394, 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.1997.tb00646.x>>.

CLAPHAM, P. J.; MAYO, C. A. Reproduction and recruitment of individually identified humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, observed in Massachusetts Bay, 1979–1985. **Canadian Journal of Zoology**, v. 65, n. 12, p. 2853–2863, 1987. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/z87-434>>. Acesso em: 2/8/2011.

CRAIG, A.; HERMAN, L. Habitat preferences of female humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Hawaiian Islands are associated with reproductive status. **Marine Ecology Progress Series**, v. 193, p. 209–216, 2000

CRAIG, A. S.; HERMAN, L. M.; GABRIELE, C. M.; PACK, A. A.; MOBLEY, J.; PERRY, A.; POLEHN, N.; REIF, S. L.; SPITZ, S. Migratory timing of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the central north pacific varies with age, sex and reproductive status. **Behaviour**, v. 140, n. 8, p. 981–1001, 2003.

DAWBIN, W. H. The Seasonal Migratory Cycle of Humpback Whales. In: K. Norris (Ed.); **Whales, Dolphins, and Porpoises**. p.145–169, 1966. University of California Press. Disponível em: <<http://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=x-iptRSGHIQC&pgis=1>>. Acesso em: 23 nov. 2014.

DESLYPERE, J. P.; VERDONCK, L.; VERMEULEN, A. Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 61, n. 3, p. 564–70, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3160722>>. Acesso em: 23 nov. 2014.

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

HERMAN, D.; BURROWS, D.; WADE, P.; DURBAN, J.W.; MATKIN, C.O.; LEDUC, R.G.; BARRETT-LENNARD, L.G. Feeding ecology of eastern North Pacific killer whales *Orcinus orca* from fatty acid, stable isotope, and organochlorine analyses of blubber biopsies. **Marine Ecology Progress Series**, v. 302, p. 275–291, 2005.

HOBBS, K. PCBs and organochlorine pesticides in blubber biopsies from free-ranging St. Lawrence River Estuary beluga whales (*Delphinapterus leucas*), 1994–1998. **Environmental Pollution**, v. 122, n. 2, p. 291–302, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749102002889>>. Acesso em: 24 jan. 2013.

JAQUET, N. a Simple Photogrammetric Technique To Measure Sperm Whales At Sea. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 4, p. 862–879, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2006.00060.x>>. Acesso em: 26 jun. 2011.

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

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; CHIVERS, S. J.; ARCHER, F. I. 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**, v. 160, n. 12, p. 3113–3124, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00227-013-2299-0>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; MARKS, C. I.; CHIVERS, S. J.; DANIL, K; ARCHER, F. I. Blubber testosterone: A potential marker of male reproductive status in short-beaked common dolphins. **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 3, p. 507–522, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2009.00291.x>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

KELLAR, N.; TREGO, M. Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-7692.2006.00001.x/full>>. Acesso em: 6 out. 2014.

KELLAR, N.; TREGO, M.; CHIVERS, S. 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**, v. 113, n. 2, p. 58–80, 2014. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.3160/0038-3872-113.2.58>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

KRÜTZEN, M.; BARRÉ, L.; Moller, L. M.; Heithaus, M. R.; Simms, C.; Sherwin, W. B. A biopsy system for small cetaceans: Darting success and wound healing in *Tursiops* spp. **Marine Mammal Science**, v. 18, n.4, p. 863–878, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01078.x/abstract>>. Acesso em: 9 nov. 2014.

LOCKYER, C. Investigation of the ear plug of the southern sei whale, *Balaenoptera borealis*, as a valid means of determining age. **ICES Journal of Marine Science**, v. 36, n. 1, p. 71–81, 1974.

MANSOUR, ATEF A. H.; MKAY, DONALD W.; LIEN, JON; ORR, JAMES C.; BANOUB, J. H.; OIEN, N.; STENSON, G. Determination of Pregnancy Status From Blubber Samples in Minke Whales (*Balaenoptera Acutorostrata*). **Marine Mammal Science**, v. 18, n. 1, p. 112–120, 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01022.x>>. Acesso em: 2 ago. 2011.

MARTINS, C. C. A.; ANDRIOLO, A.; ENGEL, M. H.; KINAS, P. G.; SAITO, C. H. Identifying priority areas for humpback whale conservation at Eastern Brazilian Coast. **Ocean & Coastal Management**, v. 75, p. 63–71, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964569113000318>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

MURACO, H.; CLOUGH, P.; TEETS, V.; ARN, D.; MURACO, M. Ovarian Follicular Dynamics During the Luteinizing Hormone Surge in the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, n. 4, p. 723–733, 2010. Disponível em: <<https://escholarship.org/uc/item/20v148zt>>. Acesso em: 8 nov. 2014.

PALSBØLL, P. J.; ALLEN, J.; BÉRUBÉ, M.; CLAPHAM, P. J.; FEDDERSEN, T. P.; HAMMOND, P. S.; HUDSON, R. R.; JØRGENSEN, H.; KATONA, S.; LARSEN, A. H.; LARSEN, F.; LIEN, J.; MATTILA, D. K.; SIGURJÓNSSON, J.; SEARS, R.; SMITH, T.; SPONER, R.; STEVICK, P.; OIEN, N. Genetic tagging of humpback whales. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 767–9, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285587>>. .

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

PERRYMAN, W. L.; LYNN, M. S. Evaluation of nutritive condition and reproductive status of migrating gray whales (*Eschrichtius robustus*) based on analysis of photogrammetric data. **Journal of Cetacean Research Management**, v. 4, n. 2, p. 155–164, 2002.

RASMUSSEN, K.; PALACIOS, D. M.; CALAMBOKIDIS, J.; SABORÍO, M. T.; DALLA ROSA, L.; SECCHI, E. R.; STEIGER, G. H.; ALLEN, J. M.; STONE, G. S. Southern Hemisphere humpback whales wintering off Central America: insights from water temperature into the longest mammalian migration. **Biology Letters**, v. 3, n. 3, p. 302–5, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2390682&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 nov. 2012.

ROBECK, T. R.; ATKINSON, S. K. C.; BROOK, F. Reproduction. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. **CRC handbook of marine mammal medicine**. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2001. p.193–236,.

ROLLAND, R. M.; HUNT, K. E.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 308–17, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648005000365>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

SOUSA-LIMA, R. S.; GROCH, K. R. Correlation between body length and fluke width in humpback whales, Megaptera novaeangliae. **Marine Mammal Science**, v. 26, n. 4, p. 977–981, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2010.00373.x>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

SPITZ, S. S.; HERMAN, L. M.; PACK, A. A. Measuring sizes of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) by underwater videogrammetry. **Marine Mammal Science**, v. 16, n. 3, p. 664–676, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2000.tb00962.x>>. Acesso em: 7/4/2015.

ST AUBIN, D. J. Endocrinology. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Eds). **CRC handbook of marine mammal medicine: mealth, disease, and rehabilitation**. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press. 2001. p.165–187.

STEVICK, P. T. Age-Length Relationships in Humpback Whales: a Comparison of Strandings in the Western North Atlantic With Commercial Catches. **Marine Mammal Science**, v. 15, n. 3, p. 725–737, 1999.

STEVICK, P. T.; ALLEN, J.; BÉRUBÉ, M.; CLAPHAM, P. J.; KATONA, S. K.; LARSEN, F.; LIEN, J.; MATTILA, D. K.; PALSBOËLL, P. J.; ROBBINS, J.; SIGURJÓNSSON, J.; SMITH, T. D.; ØIEN, N.; HAMMOND, P. S. Segregation of migration by feeding ground origin in North Atlantic humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). **Journal of Zoology**, v. 259, n. 03, p. 231–237, 2003. Cambridge University Press. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S0952836902003151>. Acesso em: 14 nov. 2014.

TREGO, M. L.; KELLAR, N. M.; DANIL, K. Validation of blubber progesterone concentrations for pregnancy determination in three dolphin species and a porpoise. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69709, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3728358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 mar. 2014.

TROUT, G. J. Comment on “Determination of testosterone in saliva and blow of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using liquid chromatography-mass spectrometry”. **Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 863, n. 1, p. 192–3, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023208000032>>. Acesso em: 8 nov. 2014.

WATERS, S.; WHITEHEAD, H. Population and growth parameters of Galapagos sperm whales estimated from length distributions. **Report International Whaling Commission**, v. 40, p. 225-235, 1990.

WEST, K. L.; ATKINSON, S.; CARMICHAEL, M. J.; SWEENEY, J. C.; KRAMES, B.; KRAMES, J. Concentrations of progesterone in milk from bottlenose dolphins during different reproductive states. **General and Comparative Endocrinology**, v. 117, n. 2, p. 218–24, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648000974045>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

WOODWARD, B. L.; WINN, J. P.; FISH, F. E. Morphological specializations of baleen whales associated with hydrodynamic performance and ecological niche. **Journal of morphology**, v. 267, n. 11, p. 1284–94, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051544>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

APENDICE

BIOLOGICAL MATRICES FOR SAMPLING FREE-RANGING CETACEANS AND THE IMPLICATIONS OF THEIR USE FOR REPRODUCTIVE ENDOCRINE MONITORING

CETACEAN ENDOCRINE MONITORING

Key words: biological matrix, cetacean, endocrinology, free-ranging, hormones, reproduction

ABSTRACT

1. The monitoring of reproductive rates in wild cetaceans is crucial for the adequate management of their populations. Their reproductive hormone profiles can be of significant importance, especially when combined with behavioral or life history monitoring. Obtaining feasible biological matrices for wild, free-ranging cetaceans is not always a simple task.
2. The purposes of this review are to briefly describe different methods for monitoring the reproductive endocrine parameters of wild and captive cetaceans and to evaluate the feasibility of using different matrices—blood, urine, feces, saliva, bubbler, muscle, ocular secretions, blow, milk, baleen and earplug materials—to measure sex hormones in free-ranging cetaceans.
3. We performed a retrospective analysis of the measurement and sample collection methods and the most commonly used matrices for constructing reproductive hormone profiles. The PubMed and Google Scholar databases were used, and scientific articles and book chapters published from 1980 to the present were considered.
4. In the past, the most commonly used matrix for measuring the hormones of free-ranging cetaceans was blood. This trend has been changing recently because of the mortality associated with the collection of blood from great whales. Matrices such as blow, which can be obtained noninvasively, and others such as blubber, which require only moderately invasive methods, appear to be feasible options for monitoring the hormones of live, free-ranging cetaceans.

1. INTRODUCTION

Knowledge regarding the reproductive parameters of wild populations is critical for developing conservation strategies (KERLEY; GOODRICH, 2003). However, data on the life history and general reproductive biology of free-ranging marine mammals are still limited for the majority of populations worldwide. The study of cetacean reproduction in the wild involves certain special difficulties, such as costly field trips and the frequent impossibility of collecting the samples necessary to obtain hormone profiles. Such traits as the great maneuverability of cetaceans and the gregarious behavior of most species as well as the ocean environment itself often make the collection of samples impossible, and consequently, alternative sampling may be required to acquire certain information regarding their reproductive status.

For instance, most of the current understanding of marine mammal reproductive physiology is based on the observation of captive individuals or the histological examination of gonads and reproductive tracts from bycatch, harvested or stranded animals (NEUENHAGEN; GARCIAHARTMANN; GREVEN, 2007). Though very valuable, these sample sets are frequently biased, with one or more demographic groups either over- or underrepresented (WEBER ROSAS; MONTEIRO-FILHO; ROSAS, 2002; THAYER et al., 2003; FERREIRA et al., 2014;).

A combination of several techniques might be necessary to properly approach the general life history and reproductive parameters of free-ranging populations; such techniques might include photo-identification, satellite tagging and the use of radio transmitters (CLAPHAM; MAYO, 1987; LOSETO et al., 2006; MARTIN; DA SILVA; ROTHERY, 2006). The studies assessing reproductive parameters in wild cetacean populations via photo-identification generally last for long periods, and individually identified animals must be closely followed over many years in a particular area to provide reliable information (THAYER et al., 2003; BARLOW; Clapham, 1997). Allometric measurements made from aerial photographs can also be used to accurately differentiate pregnancy status in gray whales (PERRYMAN; LYNN, 2002). However, this methodology is effective only for midterm to late-term pregnancies when the girth-to-length ratio of pregnant females is much greater than that of nonpregnant ones.

Sex hormone measurement is a well-established tool for evaluating the endocrine activity of wildlife (SCHWARZENBERGER; BROWN, 2013). The vast majority of studies describing hormone profiles from live cetaceans were performed on captive animals; the

logistics involved in accessing these animals are less challenging than those required in the wild. Though the manipulation of captive dolphins can cause some stress to the animals, many studies show that the benefits of using such techniques outweigh the distress that is created. Moreover, most of these animals are trained to voluntarily present themselves for sample collection, significantly minimizing the stress (LAULE, 2003). Such manipulations can be advantageous from the perspective of applying assisted reproductive technologies in captivity, with fewer animals being captured to supply private aquariums, and acquiring baseline information regarding the development of biotechnologies and hormonal therapy that might be used on a population belonging to a threatened species (MORISAKA et al., 2010; O'BRIEN; ROBECK, 2010; CURRY; RALLS; BROWNELL, 2013).

However, studies on wild cetacean reproductive endocrinology face difficulties that include following the animals in the sea, identifying the individual animals, accessing the matrices commonly used for hormonal measurement in captive cetaceans and tracking reproductive cycles. Currently, few research groups successfully work on capturing, manipulating, sampling and releasing wild cetaceans (HALL et al., 2007; MARTIN; SILVA, 2004). The growing interest in investigating the endocrine dynamics of free-ranging cetaceans has led marine mammal researchers to test novel matrices that may be feasibly used for the reproductive monitoring of wild cetaceans. Until now, the most commonly used matrix to measure sex hormones in free-ranging cetaceans was blood (Figure 1). The collection of blood from great whales causes mortality and conflicts with the goal of species conservation. Lately, other matrices, such as blow and blubber, have been successfully used in determining the steroid profiles of these animals (Figure 1).

Given the importance of endocrine monitoring in wild species, the subject was reviewed by different researchers relying on different perspectives. Schwarzenberger and Brown (2013) present the use of hormone monitoring in several terrestrial mammalian species and examine the relative suitability of the different biological matrices in specific situations. Advanced reproductive biotechnologies and assisted reproductive techniques were previously described by Andrabi e Maxwell (2007) in conservation programs for endangered mammalian species. Amaral (2010) discussed the use of noninvasive endocrine monitoring for a variety of captive species and wild aquatic mammals. Hunt et al. (2013) presented a set of nonlethal and minimally invasive techniques to gather information on the physiology of large whales, including methods for conducting a reproductive status assessment.

The present review aims to briefly describe different methods for studying the reproductive hormones of free-ranging cetaceans and to specifically consider the advantages and limitations of using a set of biological matrices, such as blood, feces, urine, blow, blubber, ocular secretions, earplug materials and baleen, in this diverse group of animals. Many of the studies cited here use more than one matrix sampled from the same animal to validate the accuracy of the matrices for measuring hormones (e.g., blood and saliva; blood and urine; and blood, saliva and ocular secretions) (ATKINSON et al., 1999; KJELD 2001; KELLAR et al., 2013). We hope this review can provide not only basic information on cetacean hormone measurements but also guidance useful to marine mammal researchers for choosing the most suitable technique and biological matrices according to the species studied in the field. Tables 1–4 list the articles discussed here and describe the matrix assay used in each study.

The database used was searched at PubMed and Google Scholar; scientific articles and book chapters from 1980 to the present were considered.

Figure 1. Matrices used from 1980 to the present to measure reproductive hormones in free-ranging cetaceans.

2. BIOLOGICAL MATRICES

2.1 Blood

Hormone measurements on blood have been by far the most frequently used method for endocrine monitoring in captive cetaceans (figure 1). The first studies on the reproductive endocrinology of captive dolphins date from 1980 (SAWYER-STEFFAN; KIRBY, 1980). Currently, certain species, such as the bottlenose dolphin (*Tursiops* spp.) (CORNELL et al., 1987; SCHROEDER; KELLER, 1989; OWEN, 1990), the killer whale (*Orcinus orca*) (DUFFIELD et al., 1995), the false killer whale (*Pseudorca crassidens*) (ATKINSON et al., 1999), belugas (ROBECK et al., 2005a) and the Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*) have been well studied (O'BRIEN et al., 2008; ROBECK et al., 2009). Baseline values for progesterone, testosterone and estradiol were determined for most of these species. Nonsteroidal hormones, such as luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), have also been described in a variety of captive cetaceans (SCHNEYER; CASTRO; ODELL, 1985; HAO et al., 2007; MURACO et al., 2009). These authors were able to determine a large set of baseline physiological parameters, such as age, length and weight of males and females at reproductive maturity, seasonality, estrous cycle and pregnancy characteristics. Many of these parameters can be used to properly access and interpret hormone measurements in capture-release programs, and vice versa (SCHNEYER; CASTRO; ODELL, 1985; CURRY; RALLS; BROWNELL, 2013; SCHWACKE et al., 2014).

Few studies have been performed with the great whales because of the mortality associated with blood collection. Seasonality was observed in 63 male southern minke whales investigated in the Antarctic Ocean, where decreases in testicular weight, epididymal weight, and testicular volume were found in February; during the same period, plasma testosterone concentration also declined (MOGOE et al., 2000). In northern hemisphere waters, testosterone and progesterone were measured from the serum of 104 females and 83 North Atlantic minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) caught for scientific purposes. Higher levels of progesterone obviously distinguished the pregnant from nonpregnant females (KJELD et al., 2004). Using similar methods, (KJELD et al., 2006) clearly noted elevated progesterone levels in pregnant minke whales and a positive association between serum testosterone and the size of testicles from adult males. Variations in serum testosterone and progesterone with age and reproductive status were described for minke, sei (*Balaenoptera*

borealis), Bryde's (*Balaenoptera edeni*) and sperm whales (*Physeter macrocephalus*) (BIRUKAWA et al., 2005). Recently, progesterone was measured in the serum of subsistence-hunted bowhead whales taken between 1999 and 2009, and the measurements revealed significantly higher progesterone levels in pregnant females (KELLAR et al., 2013).

Opportunistic studies on the hormone levels of wild odontocetes have also been performed on subsistence-harvested whales or the incidental catch by fisheries. Pilot whales are harvested off the Faroe Islands for subsistence purposes in a direct, noncommercial and opportunistic hunt (DESPORTES; SABOUREAU; LACROIX, 1994a). A study involving these animals showed plasma testosterone concentrations at very low values ($< 2 \text{ ng ml}^{-1}$) in immature animals (testis mass $< 0.2 \text{ kg}$), followed by a sharp increase (from 2 to 29 ng ml^{-1}) during the pubertal period, and the maintenance of high concentrations with large variability ($> 1.5 \text{ ng ml}^{-1}$ to 14 ng ml^{-1}) in mature males. The testosterone concentrations were significantly correlated with testis mass ($P < 0.001$) but not with body length or age (DESPORTES; SABOUREAU; LACROIX, 1994b). Another study that was undertaken to describe the serum levels of progesterone in incidentally killed, female Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*) and the association of progesterone with late pregnancy and lactation proved to be a valuable source of information on the reproductive cycles of these animals, even using blood collected 2–16 hours after death (TEMTE; SPIELVOGEL, 1985).

Few studies have been successfully conducted on living wild dolphins. Progesterone, estradiol and testosterone, among many other constituents of blood, were measured in 72 wild pantropical spotted dolphins (*Stenella attenuata*) as the dolphins were chased and encircled by a tuna purse seiner. One female dolphin had an elevated progesterone level of 18 ng/ml , typical of pregnancy (ST. AUBIN et al., 2013).

The primary advantage of using blood is that it reflects the immediate reproductive state or the momentary levels of hormones at the time of collection. Another important advantage is that the hormone is directly measured, not its metabolites, as occurs when using other matrices such as urine and feces. Although the capture and release of free-ranging animals can provide very accurate hormonal data, many prerequisites exist that limit the application of this methodology, including favorable geographical sites (shallow and calm waters), a large and very well trained research team to capture and restrain the animals, often expensive logistics and the risk of dolphin death by drowning or stress (all of which are limitations of the use of this matrix in free-ranging cetaceans).

Table 1- Measurement of reproductive hormones in the blood of live and dead cetaceans. O signifies odontocete, M is mysticete, SP is scientific purpose, P is progesterone, E is estradiol, T is testosterone, LH is luteinizing hormone, FSH is follicle-stimulating hormone, RIA is radioimmunoassay, EIA is enzyme immunoassay, IFA is immunofluorescence assay and CLA is chemiluminescence immunoassay.

		Matrix	Condition	Habitat	Hormone	Assay	Reference
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P, E	RIA	SAWYER-STEFFAN et al. 1983
<i>Phocoenoides dalli</i>	O	Blood	Alive		P	RIA	TEMTE; SPIELVOGEL, 1985
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Wild + captive	LH, FSH		SCHNEYER et al. 1985
<i>Tursiops truncatus</i>	O		Alive	Captive	P, E, LH		YOSHIOKA et al. 1986
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	RIA	CORNELL et al., 1987
<i>Orcinus orca</i>	O	Blood		Captive	P	RIA	WALKER et al. 1988
<i>Stenella coeruleoalba</i> <i>Globicephala macrorhynchus</i>	O O	Blood	Fishery bycatch	Wild	P	RIA	YOSHIOKA et al. 1989
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	RIA	SCHROEDER; KELLER, 1989
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	EIA + RIA	OWEN, 1990
<i>Phocoenoides dalli</i>	O	Blood	Alive	Captive	P, T	RIA	TEMTE, 1991
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	M	Blood		Wild	P	RIA	YOSHIOKA and FUJISE 1992
<i>Balaenoptera physalus</i>	M	Blood	Harvest	Wild	P, T	RIA	KJELD et al. 1992
<i>Globicephala melas</i>	O	Blood	Hunt		T	RIA	DESPORTES et al. 1994
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	??	??	ROBECK et al. 1994
<i>Orcinus orca</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	??	DUFFIELD et al. 1995
<i>Tursiops truncatus</i> <i>Delphinus delphis</i>	O O	Blood	Alive	Captive	P	RIA	MOORE; RIDGWAY, 1996
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	M	Blood	??	Wild	P, T, E	??	FUKUI et al., 1996
<i>Neophocaena phocaenoides</i>	O	Blood	Alive	Captive	P, T	??	DAOQUAN et a. 1997
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P, E	RIA	ROBECK et al. 1998

<i>Pseudorca crassidens</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	RIA	ATKINSON et al., 1999
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	M	Blood	Hunt	Wild	LH, E, T	EIA	MOGOE et al., 2000
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	RIA	WEST et al., 2000
<i>Sousa chinensis</i>	O	Blood		Captive	P, E	RIA + CLA	BROOK et al. 2004
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	M	Blood	Hunt - SP	Wild	P,T	RIA	KJELD et al., 2004
<i>Balaenoptera bonaerensis</i>	M	Blood	Hunt - SP	Wild	P, E, A, FSH, LH	EIA	MURANISHI et al., 2004
<i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera edeni</i>	M M	Blood	Hunt - SP	Wild	T, E, LH, FSH	EIA	WATANABE et al., 2004
<i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Balaenoptera borealis</i> <i>Balaenoptera edeni</i> <i>Physeter macrocephalus</i>	M M M O	Blood	Hunt - SP	Wild	P, T, E	EIA	BIRUKAWA et al., 2005
<i>Delphinapterus leucas</i>	O	Blood	Alive	Captive	P, T	RIA	ROBECK et al., 2005
<i>Balaenoptera physalus</i>	M	Blood	Hunt	Wild	P, T	RIA	KJELD, et al. 2006
<i>Orcinus orca</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	RIA	ROBECK & MONFORT, 2006
<i>Orcinus orca</i>	O	Blood	Alive		P	RIA	KATSUMATA et al. 2006
<i>Neophocaena phocaenoides</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	RIA	DAOQUAN et al. 2006
<i>Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis</i>	O	Blood	Capture-release	Wild	P, T, E, LH, FSH	RIA	HAO et al. 2007
<i>Delphinapterus leucas</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	?	O'BRIEN et al. 2008
<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	?	ROBECK et al., 2009

<i>Tursiops truncatus</i>		Blood	Alive	Captive	P, E, LH	RIA	MURACO et al., 2009
<i>Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	EIA	WU et al., 2010a
<i>Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	RIA	WU et al., 2010b
<i>Lipotes vexillifer</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	RIA	HUILIN et al. 2010
<i>Delphinapterus leucas</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Tursiops truncatus</i>	O O O	Blood	Alive	Captive	P	RIA	KATSUMATA, 2010
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	RIA	TIZZI et al.2010
<i>Delphinapterus leucas</i>	O	Blood	Alive	Captive	P, E	EIA + IFA	ROBECK et al., 2010
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	EIA	FUNASAKA, 2011
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	RIA	BERGFELT et al., 2011
<i>Delphinapterus leucas</i>	O	Blood	Alive	Captive	T	RIA	KATSUMATA et al., 2012
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	?	ROBECK et al., 2012
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Alive	Captive	P	EIA + CLA	O'BRIEN & ROBECK, 2012
<i>Phocoena phocoena</i>	O	Blood	Alive	Captive	P, T, E	EIA	DESPORTES et al., 2013
<i>Stenella attenuata</i>	O	Blood	Capture-release	Wild	P, T, E	RIA	ST. AUBIN et al., 2013
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blood	Capture-release	Wild	P	RIA	BERGFELT et al., 2013
<i>Balaena mysticetus</i>	M	Blood	Subsistence hunt	Wild	P	EIA	KELLAR et al., 2013
<i>Phocoena phocoena</i>	O	Blood	Alive	Captive	P, T, E	EIA	DESPORTES et al., 2013

2.2 Urine

Urine is the second most frequently used matrix for the monitoring of reproductive hormones in cetaceans (Figure 1). This matrix is often collected from a cetacean rolled to one side on a partially submerged platform or lying on its back in the water by pressing its urogenital area while holding a sterile cup near the urogenital opening (ROBECK et al., 2009; WALKER et al., 1988). This procedure can be done much more easily with captive trained animals. Again, this type of analysis is only possible on medium to small species of cetaceans because of the need to manipulate the subjects. All steroid metabolites measured in the urine should be indexed by the creatinine concentration of the same urine sample (ROBECK et al., 2004, 2009).

By contrast with the collection of blood, the collection of urine for the measurement of steroid metabolites appears to be a noninvasive process and is thus more appropriate for longitudinal studies that involve periodic sampling to minimize the stress of restraining and handling the animals. The first study on urinary hormone metabolites and gonadotrophins in cetaceans was performed in aquaria at Sea World in 1988, when the reproductive hormone profiles (immunoreactive estrone conjugates, pregnanediol-3-glucuronide, 20-alpha-hydroxyprogesterone and FSH) of six captive killer whales were measured for 12–16 consecutive months (WALKER et al., 1988). Subsequently, a series of studies were successfully conducted on monitoring the hormone profiles of captive cetaceans, such as orcas (ROBECK et al., 1993, 2004), bottlenose dolphins (ROBECK et al., 2005; MURACO et al., 2009; MURACO et al., 2010) Pacific white-sided dolphins (*Lagenorhynchus obliquidens*) (ROBECK et al., 2009) and belugas (STEINMAN et al., 2012). The regular monitoring of urine steroid metabolites and gonadotrophins through voluntary sampling has led to the close observation of estrous cycles and the development of successful artificial breeding programs.

The use of this matrix is practical for captive cetaceans but is very limited for free-ranging species. No studies have been conducted on wild dolphins to date, although urine could be used as an effective tool for cetacean endocrine monitoring of populations that are closely followed and periodically captured, such as the bottlenose populations from Charleston, South Carolina (FAIR et al., 2006) or Sarasota Bay, Florida (HALL et al., 2007) or the Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) in Brazil (MARTIN; SILVA, 2004).

Table 2- Reproductive hormones collected from urine and feces of live and dead cetaceans. O signifies odontocete; M is mysticete; P is progesterone steroid metabolites; T is testosterone steroid metabolites; E is estradiol steroid metabolites; LH is luteinizing hormone; FSH is follicle-stimulating hormone; RIA is radioimmunoassay; EIA is enzyme immunoassay; HPLC is high-performance liquid chromatography; ECLIA is electrochemical luminescence immunoassay; ICG is immunochromatographic assay; and CLH is canine LH kit, a rapid semiquantitative LH assay.

		Matrix	Condition	Habitat	Hormone	Assay	Reference
<i>Orcinus orca</i>	O	Urine	Alive	Captive	P, E, FSH	HPLC + ??	WALKER et al., 1988
<i>Orcinus orca</i>	O	Urine	Alive	Captive	P, E, LH, FSH	RIA	ROBECK et al., 1993
<i>Orcinus orca</i>	O	Urine	Alive	Captive	P, E, LH	RIA + EIA	ROBECK et al., 2004
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Urine	Alive	Captive	P, E, LH	EIA	ROBECK et al., 2005
<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	O	Urine	Alive	Captive	P, E, LH	EIA	ROBECK et al., 2009
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Urine	Alive	Captive	P, E, LH	ECLIA + ICG	MURACO et al., 2009
<i>Delphinapterus leucas</i>	O	Urine	Alive	Captive	E, LH	EIA + ICG + CLH	ROBECK et al., 2010
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Urine	Alive	Captive	LH	ICG	MURACO et al. 2010
<i>Delphinapterus leucas</i>	O	Urine	Alive	Captive	P, E, LH	EIA + HPLC	STEINMAN et al. 2012
<i>Balaena mysticetus</i>	M	Urine	Subsistence hunt	Wild	P	EIA	KELLAR et al., 2013
<i>Eubalaena australis</i>	M	Feces	Alive	Wild	P, E, A	RIA	ROLLAND et al., 2005
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Feces	Alive	Captive	P, E	RIA	BIANCANI et al., 2009
<i>Orcinus orca</i>	O	Feces	Alive	Captive	P	HPLC + EIA	KUSUDA et al., 2011
<i>Eubalaena australis</i>	M	Feces	Alive	Wild	P, T, E	RIA	WADE et al., 2011

2.3 Feces

Another extremely useful matrix for the hormonal monitoring of wild animals is feces. Feces have largely been taken from zoo animals for long-term hormonal monitoring and the determination of estrous cycles. Because the collection of feces causes almost no stress to the animals, there is no interference with the final hormone values. Although this matrix is quite convenient from this perspective, feces have their own limitations in the wilderness, especially regarding aquatic mammals. First, feces can only be collected at feeding areas, so migrating whales could only be sampled during half of the year in areas close to the North Pole and the South Pole. Second, it is quite difficult to match samples with specific animals when classifying the samples by sex or age; however, genetic analysis has been applied in combination with fecal steroid analysis for identifying individual animals (HUNT et al., 2006; KALZ; JEWGENOW; FICKEL, 2006). The samples can be directly collected in water (ROLLAND et al., 2005) or by voluntary behavior when in captivity (BIANCANI et al., 2009).

A very well known right whale (*Eubalaena glacialis*) population in the Gulf of St. Lawrence allowed a consistent study regarding the validation of existing radioimmunoassay techniques to infer reproduction states by measuring estrogens, progestins, androgens, and their related metabolites in fecal samples. In this unique situation, researchers observed defecation by individually identified whales for 50% of the samples collected (25 fecal samples from females and 14 from males). The results from this study demonstrate that this noninvasive method can be used for the analysis of fecal hormone metabolite levels in combination with life history data from photographically identified whales; in addition, feces can be used to determine gender, detect pregnancy and lactation, and to assess age at sexual maturity in right whales and potentially other endangered whale populations (ROLLAND et al., 2005). This study can then be used as a hormone baseline to determine the reproductive status of right whales from other populations (WADE et al., 2011).

Similar to blubber, the concentration of fecal metabolites reflects the general pattern of serum hormone levels, with a lag time from hours to days. This duration is determined by the metabolic clearance rates and intestinal transit time of the fecal samples (AMARAL et al., 2009; PALME et al., 1996; WASSER et al., 2010).

Fecal samples were collected from captive, female bottlenose dolphins of different reproductive states, and although the authors were able to establish a threshold value of progesterone metabolite values to confirm the presence of an active corpus luteum, few additional conclusions were achieved (BIANCANI et al., 2009). Another study on a captive female killer whale demonstrated a visual trend for fecal progesterone profiles similar to that of plasma profiles; however, the authors could not show a reliable statistical correlation between the fecal and plasma progesterone concentrations (KUSUDA et al., 2011). The time course for the circulation of progesterone in blood to the fecal excretion of progesterone metabolites has not yet been reported in killer whales.

Despite the noninvasiveness of fecal sampling, the use of the fecal metabolites of sex hormones to monitor the reproductive status of wild cetaceans should most likely be considered with caution because most of the studies using captive animals were inconclusive. The exception to this caution is the very well known population of northern right whales in the Gulf of St. Lawrence.

2.4 Saliva

Few studies have used saliva as a primary medium for the endocrine monitoring of cetaceans. Although less invasive than blood, the technique is not commonly used because of the complexity of the validation processes. Because the samples of salivary secretions most likely contain varying amounts of seawater, the data require normalization by correcting hormone concentrations using the amount of total proteins present in each sample.

The collection of samples can be performed when captive, trained animals raise their head above water (ATKINSON et al., 1999). No correlation was found between the plasma and saliva progesterone concentrations in two adult, female false killer whales sampled for up to 3 years, and saliva is not recommended as a prime matrix for progesterone monitoring in this species (ATKINSON et al., 1999).

With the aim of developing a noninvasive technique for testosterone determination, the saliva of captive bottlenose dolphins was used as a matrix in a study with 4 adult males. Even though trends were observed in the saliva testosterone concentrations, with the two adults showing higher testosterone concentrations than those of the two subadults,

considerable variation occurred among the values (HOGG; VICKERS; ROGERS, 2005). This study was questioned/criticized because of the extremely high values of testosterone found in the saliva of the bottlenose dolphins and suggests that the analytical approach employed is inadequate to meet the criteria normally expected for methods measuring analytes such as testosterone in biological fluids (TROUT, 2008).

Although saliva has the important advantage of offering a noninvasive collection technique, other matrices (e.g., urine) should be considered first because the available alternatives present less variation in the results when analyzing sex hormones and are more easily validated. To date, no studies have been conducted with the saliva of wild cetaceans.

2.5 Blubber

Blubber appears to be a very good alternative matrix for sex hormone measurement, especially when investigating reproductive parameters in large whales, because of the impossibility of manipulating these animals to collect such matrices as blood, urine, and saliva, among others. Blubber can be collected from stranded or “hunted” whales or from live, free-ranging specimens via biopsy samples. Remote sampling is a nonlethal and practical alternative for assessing the reproductive status of free-ranging cetaceans. A biopsy sample usually contains skin and bubbler fragments and has been used in different studies on genetics (ROSENBAUM et al., 2000; KRÜTZEN; BARRÉ, 2002), contaminant analysis, trophic-level analysis using stable isotopes (HERMAN et al., 2005; KNOFF; HOHN; MACKO, 2008) and morphology (WAUGH et al., 2014).

Additionally, there is a growing interest in using this matrix in small cetaceans, and certain studies have been successfully conducted off the coast of California and in the Strait of Gibraltar, the Gulf of Cadiz and the eastern tropical Pacific (KELLAR; TREGO 2006; KELLAR et al., 2009; PÉREZ et al., 2011; KELLAR et al., 2013). The progesterone concentrations in blubber from caught, pregnant *Delphinus delphis* (132–415 ng/g, with a mean of 261 ng/g) could clearly be distinguished from those in the blubber of nonpregnant, mature females and immature specimens (0.92–48.2 ng/g, with a mean 15.2 ng/g). Similar dramatic differences were also found in two other species of dolphins (*L. borealis* and *L. obliquidens*) that were accidentally captured. These results were insensitive to various blubber sampling depths and anatomical sampling locations on the body, suggesting a relative

homogeneity of progesterone levels throughout the blubber (KELLAR; TREGO, 2006). Similarly, the mean progesterone levels from pregnant bottlenose dolphins were approximately 9 times higher than those from nonpregnant females ($n = 9$), with no overlap between these concentration in dolphins from the waters of the Strait of Gibraltar or the Gulf of Cadiz (PÉREZ et al., 2011).

Seasonality effects on testosterone levels were observed for 57 short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) that were killed in fisheries (adult males from California). The concentrations in these animals were much higher in the summer than in the fall and winter. Similarly, the data from 138 biopsied short-beaked dolphin males showed a pronounced elevation of blubber testosterone concentrations during the summer and early fall (KELLAR et al., 2009). Stranded dolphins and those taken in the bycatch also provided the opportunity to validate the use of blubber to diagnose pregnancy in four species of dolphins: *Delphinus capensis*, *Stenella attenuata*, *Stenella longirostris* and *Phocoenoides dalli*. Subsequently, studies on the pregnancy rates of pantropical spotted dolphins (*S. attenuata*) and common dolphins (*Delphinus* spp.) reaffirmed the feasibility of estimating the pregnancy rates of free-ranging dolphins through biopsy samples (KELLAR et al., 2009).

Regarding large cetaceans, a study that included the carcasses of minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) whose pregnancy status was determined anatomically showed a highly significant difference (almost 60-fold) between the blubber progesterone concentrations of pregnant females and those of nonpregnant females or males (MANSOUR et al., 2002). Recently, Kellar et al. (2013) reported the time lag of progesterone among the blood, urine and blubber of subsistence-hunted bowhead whales (*Balaena mysticetus*). This information clearly elucidated the hormone dynamics in these different matrices for a species of large whales. The blubber progesterone concentrations were reflected in blood and urine over longer periods (weeks to months) but not over shorter periods (hours to days). Again, the pregnancy status of bowhead whales was clearly determined by the blubber progesterone concentration.

Table 3 - Reproductive hormones in blubber collected from live and dead cetaceans. O signifies odontocete, M is mysticete, P is progesterone, T is testosterone, RIA is radioimmunoassay, and EIA is enzyme immunoassay.

		Matrix	Condition	Habitat	Hormone	Assay	Reference
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	M	Blubber	Harvest	Wild	P	RIA	MANSOUR et al., 2002
<i>Delphinus delphis</i> <i>Lagenorhynchus obliquidens</i> <i>Lissodelphis borealis</i>	O O O	Blubber	Bycatch	Wild	P	EIA	Kellar & Trego, 2006
<i>Delphinus delphis</i>	O	Blubber	Bycatch + stranding + biopsy	Wild	T	EIA	Kellar et al., 2009
<i>Tursiops truncatus</i> <i>Globicephala melas</i>	O O	Blubber	Alive	Wild	P	EIA	(PÉREZ et al., 2011)
<i>Delphinus capensis</i> <i>Stenella attenuata</i> <i>Stenella longirostris</i> <i>Phocoenoides dalli</i>	O O O O	Blubber	Bycatch + stranding	Wild	P	EIA	Trego et al. 2013
<i>Balaena mysticetus</i>	M	Blubber	Harvest	Wild	P	EIA	Kellar et al., 2013
<i>Stenella attenuata</i>	O	Blubber	Alive	Wild	P	EIA	Kellar et al., 2013
<i>Delphinus capensis</i> <i>Delphinus delphis</i>	O O	Blubber	Alive	Wild	P	EIA	N. Kellar et al., 2014

2.6 Muscle

The collection of this matrix is considered extremely invasive because the biopsies required to obtain muscle must relatively deeply penetrate the body of a whale or dolphin. There is just one study regarding this subject, which was research that was conducted under Japanese aegis in Antarctica and involved the postmortem collection of muscle tissue from female southern minke whales for progesterone measurement. The mean progesterone concentrations in the muscle as well as in serum from the same individuals were significantly higher in nine pregnant females than in nine immature whales, and there was no overlap between the two whale groups in the range of muscle progesterone concentrations (YOSHIOKA et al., 1994a).

Currently, no muscle biopsy technique for live whales has been developed, and the use of this matrix would be more applicable to dead, stranded whales and dolphins.

2.7 Ocular Secretions

The sampling of ocular secretions is only possible in captive, trained animals, unless the animals are restrained within the context of a capture-and-release program, such as Projeto Boto (MARTIN; SILVA, 2004) or the Sarasota Dolphin Research Program (HALL et al., 2007). To sample ocular secretions, the trained animals voluntarily present the side of their head out of the water as much as possible, and a gentle flow of distilled water is passed over each eye before sampling. Then, the mucus is aspirated from the eye region using a 5 ml syringe without a needle (ATKINSON et al., 1999).

Ocular secretions were used as the matrix to measure progesterone levels in one study with three captive, female false killer whales in Hawaii. Apparently, the measurement of hormone concentrations in this matrix is not reliable for endocrine monitoring because most of the values were below the detection limit. Moreover, no correlation was found between the progesterone concentrations in plasma and those in the ocular secretions (ATKINSON et al., 1999). Ocular secretions, among other matrices, were also collected while searching for the most suitable matrix for the longitudinal endocrine monitoring of progesterone, estrogen and testosterone in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*); however, no conclusive results have been published regarding this matrix (DESPORTES et al., 2013).

The sampling of ocular secretions from free-ranging cetaceans would only be possible through capture and restraint. Other suitable matrices, such as blood or urine, should be considered more plausible options despite their invasiveness because these matrices are easier to validate.

2.8 Blow

The measurement of hormone concentrations in the blow of cetaceans is a relatively recent technique first described by Hogg et al. (2005). Testosterone was successfully measured from the blow of captive bottlenose dolphins using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) techniques. Another study indicated a significant relationship between the progesterone concentrations in the blood and the blow of a female captive bottlenose dolphin housed in an Italian delphinarium (TIZZI; ACCORSI; AZZALI, 2010).

The blow of free-ranging whales was collected to measure the progesterone and testosterone levels of humpback whales summering in Australia. LC-MS was unable to detect the hormones in any of the samples, but progesterone was found in seven of thirty-five blow samples from humpback whales, and testosterone was found in four of 35 blow samples. The same study reported progesterone and testosterone in eight of 18 samples from northern right whales (HOGG et al., 2009). A recent study described a series of experiments to optimize blow collection and validate a cheaper and simpler technique—enzyme immunoassay (EIA)—used for the measurement of steroid hormones from whales (HUNT; ROLLAND; KRAUS, 2014). The EIA of whale blow is still being optimized but appears to be a promising technique because the assay is conducted on a noninvasively sampled matrix and can be applied to free-ranging whales. Note that there are numerous factors that must be considered while collecting whale blows; such factors include the Beaufort sea state (≤ 3), the wind speed (< 15 km) (HUNT; ROLLAND; KRAUS, 2014), and the boat driving experience of the crew, especially for faster species. The use of more advanced techniques, such as a metabolomics analysis of blow, has not yet led to the detection of sex hormones in captive dolphin breath (AKSENOV et al., 2014).

Table 4—Less commonly used matrices collected from live and dead cetaceans to measure reproductive hormones. O signifies odontocete, M is mysticete, P is progesterone, E is estradiol, T is testosterone, RIA is radioimmunoassay, EIA is enzyme immunoassay, LC-MS is liquid chromatography-mass spectrometry, and HPLC is high-performance liquid chromatography.

		Matrix	Condition	Habitat	Hormone	Assay	Reference
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blow	Alive	Captive	T	LC-MS	HOGG et al., 2005
<i>Megaptera novaeangliae</i> <i>Eubalaena glacialis</i>	M M	Blow	Alive	Wild	P, T	LC-MS	HOGG et al., 2009
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Blow	Alive	Captive	P	RIA	TIZZI; ACCORSI; AZZALI, 2010
<i>Eubalaena glacialis</i>	M	Blow	Alive	Wild	P, T, E	RIA + EIA	HUNT et al. 2014
<i>Pseudorca crassidens</i>	O	Saliva	Alive	Captive	P	RIA	ATKINSON et al., 1999
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Saliva	Alive	Captive	T	LC-MS	HOGG et al., 2005
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Milk	Alive	Captive	P	RIA	WEST et al., 2000
<i>Tursiops truncatus</i>	O	Milk	Alive	Captive	P	RIA	WEST et al., 2007
<i>Pseudorca crassidens</i>	O	Ocular secretion	Alive	Captive	P	RIA	ATKINSON et al., 1999
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	M	Muscle	??	Wild	P	HPLC + RIA	YOSHIOKA et al., 1994
<i>Balaena mysticetus</i>	M	Baleen	Subsistence harvest	Wild	P	EIA	HUNT et al., 2014
<i>Balaenoptera musculus</i>	M	Earplug	Ship strike	Wild	T	EIA	TRUMBLE et al., 2013

2.9 Milk

Milk has proven to be a reliable source of information regarding the progesterone levels of cetaceans, although not many researchers use milk as their primary choice of matrix. The first relevant study found a positive correlation between the progesterone levels of serum and milk in four captive, female bottlenose dolphins. Therefore, milk could be safely used in dolphins to measure reproductive variables, such as the length of the follicular and luteal phases, the number of ovulations per year, and especially the occurrence of pregnancy (WEST et al., 2000). Similar results regarding hormone profiles were found seven years later when analyzing the effect of lactation stage and concurrent pregnancy on milk composition in the bottlenose dolphin (WEST et al., 2007).

Information gained from the assay of milk for progesterone may serve to prevent undesirable pregnancies in unhealthy animals or in facilities facing problems with overcrowding, thereby enhancing the level of care available (WEST et al., 2000). One important drawback of this matrix is the limitation of its use to adult lactating female cetaceans. Research on free-ranging cetaceans or on steroid hormones other than progesterone in milk has not yet been performed. Again, the necessity of capture and restraint for the collection of milk limits the use of this matrix to smaller species.

2.10 Earplug

A recent study showed that the measurement of hormones in the earplugs of blue whales (*Balaenoptera musculus*) is a very promising technique. This technique can provide robust information concerning the life history of individuals because cortisol, reproductive hormones, organic contaminants and mercury can be accessed from a single matrix. The sexual maturity of an adult male could also be detected by testosterone levels, which increased by two levels of magnitude when the whale was approximately 10 years old (TRUMBLE et al., 2013). The greatest limitation on using earplugs to analyze hormone profiles is the necessity of harvesting them from dead animals.

2.11 Baleen

Another matrix recently used for hormonal measurement was the baleen recovered from 16 subsistence-harvested bowhead whales (*Balaena mysticetus*). The pulverized baleen proved to have a great potential to generate accurate data on progesterone levels. The EIA assay was satisfactorily validated using a commercial kit and reflected distinct reproductive physiological states, with pregnant females showing higher progesterone levels than nonpregnant females and males. Interestingly, retrospective studies can be performed using baleen from museum archives. However, like earplugs, baleen can only be collected from dead animals (HUNT et al. 2014).

3. CONCLUSIONS

The most commonly used assay technique to measure hormones was radioimmunoassay (RIA), but the enzyme immunoassay (EIA) has recently been gaining popularity. More sensitive techniques, such as high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS) (or both combined), were also used in a few studies. Blood was the matrix most frequently sampled in the past to determine the hormone profiles of dolphins and whales, and the process most frequently involved the death of the animal. Hunting for scientific purposes, opportunistic sampling during subsistence harvesting or the incidental catch of wild odontocetes by fisheries provided most of the samples for this matrix. More recently, the noninvasive or moderately invasive sampling of certain matrices, such as blow and blubber, proved to have a great potential to provide the hormone profiles of live, free-ranging cetaceans. The baleen and earplug matrices can be collected from subsistence-hunted and stranded cetaceans and also appear to be a valuable source of information regarding dead whales.

REFERENCES

- AKSENOV, A., ALEXANDER, A.; YEATES, L.; PASAMONTES, A.; SIEBE, C.; ZRODNIKOV, Y.; SIMMONS, J.; MCCARTNEY, M.; M DEPLANQUE, J. P.; WELLS, R. S. DAVIS, C. E. Metabolite content profiling of bottlenose dolphin exhaled breath. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 21, p. 10616–24, 4 nov. 2014.
- AMARAL, R. S.; ROSAS, F. C. W.; VIAU, P.; D’AFFONSÊCA NETO, J. A.; DA SILVA, V. M. F.; OLIVEIRA, C. A. Noninvasive monitoring of androgens in male Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*): biologic validation. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 3, p. 458–465, 2009.
- AMARAL, R. S. Use of Alternative Matrices to Monitor Steroid Hormones in Aquatic Mammals: A Review. **Aquatic Mammals**, v. 36, n. 2, p. 162–171, 1 jun. 2010.
- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 3–4, p. 223–43, jun. 2007.
- ATKINSON, S.; COMBELLES, C.; VINCENT, D.; NACHTIGALL, P.; PAWLOSKI, J.; BREESE M. Monitoring of progesterone in captive female false killer whales, *Pseudorca crassidens*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, n. 3, p. 323–32, set. 1999.
- BARLOW, J.; CLAPHAM, P. J. A new birth-interval approach to estimating demographic parameters of humpback whales. **Ecology**, v. 78, n. 2, p. 535–546, 11 mar. 1997.
- BERGFELT, D. R.; STEINETZ, B. G.; LASANO, S.; WEST, K. L.; CAMPBELL, M.; ADAMS, G. P. Relaxin and progesterone during pregnancy and the post-partum period in association with live and stillborn calves in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 3, p. 650–6, 1 mar. 2011.
- BERGFELT, D. R.; STEINETZ, B. G.; REIF, J. S.; SCHAEFER, A. M.; GBOSSART, G. D.; MAZZOIL, M. S., ZOLMAN, E.; FAIR, P. A. Evaluation of Single-Sample Analysis of Progesterone in Combination with Relaxin for Diagnosis of Pregnancy in Wild Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). **Aquatic Mammals**, v. 39, n. 2, p. 187–195, 2013.
- BIANCANI, B.; DA DALT, L.; LACAVE, G.; ROMAGNOLI, S.; GABAI, G. Measuring fecal progestogens as a tool to monitor reproductive activity in captive female bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1282–92, dez. 2009.
- BIRUKAWA, N. et al. Plasma and urine levels of electrolytes, urea and steroid hormones involved in osmoregulation of cetaceans. **Zoological Science**, v. 22, n. 11, p. 1245–57, nov. 2005.
- BROOK, F.; LIM, E. H. T.; CHUA, F. H. C.; MACKAY, B. Assessment of the Reproductive Cycle of the Indo-Pacific Humpback Dolphin, *Sousa chinensis*, Using Ultrasonography. **Aquatic Mammals**, v. 30, n. 1, p. 137–148, 1 jan. 2004.

CLAPHAM, P. J.; MAYO, C. A. Reproduction and recruitment of individually identified humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, observed in Massachusetts Bay, 1979–1985. **Canadian Journal of Zoology**, v. 65, n. 12, p. 2853–2863, 14 dez. 1987.

CORNELL, L. H.; ASPER, E. D.; ANTRIM, J. E.; SEARLES, S. S.; YOUNG, W. G.; GOFF, T. Progress report: Results of a long-range captive breeding program for the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus* and *Tursiops truncatus gilli*. **Zoo Biology**, v. 6, n. 1, p. 41–53, 1987.

CURRY, B.; RALLS, K.; BROWNELL, R. Prospects for captive breeding of poorly known small cetacean species. **Endangered Species Research**, v. 19, n. 3, p. 223–243, 25 jan. 2013.

DAOQUAN, C.; YUJIANG, H.; QINGZHONG, Z.; DING, W. Reproductive seasonality and maturity of male *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis* in captivity: A case study based on the hormone evidence. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 39, n. 2, p. 163–173, jun. 2006.

DAOQUAN, C.; QINGZHONG, Z.; RENJUN, L. Preliminary study on some hormones of *Neophocaena phocaenoides* in the Yangtze River. **Acta Theriologica Sinica**, v. 17, n. 1, p. 43–47, 1 jan. 1997.

DESPORTES, G. et al. Multiple insights into the reproductive function of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*): An ongoing study. **NAMMCO Scientific Publications**, v. 5, p. 91, 17 out. 2013.

DESPORTES, G.; SABOUREAU, M.; LACROIX, A. plasma pilot *Globicephala*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 237–244, May, 1994a.

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

DUFFIELD, D. A. et al. Killer whale (*Orcinus orca*) reproduction at Sea World. **Zoo Biology**, v. 14, n. 5, p. 417–430, 1995.

FAIR, P. A.; HULSEY, T. C.; VARELA, R. A.; GOLDSTEIN, J. D.; ADAMS, J.; ZOLMAN, E. S.; BOSSART, G. D. Hematology, Serum Chemistry, and Cytology Findings from Apparently Healthy Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) Inhabiting the Estuarine Waters of Charleston, South Carolina. **Aquatic Mammals**, v. 32, n. 2, p. 182–195, 1 jun. 2006.

FERREIRA, I. M.; KASUYA, T.; MARSH, H.; BEST, P. B. False killer whales (*Pseudorca crassidens*) from Japan and South Africa: Differences in growth and reproduction. **Marine Mammal Science**, v. 30, n. 1, p. 64–84, 1 jan. 2014.

FUKUI, Y.; MOGOE, T.; JUNG, Y. G.; TERAWAKI, Y.; MIYAMOTO, A.; ISHIKAWA, H.; FUJISE, Y.; OHSUMI, S. Relationships Among Morphological Status, Steroid Hormones, and Post-Thawing Viability of Frozen Spermatozoa of Male Minke Whales (*Balaenoptera Acutorostrata*). **Marine Mammal Science**, v. 12, n. 1, p. 28–37, jan. 1996.

FUNASAKA, N. Seasonal Difference of Diurnal Variations in Serum Melatonin, Cortisol, Testosterone, and Rectal Temperature in Indo-Pacific Bottlenose Dolphins (*Tursiops aduncus*). **Aquatic Mammals**, v. 37, n. 4, p. 433–442, 1 dez. 2011.

HALL, A. J.; WELLS, R. S.; SWEENEY, J. C.; TOWNSEND, F. I.; BALMER, B. C.; HOHN, A. A.; RHINEHART, H. L. Annual, seasonal and individual variation in hematology and clinical blood chemistry profiles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, Florida. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 2, p. 266–77, out. 2007.

HAO, Y. J.; CHEN, D. Q.; ZHAO, Q. Z.; WANG, D. Serum concentrations of gonadotropins and steroid hormones of *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis* in middle and lower regions of the Yangtze River. **Theriogenology**, v. 67, n. 4, p. 673–80, 1 mar. 2007.

HERMAN, D.; BURROWS, D.; WADE, P.; DURBAN, J.; MATKIN, C.; LEDUC, R.; Barrett-LENNARD, L. G.; KRAHN, M. Feeding ecology of eastern North Pacific killer whales *Orcinus orca* from fatty acid, stable isotope, and organochlorine analyses of blubber biopsies. **Marine Ecology Progress Series**, v. 302, p. 275–291, 2005.

HOGG, C. J.; ROGERS, T. L.; SHORTER, A.; BARTON, K.; MILLER, P. J. O.; NOWACEK, D.. Determination of steroid hormones in whale blow: It is possible. **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 3, p. 605–618, jul. 2009.

HOGG, C. J.; VICKERS, E. R.; ROGERS, T. L. Determination of testosterone in saliva and blow of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 814, n. 2, p. 339–46, 25 jan. 2005.

HUILIN, C.; WANQIAN, C.; MEI, X.; DAOQUAN, C. Observation on Serum Testosterone Level Cycles in a Reared Male Chinese River Dolphin (BAIJI). **Journal of Radioimmunology**, v. 23, n. 1, p. 7–9, 2010.

HUNT, K. E.; ROLLAND, R. M.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Analysis of fecal glucocorticoids in the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 260–72, 1 set. 2006.

HUNT, K. E.; MOORE, M. J.; ROLLAND, R. M.; KELLAR, N. M.; HALL, A. J.; KERSHAW, J.; RAVERTY, S. A.; DAVIS, C. E.; YEATES, L. C.; FAUQUIER, D. A.; ROWLES, T. K.; KRAUS, S. D. Overcoming the challenges of studying conservation physiology in large whales: a review of available methods. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. cot006–cot006, 15 maio 2013.

HUNT, K. E.; STIMMELMAYR, R.; GEORGE, C.; HANNS, C.; SUYDAM, R.; BROWER JR. H.; ROLLAND, R. M. Baleen hormones : a novel tool for retrospective assessment of stress and reproduction in bowhead whales (*Balaena mysticetus*). **Conservation Physiology**, v. 2, n. April, p. 1–12, 2014.

HUNT, K. E.; ROLLAND, R. M.; KRAUS, S. D. Detection of steroid and thyroid hormones via immunoassay of North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) respiratory vapor. **Marine Mammal Science**, v. 30, n. 2, p. 796–809, 2 abr. 2014.

KALZ, B.; JEWGENOW, K.; FICKEL, J. Structure of an otter (*Lutra lutra*) population in Germany – results of DNA and hormone analyses from faecal samples. **Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 71, n. 6, p. 321–335, nov. 2006.

KATSUMATA, E. Study on Reproduction of Captive Marine Mammals. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 1, p. 1–8, 2010.

KATSUMATA, E.; UEDA, Y.; ARAI, K.; KATSUMATA, H.; KISHIMOTO, M.; WATANABE, G.; & TAYA, K. Circulating Testosterone and Inhibin Levels at Different Ages in the Male Beluga (*Delphinapterus leucas*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 3, p. 293–300, 2012.

KATSUMATA, E.; JAROENPORN, S.; KATSUMATA, H. Body Temperature and Circulating Progesterone Levels before and after Parturition in Killer Whales (*Orcinus orca*). **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 1, p. 65–71, 2006.

KELLAR, N.; TREGO, M. Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 1, p. 1–16, 2006.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; MARKS, C. I.; CHIVERS, S. J.; DANIL, K.; ARCHER, FREDERICK I. Blubber testosterone: A potential marker of male reproductive status in short-beaked common dolphins. **Marine Mammal Science**, v. 25, n. 3, p. 507–522, 2009.
KELLAR, N. M.; KELIHER, J.; TREGO, M. L.; CATELANI, K. N.; HANNS, C.; CRAIG, J. C; ROSA, C. Variation of bowhead whale progesterone concentrations across demographic groups and sample matrices, **Endangered Species Research**, v. 22, p. 61–72, 2013a.

KELLAR, N. M.; TREGO, M. L.; CHIVERS, S. J.; ARCHER, F. I. 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**, v. 160, n. 12, p. 3113–3124, 29 ago. 2013b.

KELLAR, N.; TREGO, M.; CHIVERS, S. 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**, v. 113, n. 2, p. 58–80, 2014.

KERLEY, L.; GOODRICH, J. Reproductive parameters of wild female Amur (Siberian) tigers (*Panthera tigris altaica*). **Journal of Mammalogy**, v. 84, n. 1, p. 288–298, 2003.

KJELD, J. M.; SIGURJÓNSSON, J.; ARNASON, A. Sex hormone concentrations in blood serum from the north Atlantic fin whale (*Balaenoptera physalus*). **The Journal of endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 405–13, set. 1992.

KJELD, M. Concentrations of electrolytes, hormones, and other constituents in fresh postmortem blood and urine of fin whales (*Balaenoptera physalus*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, n. 3, p. 438–446, 2001.

KJELD, M.; ALFREDSSON, A.; ÓLAFSSON, O.; TRYLAND, M.; CHRISTENSEN, I.; STUEN, S.; ÁRNASON, A. 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, 2004.

KJELD, M.; ÓLAFSSON, Ö.; VÍKINGSSON, G. A.; SIGURJÓNSSON, J. Sex Hormones and Reproductive Status of the North Atlantic Fin Whales (*Balaenoptera physalus*) During the Feeding Season. **Aquatic Mammals**, v. 32, n. 1, p. 75–84, 1 jan. 2006.

KNOFF, A.; HOHN, A.; MACKO, S. Ontogenetic diet changes in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) reflected through stable isotopes. **Marine Mammal Science**, v. 24, n. 1, p. 128–137, jan. 2008.

KOELSCH, K. Reproduction in female manatees observed in sarasota bay , Florida. **Mammalia**, 17, p. 331–342, April, 2001.

KRÜTZEN, M.; BARRE, L. A biopsy system for small cetaceans: Darting success and wound healing in *Tursiops* spp. **Marine Mammal Science**, v. 18, n. 4 , p. 863–878, 2002.

KUSUDA, S.; KAKIZOE, Y.; KANDA, K.; SENGOKU, T.; FUKUMOTO, Y.; ADACHI, I., WATANABE, Y.; DOI, O. Ovarian cycle approach by rectal temperature and fecal progesterone in a female killer whale, *Orcinus orca*. **Zoo Biology**, v. 30, n. 3, p. 285–95, 2011.

LAULE, G. E. Positive reinforcement training and environmental enrichment: enhancing animal well-being. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 7, p. 969–973, out. 2003.

LOSETO, L. L.; RICHARD, P.; STERN, G. A.; ORR, J.; FERGUSON, S. H. Segregation of Beaufort Sea beluga whales during the open-water season. **Canadian Journal of Zoology**, v. 84, n. 12, p. 1743–1751, 9 dez. 2006.

MANSOUR, A. A. H.; MKAY, D. W.; LIEN, J.; ORR, J. C.; BANOUB, J. H.; OIEN, N.; STENSON, G. Determination of Pregnancy Status From Blubber Samples in Minke Whales (*Balaenoptera Acutorostrata*). **Marine Mammal Science**, v. 18, n. 1, p. 112–120, jan. 2002.

MARTIN, A. R.; DA SILVA, V. M. F.; ROTHERY, P. R. Does radio tagging affect the survival or reproduction of small cetaceans? a test. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 1, p. 17–24, 10 jan. 2006.

MARTIN, A.; SILVA, V. DA. Number, seasonal movements, and residency characteristics of river dolphins in an Amazonian floodplain lake system. **Canadian Journal of Zoology**, v. 1315, p. 1307–1315, 2004.

MOGOE, T.; SUZUKI, T.; ASADA, M.; FUKUI, Y.; ISHIKAWA, H.; OHSUMI, S. Functional Reduction of the Southern Minke Whale (*Balaenoptera Acutorostrata*) Testis During the Feeding Season. **Marine Mammal Science**, v. 16, n. 3, p. 559–569, jul. 2000.

MOORE, S.; RIDGWAY, S. Patterns of dolphin sound production and ovulation. **Aquatic Mammals**, v. 22, n. 3, p. 175–184, 1996.

MORISAKA, T.; KOHSHIMA, S.; YOSHIOKA, M.; SUZUKI, M.; NAKAHARA, F. Recent Studies on Captive Cetaceans in Japan: Working in Tandem with Studies on Cetaceans in the Wild. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, n. 4, 1 jan. 2010.

MURACO, H. et al. Conditioning for Conservation: A New Approach to Detection of Luteinizing Hormone in a Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). **Aquatic Mammals**, v. 35, n. 3, p. 386–393, 2009.

MURACO, H.; CHENG, A.; RAVIDA, N.; ARN, D.; JIM, H.; DURRANT, B.. Ovarian Follicular Dynamics During the Luteinizing Hormone Surge in the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, n. 4, p. 723–733, 1 jan. 2010.

MURANISHI, Y.; SASAKI, M.; HAYASHI, K.; ABE, N.; FUJIHIRA, T.; ISHIKAWA, H., OHSUMI, S.; MIYAMOTO, A.; FUKUI, Y. Relationship between the appearance of preantral follicles in the fetal ovary of Antarctic minke whales (*Balaenoptera bonaerensis*) and hormone concentrations in the fetal heart, umbilical cord and maternal blood. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 12, n. 2, p. 125–32, maio 2004.

NEUENHAGEN, C.; GARCIAHARTMANN, M.; GREVEN, H. Histology and morphometrics of testes of the white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*) in bycatch samples from the northeastern Atlantic. **Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 72, n. 5, p. 283–298, 3 set. 2007.

O'BRIEN, J. K.; STEINMAN, K. J.; SCHMITT, T.; & ROBECK, T. R. Semen collection, characterisation and artificial insemination in the beluga (*Delphinapterus leucas*) using liquid-stored spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 7, p. 770, 2008.

O'BRIEN, J. K.; ROBECK, T. R. The Value of Ex Situ Cetacean Populations in Understanding Reproductive Physiology and Developing Assisted Reproductive Technology for Ex Situ and In Situ Species Management and Conservation Efforts. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, n. 3, 1 jan. 2010.

O'BRIEN, J. K.; ROBECK, T. R. The relationship of maternal characteristics and circulating progesterone concentrations with reproductive outcome in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) after artificial insemination, with and without ovulation induction, and natural breeding. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 469–82, ago. 2012.

OWEN, S. J. Use of an Enzyme Immunoassay to Determine Progesterone Status in the Bottle-Nosed Dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 21, n. 1, p. 70–72, 1990.

PALME, R.; SCHILDORFER, H.; ISMAIL, M. N. N.; FISCHER, P. Excretion of infused ^{14}C -steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. **Animal Reproduction Science**, v. 43, n. 1, p. 43–63, maio 1996.

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

PERRYMAN, W. L.; LYNN, M. S. Evaluation of nutritive condition and reproductive status of migrating gray whales (*Eschrichtius robustus*) based on analysis of photogrammetric data. **Journal of Cetacean Research Management**, v. 4, n. 2, p. 155–164, 2002.

ROBECK, T. R.; SCHNEYER, A. L.; MCBAIN, J. F.; DALTON, L. M.; WALSH, M. T.; CZEKALA, N. M.; KRAEMER, D. C. Analysis of urinary immunoreactive steroid metabolites and gonadotropins for characterization of the estrous cycle, breeding period, and seasonal estrous activity of captive killer whales (*Orcinus orca*). **Zoo Biology**, v. 12, n. 2, p. 173–187, 1993.

ROBECK, T. R.; CURRY, B. E.; MCBAIN, J. F.; KRAEMER, D. C. Reproductive biology of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the potential application of advanced reproductive technologies. **Journal of Zoo and Wildlife**, v. 25, n. 3, p. 321–336, 1994.

ROBECK, T. R.; MCBAIN, J. F.; MATHEY, S.; KRAEMER, D. C. Ultrasonographic evaluation of the effects of exogenous gonadotropins on follicular recruitment and ovulation induction in the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 29, n. 1, p. 6–13, mar. 1998.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; GEARHART, S.; REIDARSON, T. R.; MCBAIN, J. F.; MONFORT, S. L. Reproductive physiology and development of artificial insemination technology in killer whales (*Orcinus orca*). **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 650–660, ago. 2004.

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

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; YOSHIOKA, M.; JENSEN, E.; O'BRIEN, J. K.; KATSUMATA, E.; GILI, C.; MCBAIN, J. F.; SWEENEY, J.; MONFORT, S. L. Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 129, n. 5, p. 659–74, maio 2005b.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; GREENWELL, M.; RAMIREZ, K.; VAN BONN, W.; YOSHIOKA, M.; KATSUMATA, E.; DALTON, L.; OSBORN, S.; O'BRIEN, J. K. Seasonality, estrous cycle characterization, estrus synchronization, semen cryopreservation, and artificial insemination in the Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 138, n. 2, p. 391–405, ago. 2009.

ROBECK, T. R.; STEINMAN, K. J.; MONTANO, G. A.; KATSUMATA, E.; OSBORN, S.; DALTON, L.; OSBORN, S.; O'BRIEN, J. K. Deep intra-uterine artificial inseminations using cryopreserved spermatozoa in beluga (*Delphinapterus leucas*). **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 989–1001, 1 out. 2010.

ROBECK, T. R.; GILI, C.; DOESCHER, B. M.; SWEENEY, J.; DE LAENDER, P.; VAN ELK, C. E.; O'BRIEN, J. K. Altrenogest and progesterone therapy during pregnancy in bottlenose dolphins (*tursiops truncatus*) with progesterone insufficiency. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 2, p. 296–308, jun. 2012.

ROBECK, T. R.; MONFORT, S. L. Characterization of male killer whale (*Orcinus orca*) sexual maturation and reproductive seasonality. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 242–50, 15 jul. 2006.

ROLLAND, R. M.; HUNT, K. E.; KRAUS, S. D.; WASSER, S. K. Assessing reproductive status of right whales (*Eubalaena glacialis*) using fecal hormone metabolites. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 3, p. 308–17, jul. 2005.

ROSENBAUM, H. C.; BROWNELL, R. L.; BROWN, M. W.; SCHAEFF, C.; PORTWAY, V.; WHITE, B. N.; MALIK, S.; PASTENE, L. A.; PATENAUE, N. J.; BAKER, C. S.; GOTO, M.; BEST, P. B.; CLAPHAM, P. J.; HAMILTON, P.; MOORE, M.; PAYNE, R.; ROWNTREE, V.; TYNAN, C. T.; BANNISTER, J. L. DESALLE, R. World-wide genetic differentiation of *Eubalaena*: questioning the number of right whale species. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 11, p. 1793–1802, nov. 2000.

SAWYER-STEFFAN, J. E.; KIRBY, V. **A study of serum steroid hormone levels in captive female bottlenose dolphins, their correlation with reproductive status, and their application to ovulation induction in captivity**. San Diego CA: Zoological Society of San Diego, 1980. p. 21

SCHNEYER, A.; CASTRO, A.; ODELL, D. Radioimmunoassay Luteinizing of Serum Hormone Follicle-stimulating in the Bottlenosed Dolphin Science whether Sawyer-Stephan In order of this pool. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 844–853, 1985.

SCHROEDER, J. P.; KELLER, K. V. Seasonality of serum testosterone levels and sperm density in *Tursiops truncatus*. **Reproductive Biology**, v. 249, n. 3, p. 316–21, 1989.

SCHWACKE, L. H.; SMITH, C. R.; TOWNSEND, F. I.; WELLS, R. S.; HART, L. B.; BALMER, B. C.; COLLIER, K.; DE GUISE, S.; FRY, M. M.; GUILLETTE, L. J.; LAMB, S. V.; LANE, S. M.; MCFEE, W. E.; PLACE, N. J.; TUMLIN, M. C.; YLITALO, M.; ZOLMAN, S.; ROWLES, T. K. Health of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Barataria Bay, Louisiana, following the deepwater horizon oil spill. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 1, p. 93–103, 7 jan. 2014.

SCHWARZENBERGER, F.; BROWN, J. Hormone monitoring: an important tool for the breeding management of wildlife species. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift - Veterinary Medicine Austria**, v. 100, p. 209–225, 2013.

ST. AUBIN, D. J.; FORNEY, K. A.; CHIVERS, S. J.; SCOTT, M. D.; DANIL, K.; ROMANO, T. A.; WELLS, R. S.; GULLAND, F. M. D. Hematological , serum , and plasma chemical constituents in pantropical spotted dolphins (*Stenella attenuata*) following chase , encirclement , and tagging. **Marine Mammal Science**, v. 29, p. 14–35, 29 jan. 2013.

STEINMAN, K. J.; O'BRIEN, J. K.; MONFORT, S. L.; ROBECK, T. R. Characterization of the estrous cycle in female beluga (*Delphinapterus leucas*) using urinary endocrine monitoring and transabdominal ultrasound: Evidence of facultative induced ovulation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, n. 3, p. 389–97, 1 fev. 2012.

TEMTE, J. L. Use of Serum Progesterone and Testosterone to Estimate Sexual Maturity in Call ' s Porpoise *Phocoenoides dalli*. **Fishery Bulletin**, v. 89, p. 161–165, 1991.

TEMTE, J. L.; SPIELVOGEL, S. Serum progesterone levels and reproductive status of incidentally killed female dall porpoises. **Journal of Wildlife Management**, v. 49, n. 1, p. 51–54, 1985.

THAYER, V. G.; READ, A. J.; FRIEDLAENDER, A. S.; COLBY, D. R.; HOHN, A. A.; MCLELLAN, W. A.; Pabst, D.; Dearolf, J. L.; Bowles, N. I.; Russell, J. R.; RITTMASER, K. A. Reproductive Seasonality of Western Atlantic Bottlenose Dolphins Off North Carolina, U.S.A. **Marine Mammal Science**, v. 19, n. 4, p. 617–629, out. 2003.

TIZZI, R.; ACCORSI, P.; AZZALI, M. Non-invasive multidisciplinary approach to the study of reproduction and calf development in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): The Rimini Delfinario. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, p. 734–776, 2010.

TREGO, M. L.; KELLAR, N. M.; DANIL, K. Validation of blubber progesterone concentrations for pregnancy determination in three dolphin species and a porpoise. **PloS One**, v. 8, n. 7, p. e69709, jan. 2013.

TROUT, G. J. Comment on “Determination of testosterone in saliva and blow of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using liquid chromatography-mass spectrometry”. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 863, n. 1, p. 192–3, 15 fev. 2008.

TRUMBLE, S. J., ROBINSON, E. M.; BERMAN-KOWALEWSKI, M.; POTTER, C. W.; USENKO, S. Blue whale earplug reveals lifetime contaminant exposure and hormone profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. 16922–6, 15 out. 2013.

WADE, P.; DE ROBERTIS, A.; HOUGH, K.; BOOTH, R.; KENNEDY, A.; LEDUC, R.; MUNGER, L.; NAPP, J.; SHELDEN, K.; RANKIN, S.; VASQUEZ, O. WILSON, C. Rare detections of North Pacific right whales in the Gulf of Alaska, with observations of their potential prey. **Endangered Species Research**, v. 13, n. 2, p. 99–109, 27 jan. 2011.

WALKER, L. A.; CORNELL, L.; DAHL, K. D.; CZEKALA, N. M.; DARGEN, C. M.; JOSEPH, B.; HSUEH, J. W.; LASLEY, B. L.; HSUEH, A. J. Urinary concentrations of ovarian steroid hormone metabolites and bioactive follicle-stimulating hormone in killer whales (*Orcinus orca*) during ovarian cycles and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 5, p. 1013–1020, dez. 1988.

WASSER, S. K.; AZKARATE, J. C.; BOOTH, R. K.; HAYWARD, L.; HUNT, K.; AYRES, K.; VYNNE, C.; GOBUSH, K.; CANALES-ESPINOSA, D.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. Non-invasive measurement of thyroid hormone in feces of a diverse array of avian and mammalian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 168, n. 1, p. 1–7, 1 ago. 2010.

WATANABE, H.; MOGOE, T.; ASADA, M.; HAYASHI, K.; FUJISE, Y.; ISHIKAWA, H.; OHSUMI, S.; MIYAMOTO, A. FUKUI, Y. Relationship between serum sex hormone concentrations and histology of seminiferous tubules of captured baleen whales in the Western North Pacific during the feeding season. **The Journal of reproduction and development**, v. 50, n. 4, p. 419–27, ago. 2004.

WAUGH, C. A.; NICHOLS, P. D.; SCHLABACH, M.; NOAD, M.; BENGTSON NASH, S. Vertical distribution of lipids, fatty acids and organochlorine contaminants in the blubber of southern hemisphere humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). **Marine Environmental Research**, v. 94, p. 24–31, mar. 2014.

WEBER ROSAS, F. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; ROSAS, F. C. W. Reproduction of the Estuarine Dolphin (*Sotalia Guianensis*) on the Coast of Paraná, Southern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 83, n. 2, p. 507–515, maio 2002.

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

WEST, K. L.; OFTEDAL, O. T.; CARPENTER, J. R.; KRAMES, B. J.; CAMPBELL, M.; SWEENEY, J. C. Effect of lactation stage and concurrent pregnancy on milk composition in the bottlenose dolphin. **Journal of zoology (London, England : 1987)**, v. 273, n. 2, p. 148–160, out. 2007.

WU, H.-P.; HAO, Y.-J.; LI, X.; ZHAO, Q.-Z.; CHEN, D.-Q.; KUANG, X.-A.; ... WANG, D. B-mode ultrasonographic evaluation of the testis in relation to serum testosterone concentration in male Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) during the breeding season. **Theriogenology**, v. 73, n. 3, p. 383–91, fev. 2010a.

WU, H.-P.; HAO, Y.-J.; YU, X.-Y.; XIAN, Y.-J.; ZHAO, Q.-Z.; CHEN, D.-Q.; KOU, Z.-B.; FENG, K.-K.; GONG, W.-M.; WANG, D. Variation in sexual behaviors in a group of captive male Yangtze finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*): motivated by physiological changes? **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1467–75, nov. 2010b.

YOSHIOKA, M.; MOHRI, E; TOBAYAMA, T.; AIDA, K; HANYU, I. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 52, n. 11, p. 1939–1946, 1986.

YOSHIOKA, M.; OKUMURA, T.; AIDA, K.; FUJISE, Y. A proposed technique for quantifying muscle progesterone content in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 2, p. 368–370, 15 fev. 1994a.

YOSHIOKA, M; OKUMURA, T.; AIDA, K.; FUJISE, Y. A proposed technique for quantifying muscle progesterone content in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 2, p. 368–370, 15 fev. 1994b.

YOSHIOKA, M.; AIDA, K.; HANYU, I. Correlation of serum progesterone levels with reproductive status in female striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) and short-finned pilot whales (*Globicephala macrorhynchus*). **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 55, n. 3, p. 474–478, 1989.