

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

“Uma abordagem ecotoxicológica e evolutiva em populações do boto-cinza *Sotalia guianensis* (Van Bénédén, 1875) na costa brasileira”

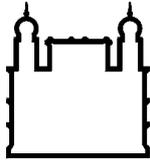
por

Thais Sholl Guimarães Corrêa

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.

*Orientador principal: Prof. Dr. Salvatore Siciliano
Segunda Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cibele Rodrigues Bonvicino*

Rio de Janeiro, junho de 2010.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

“Uma abordagem ecotoxicológica e evolutiva em populações do boto-cinza *Sotalia guianensis* (Van Bénéden, 1875) na costa brasileira”

apresentada por

Thais Sholl Guimarães Corrêa

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alexandre Afrânio Peixoto

Prof.^a Dr.^a Aldo Pacheco Ferreira

Prof. Dr. Salvatore Siciliano – Orientador principal

Dissertação defendida e aprovada em 08 de junho de 2010.



FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
ENSP - Escola Nacional de Saúde Pública
Programa de Pós Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente
Subárea: Gestão de Problemas Ambientais e Promoção de Saúde
Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente

“Uma abordagem ecotoxicológica e evolutiva em populações do boto-cinza *Sotalia guianensis* (Van Bénéden, 1875) na costa brasileira”

Aluna: Thais Sholl Guimarães Corrêa
Orientador Principal: Prof. Dr. Salvatore Siciliano
Segunda Orientadora: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Catálogo na fonte

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

C824 Corrêa, Thais Sholl Guimarães
Uma abordagem ecotoxicológica e evolutiva em populações do
botocinza *Sotalia guianensis* (Van Bénéden, 1875) na costa brasileira. /
Thais Sholl Guimarães Corrêa. Rio de Janeiro: s.n., 2010.
84 f., il., tab., graf., mapas

Orientador: Siciliano, Salvatore
Bonvicino, Cibele Rodrigues

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio
Arouca, Rio de Janeiro, 2010

1. Golfinhos - genética. 2. Poluição Costeira. 3. Poluição Ambiental.
4. DNA Mitochondrial - análise. I. Título.

CDD - 22.ed. – 363.7098153

Dedico este trabalho “*in memoriam*”

ao meu pai Darcy e a pequena

Elisabeth.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus orientadores, Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino e Dr. Salvatore Siciliano por todos os anos de orientação.
- Ao Programa de Pós Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente pela bolsa de estudos.
- Ao Dr. Hector Seuanez por permitir a minha permanência no laboratório da Divisão de Genética do INCA.
- À Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.
- Às equipes GEMM-Lagos e GEMAM pelo esforço sem igual na coleta das amostras.
- À Fabrícia pela revisão das análises e do texto.
- Aos colaboradores Dra. Ana Paula Di Benedetto e Leonardo Flach.
- À Lari e ao Iggy pela interminável troca de informações.
- À Aline, pela amizade de sempre.
- Aos amigos da Divisão de Genética do INCA, em especial a Carol B., Bolívia, Rodrigo, Maria Carol, Tatilene, Hanna, Flavinha, Fabi, Pirão, Raquel, Mi, Camilão, Dri e Leila por terem *engolido* todos os meus sapos durante estes dois anos de mestrado.
- À amiga Renata (Presunto) por todos os momentos divertidos durante esses anos de mestrado e pelo intercâmbio cultural (bombom de cupuaçu e a comida da Tia Neusa).
- Ao Felipe por ter me aturado neste período tão estressante.
- Ao meus pais, porque sem eles nada disso teria sido possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Saúde do Ecossistema Marinho	1
1.2. Possíveis Efeitos Genéticos da Contaminação Ambiental.....	3
1.2.1. DNA Mitocondrial em Estudos de Populações Naturais.....	7
1.3. Mamíferos Marinhos: Sentinelas da Qualidade do Ecossistema Aquático	10
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Área de Estudo.....	17
3.2. Obtenção das Amostras.....	20
3.3. Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento do DNA Mitocondrial ...	23
3.4. Análise dos Dados.....	24
4. RESULTADOS	30
4.1. Extração de DNA, PCR e Sequenciamento do DNA mitocondrial.....	30
4.3. Caracterização Genética das Populações do Boto-Cinza na Costa Brasileira ..	31
4.4. Estruturação Populacional do Boto-Cinza na Costa Brasileira.....	36
5. DISCUSSÃO	47
5.1. Caracterização Genética e Estruturação Populacional do Boto-Cinza	47
5.2. Diversidade Genética e Contaminação Ambiental: Consequências para Populações do Boto-Cinza da Costa Brasileira	51
5.3. Considerações Finais	56
6. CONCLUSÕES FINAIS	58
7. REFERÊNCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma ilustrativo da bioacumulação de contaminantes na cadeia trófica marinha, que inclui a espécie humana e os mamíferos marinhos como animais no topo da cadeia trófica. Adaptado de Ross & Birnbaum (2003).....	11
Figura 2 - Grande agregação de botos-cinza na Baía de Sepetiba. Foto: Leonardo Flach.	13
Figura 3 - Artefato de pesca preso a dorsal de um espécime de boto-cinza da Baía de Sepetiba. Foto: Leonardo Flach.....	15
Figura 4 - Distribuição dos níveis de mercúrio em amostras de músculo de botos-cinza (<i>S. guianensis</i>) coletados na costa do estado do Amapá e do Rio de Janeiro (MOURA, 2009).....	15
Figura 5 - Mapa com distribuição do boto-cinza (<i>S. guianensis</i>) que se estende desde Honduras até Santa Catarina, na região sul do Brasil. As regiões de estudo são marcadas pelas áreas em preto: a área ao norte abrange o estado do Amapá (AP) e Pará (PA) e, na região sudeste, o estado do Rio de Janeiro (RJ).	17
Figura 6 - Mapa com a região norte do estado do Rio de Janeiro. A área de estudo se estende desde o município de Saquarema, na Região dos Lagos, até Atafona, norte do estado do Rio de Janeiro.....	18
Figura 7 - Mapa da área de estudo que se estende da costa do Amapá a baía do Marajó.	20
Figura 8 - Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste estudo, adaptado de Irwin e colaboradores (1991). Retângulos representam o gene citocromo <i>b</i> e a região que o flanqueia, os genes tRNA de Ácido Glutâmico (E) e tRNA de <i>Lagenorhynchus albirostris</i> no GenBank (número de acesso: NC_005278.1).....	24
Figura 9 - Exemplos de gráficos de correlação entre distâncias genéticas e geográficas que permitem inferir sobre os modelos de fluxo gênico que influenciam a estrutura das populações.....	27
Figura 11 - Gel de agarose 1,5% mostrando resultado da amplificação do gene citocromo <i>b</i> . Na primeira coluna está o padrão de tamanho de fragmento de 100 pb, na segunda coluna o controle negativo e nas colunas de 3 a 16 as amostras amplificadas.	30
Figura 12 - Gel de agarose 1,5% mostrando resultado da amplificação da região controladora do DNA mitocondrial (<i>D-Loop</i>). Na primeira coluna está o padrão de	

tamanho de fragmento de 100 pb, na segunda coluna o controle negativo e nas colunas de 3 a 19 as amostras amplificadas.....	31
Figura 13 - Correlação entre distância genética (F_{ST}) obtido através da análise do gene citocromo <i>b</i> e geográfica (em Km) considerando as três populações de <i>S. guianensis</i> deste estudo. A linha de tendência reflete a extrapolação do comportamento dos pontos ($r = 0,019$; $P = 0,988$).....	40
Figura 14 - Correlação entre distância genética (F_{ST}) obtido através da análise do <i>D-Loop</i> e geográfica (em Km) considerando as três populações de <i>S. guianensis</i> deste estudo. A linha de tendência reflete a extrapolação do comportamento dos pontos ($r = 0,992$; $P = 0,080$).....	40
Figura 16 - <i>Mismatch distribution</i> para o <i>D-Loop</i> . ■ = Dados simulados de acordo com modelo de expansão demográfica súbita. ▲ = Dados simulados de acordo com modelo de expansão espacial súbita. ● = Dados observados a partir da distribuição do número de diferenças entre pares de sequências de DNA. Intervalos de confiança estão representados pelas curvas de percentil 5 e 95.....	43
Figura 17 - Relações genealógicas entre haplótipos de <i>S. guianensis</i> para o DNA mitocondrial (A. Citocromo <i>b</i> ; B. <i>D-Loop</i>) inferidos através da análise de <i>median-joining</i> . Os círculos representam os haplótipos, e seu diâmetro é proporcional ao número de indivíduos que compartilham cada haplótipo. Os traços representam as substituições. Os números dos haplótipos são os mesmos encontrados nas Tabelas 4 e 5.	46
Figura 18 - Modelo para ilustrar as inter-relações entre os fatores relacionados à contaminação química ambiental com a diminuição da diversidade genética das populações. Adaptado de Bickham <i>et al.</i> (2000).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista das amostras utilizadas neste estudo, com número de coleta, localidade e se a amostra é proveniente de encalhe (e) ou captura acidental em rede de pesca (c).	21
Tabela 2 - Posição dos sítios polimórficos dos haplótipos de <i>S. guianensis</i> encontrados na análise das sequências do gene citocromo <i>b</i> .	32
Tabela 3 - Posição dos sítios polimórficos dos haplótipos de <i>S. guianensis</i> encontrados na análise das sequências de <i>D-Loop</i> .	33
Tabela 4 - Frequência e distribuição geográfica dos haplótipos encontrados entre as sequências do gene citocromo <i>b</i> para <i>S. guianensis</i> .	34
Tabela 5 - Frequência e distribuição geográfica dos haplótipos encontrados entre as sequências do <i>D-Loop</i> para <i>S. guianensis</i> .	35
Tabela 6 - Índices de diversidade molecular obtidos através da análise do gene citocromo <i>b</i> .	36
Tabela 7 - Índices de diversidade molecular obtidos através da análise do marcador molecular <i>D-Loop</i> .	36
Tabela 8 - Diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações de <i>S. guianensis</i> (diagonal inferior) e valores associados de P (diagonal superior) para o gene citocromo <i>b</i> . * $P < 0,05$. ** $P < 0,001$.	38
Tabela 9 - Diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações de <i>S. guianensis</i> (diagonal inferior) e valores associados de P (diagonal superior) para o <i>D-Loop</i> . * $P < 0,05$. ** $P < 0,001$.	38
Tabela 10 - Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se duas metodologias para o cálculo da matriz de distância: método de <i>pairwise difference</i> e estatística F convencional a partir das frequências haplotípicas do gene citocromo <i>b</i> . * $P < 0,05$. ** $P < 0,001$.	38
Tabela 11 - Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se duas metodologias para o cálculo da matriz de distância: método de <i>pairwise difference</i> e estatística F convencional a partir das frequências haplotípicas do <i>D-Loop</i> . * $P < 0,05$. ** $P < 0,001$.	39
Tabela 12 - Valores do teste de <i>goodness-of-fit</i> de <i>Mismatch Distribution</i> , considerando modelos de expansão demográfica e espacial para o gene citocromo <i>b</i> . * $P < 0,05$.	44
Tabela 13 - Valores do teste de <i>goodness-of-fit</i> de <i>Mismatch Distribution</i> , considerando modelos de expansão demográfica e espacial para o <i>D-Loop</i> .	44
Tabela 14 - Valores de D , R_2 e F_s referentes aos testes de neutralidade obtidos da análise do gene citocromo <i>b</i> . Valores entre parênteses correspondem ao P .	44

Tabela 15 - Valores de D , R_2 e F_s referentes aos testes de neutralidade obtidos da análise do <i>D-Loop</i> . Valores entre parênteses correspondem ao P . $*P < 0,05$	45
Tabela 16 - Comparação entre índices de diversidade genética do DNA mitocondrial de diferentes espécies de cetáceos.....	48

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

μ - mi

μg - microgramas

μL - microlitros

μM - micromolar

ACAS - gua Central do Atlântico Sul

AMOVA - Análise de Variância Molecular, do inglês *Analyses of Molecular Variance*

AP - estado do Amapá

citb - Citocromo *b*

CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*

CMS - *Convention on Migratory Species*

DD - dados deficientes, do inglês *data deficient*

D-Loop - do inglês, *Displacement Loop*

DNA - cido Desoxirribonucleico, do inglês *Desoxiribonucleic Acid*

dNTP - Desoxirribonucleotídeo (A, G, C ou T)

GEMAM - Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos da Amazônia

GEMM-Lagos - Grupo de Estudos de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos

GESAMP - *The Group of Experts on Scientific Aspects of Marine Environmental Protection*

h - diversidade haplotípica

Hg - mercúrio

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IOC - *Intergovernmental Oceanographic Commission*

IUCN - *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*

L - litros

m^3/ano - metro cúbico por ano

m^3/s - metro cúbico por segundo

MEGA - programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MgCl_2 - cloreto de magnésio

MJ - *median-joining*

mL - mililitro

mM - milimolar
mtDNA - DNA mitocondrial, do inglês *mitochondrial DNA*
ng - nanogramas
°C - graus Celsius
PA - estado do Pará
pb - pares de bases
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
pmol - picomol
PNUMA - Programa das Nações Unidas para Meio Ambiente
POPs - poluentes orgânicos persistentes
PU - peso úmido
RJ - estado do Rio de Janeiro
RNA - Ácido Ribonucléico, do inglês *Ribonucleic Acid*
SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SSD - desvio da soma dos quadrados, do inglês *sum of square deviations*
Taq - enzima termoestável derivada da bactéria *Thermus aquaticus*
U - unidade
UNEP - *United Nations Environment Programme*
 α - alfa
 π - diversidade nucleotídica
 Φ - phi

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a caracterização genética de populações do boto-cinza (*Sotalia guianensis*), espécie apontada como potencial sentinela por ser um dos mamíferos aquáticos mais comuns na zona costeira do estado do Rio de Janeiro, uma área de intensa atividade antrópica. Foram analisadas 29 amostras do Rio de Janeiro, 9 do Pará e 41 do Amapá. Para as análises moleculares e populacionais foram sequenciados o gene mitocondrial citocromo *b* (*citb*) e parte da região controladora do DNA mitocondrial. A análise do *citb* revelou a existência de 10 haplótipos sendo apenas um deles compartilhado pelas três populações. No entanto, a análise do *D-Loop* revelou 20 haplótipos sendo que nenhum destes foi compartilhado pelas três populações. A diversidade nucleotídica do *citb* encontrada nas populações do norte foi aproximadamente três vezes maior que a encontrada para o Rio de Janeiro, e a diversidade haplotípica foi apenas um pouco maior nas populações do norte em relação a encontrada para o Rio de Janeiro. Já para o *D-Loop* esta diferença foi ainda maior, sendo a diversidade nucleotídica do Rio de Janeiro aproximadamente nove vezes menor que das populações do norte, e a diversidade haplotípica três vezes menor. Os valores de F_{ST} par a par foram significativos para os dois marcadores moleculares indicando a existência de estruturação entre as populações do norte e do Rio de Janeiro. Na AMOVA, estimativa Φ_{ST} mostrou que a maior variabilidade genética do *citb* encontra-se dentro das populações, porém ao nível do marcador *D-Loop*, os testes de Φ_{ST} e o Φ_{CT} indicaram que a variabilidade genética ocorre proporcionalmente entre os grupos e dentro das populações. O teste de Mantel não foi significativo para os dois marcadores embora o modelo de isolamento por distância seja condizente com o reduzido deslocamento realizado pelo boto-cinza de aproximadamente 30 Km. Os resultados das análises demográficas e a topologia encontrada na rede de *median-joining* sugerem que a população do Rio de Janeiro sofreu um processo de expansão demográfica recente e consequentemente, uma redução ancestral da variabilidade genética do boto-cinza através de efeito fundador. Através dos resultados deste estudo concluímos que a precária condição de saúde do boto-cinza que vem sendo relatada principalmente para o sul e sudeste do Brasil, pode estar sendo agravada pela baixa variabilidade genética encontrada nesta população como consequência da redução da capacidade adaptativa da espécie.

ABSTRACT

The aim of this study was to genetically characterize populations of the guiana dolphin (*Sotalia guianensis*), a species considered as a good candidate to use as a marine sentinel in the coastal of Rio de Janeiro, an area of intense human activity. We analyzed 29 samples from Rio de Janeiro, 9 samples from Pará and 41 from Amapá. For the molecular analysis were sequenced the mitochondrial cytochrome b gene (citb) and part of the control region of mitochondrial DNA (*D-Loop*). The analysis of citb revealed 10 haplotypes and only one shared by the three populations. However, analysis of the *D-loop* revealed 20 haplotypes and none of them were shared by the three populations. The citb nucleotide diversity found in northern populations was approximately three times higher than that found in Rio de Janeiro, and the haplotype diversity was only slightly higher in northern populations in relation to observed for Rio de Janeiro. *D-Loop* analysis showed that this difference was even greater, the nucleotide diversity of Rio de Janeiro was about nine times lower than that of northern populations, and haplotype diversity was three times smaller. The pairwise F_{ST} was significant for the two molecular markers indicating the existence of population structure among Rio de Janeiro and the northern populations. In the AMOVA, Φ_{ST} showed that the greatest genetic variability of citb was found within populations, but the *D-Loop* analysis, Φ_{ST} and Φ_{CT} indicated that genetic variability occurs in the same proportion between groups and within populations. The Mantel test was not significant for both markers although the model of isolation by distance is consistent with the limited movement performed by the guiana dolphin, that was about 30 Km. Results of demographic analysis and the topology found in the median-joining network suggests that Rio de Janeiro population experienced a recent demographic expansion process and therefore a reduction of the ancestral genetic variability of guiana dolphin through founder effects. We concluded that the precarious condition of health of the guiana dolphin may be being exacerbated by low genetic variability found in this population as a consequence of reduced adaptive capacity of the species.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da vida humana é, direta ou indiretamente, dependente da saúde, vitalidade e vigor do ambiente que nos rodeia. Componentes bióticos e abióticos, incluindo ar, água, solo, alimentos e plantas e os animais constituem o nosso ambiente, e através destas interações complexas, a vida é sustentada (YASSI *et al.*, 2001). A deterioração da saúde de qualquer um desses componentes pode ter sérios efeitos sobre a continuidade da vida. O ambiente aquático, que cobre dois terços do planeta, é habitado pela maioria das espécies existentes em diferentes nichos ecológicos, além disso, muitos deles são importantes fontes de alimento humano.

Estima-se que a população mundial tenha atingido 6,6 bilhões em 2007, com um crescimento projetado para 9,3 bilhões em 2050, sendo os países em desenvolvimento os principais responsáveis por este acréscimo (HAUB, 2007). Aproximadamente 65% da população humana vive a uma distância de até 159 km da linha da costa e têm seu crescimento estimado em 75% até 2025 (COHEN, 1995). Além disso, uma proporção significativa das maiores cidades do mundo está ligada, direta ou indiretamente, com o ambiente marinho (TIBBETTS, 2002). O ambiente aquático, portanto, desempenha um papel vital para o funcionamento dos ecossistemas, da saúde humana e da civilização.

1.1. A Saúde do Ecossistema Marinho

O conceito de ecossistema pode ser definido como um sistema dinâmico de relações interdependentes entre os organismos vivos e o meio físico (YASSI *et al.*, 2001). É uma entidade fechada que adquiriu ao longo da evolução estabilidade e equilíbrio interno. Um ecossistema não pode suportar grandes quantidades de energia consumida por uma espécie, sem privar outras, ou seja, qualquer instabilidade pode colocar em risco a viabilidade de todo o ecossistema (YASSI *et al.*, 2001).

Neste sistema complexo, os problemas ambientais estão intimamente ligados, ou são influenciados por outros fatores, como é o caso dos problemas encontrados no ambiente marinho. Eles não podem ser reparados sem levar em conta a interdependência ecológica dos oceanos, as zonas costeiras e os sistemas de água doce a eles associados (GESAMP, 2001a; YASSI *et al.*, 2001).

Os processos ecológicos e os ecossistemas são fortemente influenciados por sistemas sociais e econômicos. A Conferência de Estocolmo e outros relatórios contemporâneos reconhecem como a principal causa das alterações no ambiente marinho o desenvolvimento social e econômico acelerado e o mal planejado das áreas costeiras, que é consequência do aumento da densidade demográfica, da urbanização e industrialização, do transporte marítimo e do turismo (GESAMP, 2001a; KNAP *et al.*, 2002; TIBBETTS, 2002; PNUMA, 2004)

De forma geral, nas últimas décadas, a degradação de ambientes costeiros tem se intensificado. Em 1972, a Conferência de Estocolmo reconheceu a poluição marinha, a exploração excessiva dos recursos naturais e a destruição dos habitats como as maiores ameaças aos ambientes marinhos costeiros. Por todo o mundo, o esgoto despejado nos oceanos continua a ser a maior fonte de contaminação do meio ambiente marinho e costeiro em termos de volume. Historicamente, acreditava-se que a introdução de nutrientes no oceano através do esgoto, agricultura e atividades industriais era uma boa iniciativa tendo em vista o crescimento gerado pela produção biológica (GESAMP, 2001a). Dentre as principais consequências da introdução do carbono orgânico e da fertilização dos oceanos incluem o crescimento de organismos patogênicos humanos nos oceanos, eventos de floração de algas, principalmente algas tóxicas nocivas à saúde humana e a redução de oxigênio em áreas costeiras (UNEP, 2006).

O fitoplâncton é o produtor primário da teia trófica marinha, ou seja, é responsável pela produção de oxigênio e seu crescimento sustenta todos os níveis da cadeia alimentar. O esgoto age como um fertilizante que contribui para proliferação do fitoplâncton (ODUM, 1988). Este cresce de forma desordenada, prejudicando outros organismos que compõe o sistema. O *bloom* de algas tóxicas, como ocorre nas chamadas marés vermelhas (BADEN, 1983; STEIDINGER e BADEN, 1984), pode causar a morte de carnívoros que estão no topo da teia trófica através da bioacumulação das substâncias tóxicas como ocorreu em 1996 ao longo da costa sudoeste da Flórida (BOSSART *et al.*, 1998). Neste episódio, aproximadamente 149 peixes-boi (*Trichechus manatus latirostris*) morreram em uma epizootia sem precedentes. Após uma série de exames laboratoriais, descobriu-se que a inalação e/ou a ingestão da brevetoxina foi responsável por este evento (BOSSART *et al.*, 1998). No mesmo período e na mesma área ocorreu um *bloom* de dinoflagelados (*Gymnodinium breve*) que produziu uma elevada quantidade de toxinas na água.

Atualmente, as maiores preocupações em nível mundial estão relacionadas aos Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), pois muitos destes são transportados globalmente pela atmosfera e pelos oceanos. Existem cada vez mais estudos mostrando que longas exposições a pequenas quantidades destes poluentes causam problemas reprodutivos, imunológicos e neurológicos em organismos marinhos e possivelmente em seres humanos (TABUCHI *et al.*, 2006; WEBER *et al.*, 2008; IMAEDA *et al.*, 2009; ISOBE *et al.*, 2009; LAMON *et al.*, 2009).

1.2. Possíveis Efeitos Genéticos da Contaminação Ambiental

Durante as últimas três décadas, a comunidade científica tem demonstrado um maior interesse e intensificado os estudos sobre os efeitos a longo prazo dos estressores

ambientais sobre a saúde humana e a sustentabilidade dos ecossistemas (GESAMP, 2001b; UNEP, 2006). Estas preocupações têm sido intensificadas pelo expressivo aumento dos relatórios sobre as mudanças climáticas e o aquecimento global, a deposição do nitrogênio, liberações de produtos químicos industriais no ambiente, além da perda da biodiversidade global acompanhada pela redução da variabilidade genética nas populações naturais (BICKHAM *et al.*, 2000).

Embora a exposição de organismos aquáticos a contaminantes genotóxicos possa representar um risco para a saúde humana através da cadeia trófica, há também um risco ecológico que pode levar a mutações hereditárias e perda da diversidade genética total (intra ou inter espécies), com implicações significativas para a sobrevivência a longo prazo das populações naturais (ANDERSON *et al.*, 1994; BICKHAM *et al.*, 2000). Exemplos que demonstram que os animais respondem à poluição antropogênica por meio da adaptação e da microevolução tornam-se cada vez mais frequentes nas publicações científicas (STATON *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2007; BOURRET *et al.*, 2008; FRATINI *et al.*, 2008; GARDESTROM *et al.*, 2008; CLEMENTS e ROHR, 2009; COE *et al.*, 2009; KNAPEN *et al.*, 2009; MATSON *et al.*, 2009; MEEKS *et al.*, 2009).

Estudos têm apontado que a exposição aos agentes químicos mutagênicos pode causar redução da população pelos efeitos somáticos e hereditários das mutações (HEBERT e LUIKER, 1996; HAWKINS, 1998; BELFIORE e ANDERSON, 2001; CHEN *et al.*, 2003; BERCKMOES *et al.*, 2005; JOHNSTON *et al.*, 2008). Além disso, fatores estocásticos (ou aleatórios) sobre populações reduzidas somados ao aumento da taxa de mutação resultante da exposição química podem causar a redução do *fitness* e acelerar o processo de extinção da população (BICKHAM *et al.*, 2000; van STRAALLEN e TIMMERMANS, 2002; SPIELMAN *et al.*, 2004; FRANKHAM *et al.*,

2008). Efeitos indiretos causados por outra classe de contaminantes, chamados disruptores endócrinos, também podem ocorrer, porém de forma latente acumulando-se pelas próximas gerações. Os disruptores endócrinos são substâncias químicas que interferem no metabolismo endócrino através de processos epigenéticos que afetam a linhagem germinal levando a alterações reprodutivas hereditárias (ANWAY e SKINNER, 2006; NILSSON *et al.*, 2008).

Em contrapartida, apesar de viver em ambientes poluídos, alguns organismos têm se mostrado capazes de alcançar o sucesso reprodutivo e de se desenvolver (BOL'SHAKOV e MOISEENKO, 2009). A este fenômeno dá-se o nome de tolerância que pode ser definida como a capacidade de certos indivíduos de suportar a exposição às concentrações de agentes tóxicos que são prejudiciais ou letais para outros indivíduos (CHESSER e SUGG, 1996). Neste caso, a seleção natural agirá em favor da maioria dos indivíduos tolerantes, ou seja, aqueles capazes de ativar os seus mecanismos intrínsecos de sobrevivência. Por ser geneticamente determinada, a tolerância é herdada e, desta forma, a exposição prolongada a esta pressão seletiva pode dar origem a ecótipos locais capazes de sobreviver e reproduzir em condições de poluição tóxica (BOL'SHAKOV e MOISEENKO, 2009). Corroborando os fundamentos de genética de populações (FRANKHAM, 2003), um número crescente de estudos tem mostrado que populações naturais com diversidade genética reduzida parecem menos capazes de se adaptar às alterações ambientais (LANDE e SHANNON, 1996; REED *et al.*, 2002; FRANKHAM, 2003).

Os níveis de variabilidade genética de uma população podem ser alterados por uma variedade de processos naturais, como fluxo gênico, que é a troca efetiva de migrantes entre as populações, a hibridação interespecífica, e mutações (FUTUYMA, 2002). A variabilidade genética pode ser reduzida pelo efeito de *bottlenecks* e da seleção

natural resultantes de processos históricos, como doenças ou mudanças climáticas (FRANKHAM, 2003). Além disso, as variações sazonais e outros padrões de flutuação populacional, como os ciclos observados em algumas espécies de roedores e insetos, podem alterar os níveis de variabilidade genética de uma população (BICKHAM *et al.*, 2000; FUTUYMA, 2002).

Dois métodos gerais são usados para distinguir entre as alterações genéticas causadas por processos naturais, como as descritas anteriormente, e alterações induzidas quimicamente (BELFIORE e ANDERSON, 1998). O primeiro método envolve o uso de análises filogenéticas, nas quais novas mutações devem ser de baixa frequência e diferem do seu haplótipo ancestral por apenas um único par de base. Neste caso, a análise deve mostrar os haplótipos recém-surgidos nas pontas dos ramos da árvore filogenética. Quando são observadas variantes nos ramos mais internos da árvore ou que diferirem por mais de uma substituição do haplótipo relacionado serão provavelmente o resultado de fluxo gênico de populações vizinhas, ou seja, resultado de causas naturais. O segundo método depende do delineamento do estudo. Em qualquer estudo em que as populações naturais estejam sendo utilizadas para investigar os efeitos de contaminantes, é fundamental utilizar uma população de referência, bem como uma população experimental. Quando um padrão consistente é observado entre várias populações de referência e várias populações expostas, é mais provável que os efeitos dos contaminantes estejam causando este padrão. Isso ocorre porque os processos naturais que poderiam criar um padrão semelhante, como a migração ou as doenças, tendem a ser de natureza estocástica, não sendo susceptíveis de afetar apenas a população referência, ou apenas as populações expostas. Outros fatores que podem ser incorporados no delineamento dos estudos de campo incluem correlacionar efeitos genéticos observados com níveis de contaminantes ambientais encontrados nos tecidos,

bem como a utilização de múltiplas populações para investigar um efeito de gradiente, como uma área próxima de uma fonte de contaminação. Finalmente, o uso de biomarcadores para identificar efeitos somáticos pode ser empregado em conjunto com estudos genéticos para fornecer uma ligação convincente entre os efeitos de contaminantes em vários níveis de organização biológica (BELFIORE e ANDERSON, 1998).

Abordagens genéticas podem oferecer poderosas ferramentas para analisar o *status* atual das populações, inferir sobre a história evolutiva, além de antecipar as direções futuras. A investigação sobre os efeitos da exposição de contaminantes em sistemas biológicos tem historicamente se focado em mecanismos de danos no DNA, e pesquisadores têm estudado principalmente organismos expostos em ensaios de laboratório (BELFIORE e ANDERSON, 1998). Recentemente, uma ênfase maior está sendo colocada em estudar populações residentes para relacionar as respostas em populações naturais para a compreensão dos mecanismos atuais (ANDERSON *et al.*, 1994; BICKHAM *et al.*, 2000). Estudos populacionais proporcionam a base necessária para compreender e prever os efeitos em níveis mais elevados de organização, incluindo as comunidades e as escalas da paisagem.

1.2.1. DNA Mitocondrial em Estudos de Populações Naturais

Dentre os marcadores moleculares utilizados atualmente para acessar a variabilidade genética dentro e entre populações, o DNA mitocondrial (mtDNA) foi escolhido para este estudo por ser amplamente empregado em estudos voltados à determinação dos níveis de diversidade genética de populações naturais (AVISE, 2000; SUNNUCKS, 2000; ZHANG e HEWITT, 2003; GARANT e KRUIK, 2005; CHENUIL, 2006).

O mtDNA tornou-se a parte mais bem conhecida do DNA eucariótico por ser mais fácil de purificar do que os outros segmentos do DNA nuclear (WILSON *et al.*, 1985). A fácil purificação é resultado do elevado número de cópias em cada célula e pela localização fora do núcleo. O genoma também é fácil de ser caracterizado, pois tem comprimento variando entre 15.000 e 17.000 pares de bases (WILSON *et al.*, 1985).

O genoma mitocondrial possui 37 genes funcionais sem grandes espaços intergênicos. Estes *loci* codificam 22 RNAs transportadores, dois RNAs ribossômicos e 13 RNAs mensageiros para a síntese de subunidades de proteínas específicas envolvidas na fosforilação oxidativa e no transporte de elétrons (de LA CRUZ *et al.*, 1984). O gene citocromo *b* é responsável por codificar a proteína citocromo *b* do complexo III da cadeia respiratória (ou sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial (HATEFI, 1985). O mtDNA possui uma estrutura simples e condensada, sendo que o único fragmento não codificante é a região controladora que tem função regulatória na dinâmica da molécula e é rica em bases AT. Nos vertebrados esta região é chamada *D-loop* (*Displacement-loop*) devido a formação de uma estrutura de fita tripla no começo da replicação do mtDNA (BROWN *et al.*, 1979).

Do ponto de vista da aptidão para os estudos comparativos, o mtDNA tem a vantagem de ser universalmente distribuído no reino animal e possuir notavelmente conteúdo gênico uniforme (AVISE, 2004). Os tipos de mudança evolutiva que o mtDNA animal pode sofrer são relativamente simples, ocorrendo principalmente substituições de bases e mudanças no comprimento das regiões repetitivas, e esta acumulação de bases ocorre predominantemente nas pequenas regiões não-codificantes (WILSON *et al.*, 1985). Devido a sua rápida evolução, com uma taxa média de cinco a dez vezes mais rápida que o DNA nuclear, o mtDNA é considerado um bom marcador molecular para o estudo de diferenciações genéticas recentes (BROWN *et al.*, 1979).

Algumas hipóteses tem sido sugeridas na tentativa de entender esta característica, como a ineficiência do sistema de reparo da mitocôndria, a alta exposição a radicais livres produzidos no interior da organela e o fato do mtDNA estar livre de histonas que são evolutivamente conservadas e poderiam limitar a taxa evolutiva do DNA nuclear (BROWN *et al.*, 1979; BROWN *et al.*, 1982; AVISE, 2000).

A ampla utilização deste marcador em estudos filogenéticos e filogeográficos está relacionada, principalmente, as suas altas taxas evolutivas e ao padrão de herança matrilinear (HARRISON, 1989; AVISE, 2004). Uma vez que mtDNA é haplóide a variabilidade existente entre os indivíduos de uma população é introduzida exclusivamente pela mutação. Desta forma, a filogenia de uma espécie desvendada pela análise desta molécula representa, em última instância, a história evolutiva das fêmeas (WILSON *et al.*, 1985; HARRISON, 1989; CASTRO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2008). Esta característica é uma das limitações desse marcador molecular, uma vez que poucas inferências podem ser feitas a respeito da dispersão dos machos através do mtDNA. Outra característica peculiar do mtDNA é o fato de que seu tamanho populacional efetivo corresponde a um quarto dos genes nucleares autossômicos, fazendo com que ele sofra uma taxa proporcionalmente mais rápida de diferenciação genética através da deriva genética (WILSON *et al.*, 1985). Essa rápida diferenciação permite detectar a existência de uma estruturação populacional mesmo que a separação das populações tenha ocorrido recentemente em termos evolutivos (AVISE, 2004).

Do ponto de vista metodológico, o grande número de estudos que utilizam o mtDNA como marcador molecular está relacionado ao advento da técnica de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) e a utilização de iniciadores universais, os quais possibilitam a amplificação de regiões homólogas mesmo entre grupos distintos evolutivamente. Além disso, devido ao grande número de cópias por célula, esta região

do genoma pode ser estudada a partir de quantidades muito pequenas de tecido, ou mesmo tecidos degradados.

1.3. Mamíferos Marinhos: Sentinelas da Qualidade do Ecossistema Aquático

Existem 118 espécies viventes de mamíferos marinhos, divididas em três ordens: Sirenia, Carnivora e Cetacea (PERRIN *et al.*, 2002). Embora estas ordens não compartilhem os mesmo ancestrais, todos os mamíferos marinhos estão adaptados anatomicamente e fisiologicamente ao ecossistema aquático e dele são dependentes. Esta dependência faz deste grupo uma sentinela natural das alterações e da degradação do ambiente (MOORE, 2008).

Segundo Harwood (2001), os mamíferos marinhos estão sofrendo uma forte pressão seletiva originada pela rápida alteração do seu hábitat, o qual ele define como uma unidade ecológica necessária para o sucesso reprodutivo e alimentar. Como são predadores de topo na cadeia alimentar (Figura 1) podem acumular altas concentrações de poluentes nos seus tecidos pelos processos de bioacumulação e biomagnificação (WELLS *et al.*, 2004). Um estudo avaliando os efeitos das mudanças climáticas a longo prazo nos mamíferos marinhos realizado por Moore (2005), concluiu que pelo fato destes organismos integrarem e refletirem uma variação ecológica através de uma larga escala temporal e espacial, eles são as principais sentinelas das alterações no ambiente marinho.

O uso potencial dos mamíferos marinhos como sentinela não se resume a sua ampla distribuição pelos oceanos. Como são animais de vida longa que possuem uma espessa camada de gordura, estes mamíferos são um ótimo depósito de poluentes lipofílicos (AGUILAR *et al.*, 1999; O'HARA e O'SHEA, 2005). Embora os níveis reais de poluentes nos tecidos de mamíferos marinhos sejam mediados por uma série de

processos biológicos e ecológicos (ROSS *et al.*, 2000), um crescente número de estudos ilustram a utilidade deste grupo para indicar a prevalência e a persistência dos poluentes nos ecossistemas marinhos (HOEKSTRA *et al.*, 2003). Além disso, os perfis de isótopos de carbono (DEHN *et al.*, 2006) e de ácidos graxos (IVERSON *et al.*, 2004; BUDGE *et al.*, 2006) na gordura podem ser usados para fazer inferências sobre a dieta dos animais, assim como fornecer evidências de alterações ocorridas dentro da cadeia alimentar nos ecossistemas marinhos.

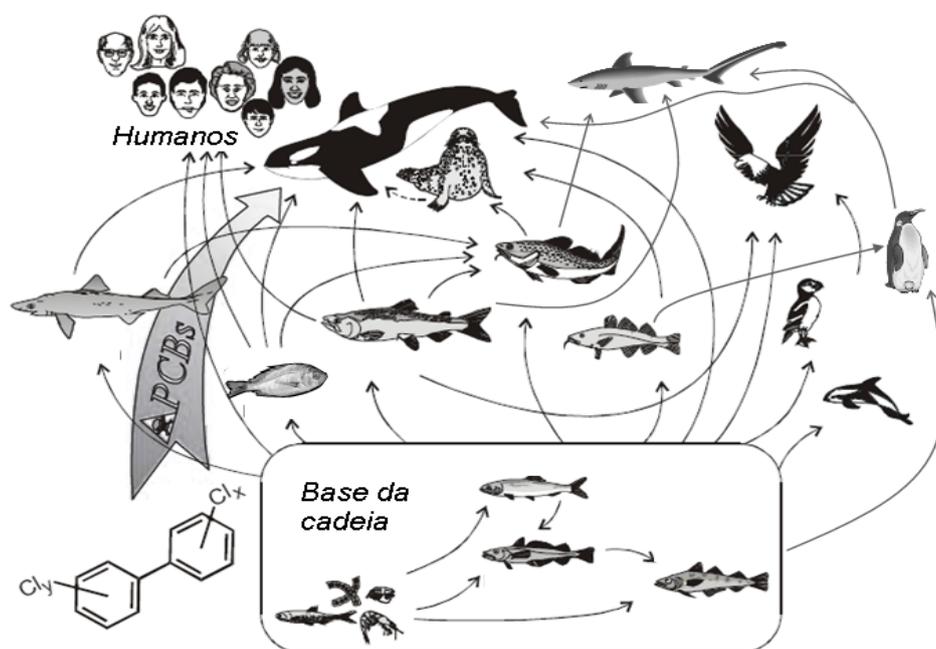


Figura 1 - Fluxograma ilustrativo da bioacumulação de contaminantes na cadeia trófica marinha, que inclui a espécie humana e os mamíferos marinhos como animais no topo da cadeia trófica. Adaptado de Ross & Birnbaum (2003).

Dentre as espécies de mamíferos marinhos que ocorrem na costa brasileira, o boto-cinza (*Sotalia guianensis*) foi apontado como bom candidato a espécie sentinela (MOURA, 2009) por ser um dos mamíferos aquáticos mais comuns na zona costeira do estado do Rio de Janeiro, uma área de intensa atividade antrópica (BOROBIA *et al.*, 1991; LODI e HETZEL, 1998; LODI, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2007; NERY *et al.*, 2008). Além disso, *S. guianensis* é bastante estudado ao longo da

costa brasileira (SIMÕES-LOPES, 1988; BARROS *et al.*, 1998; GEISE *et al.*, 1999; CREMER, 2000; SANTOS *et al.*, 2000; YOGUI *et al.*, 2003; FLORES e BAZZALO, 2004; EMIN-LIMA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2007) e de outros países dentro de sua área de distribuição (EDWARDS e SCHNELL, 2001; GARCÍA e TRUJILLO, 2004; ACEVEDO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; MAY-COLLADO e WARTZOK, 2009)

O boto-cinza possui distribuição contínua, desde Honduras até a Baía Norte em Santa Catarina, no sul do Brasil (SIMÕES-LOPES, 1988; BOROBIA *et al.*, 1991; EDWARDS e SCHNELL, 2001). Diversos estudos têm apontado que *S. guianensis* apresenta fidelidade aos seus sítios de alimentação e reprodução associado a ambientes estuarinos com até 30 metros de profundidade (GEISE *et al.*, 1999; CREMER, 2000; DI BENEDITTO *et al.*, 2001; EDWARDS e SCHNELL, 2001; LODI, 2002). Esta espécie geralmente forma grupos pequenos de 2 a 10 indivíduos (GEISE, 1991; da SILVA e BEST, 1994; CREMER, 2000; AZEVEDO *et al.*, 2005; EMIN-LIMA *et al.*, 2006). No entanto, grandes agregações foram registradas em baías do Rio de Janeiro: 450 indivíduos na Ilha Grande (LODI e HETZEL, 1998), até 200 indivíduos na Baía de Sepetiba (SIMÃO *et al.*, 2000) e cerca de 100 golfinhos na Baía de Paraty. (LODI, 2002) (Figura 2).



Figura 2 - Grande agregação de botos-cinza na Baía de Sepetiba. Foto: Leonardo Flach.

A alimentação do boto-cinza é composta basicamente de espécies pelágicas e demersais de peixes e cefalópodes (BARROS *et al.*, 1998), sugerindo que a espécie se alimenta em diferentes profundidades. Na costa central do Rio de Janeiro e em uma região estuarina do estado de São Paulo, estudos demonstraram maior importância de peixes do que de cefalópodes na dieta de *S. guianensis* (SANTOS *et al.*, 2002; DI BENEDETTO e SICILIANO, 2007).

Este pequeno golfinho apresenta hábitos preferencialmente costeiros e estuarinos (JEFFERSON *et al.*, 1993; SICILIANO *et al.*, 2005). A distribuição próxima ao litoral torna o boto-cinza suscetível aos efeitos das atividades humanas nas zonas costeiras e à degradação de seus habitats. Vale ressaltar que a região costeira brasileira apresenta um quadro preocupante em relação a degradação ambiental, especialmente nas baías e estuários que são o destino final das fontes poluidoras dos grandes centros urbanos (PNUMA, 2002). Estes fatos incluem o boto-cinza entre as espécies de cetáceos do litoral do Brasil sujeitas a um maior nível de pressão antrópica (PNUMA, 2002; FLORES e BAZZALO, 2004; PNUMA, 2004).

Os maiores problemas relacionados à conservação desta espécie são as interações acidentais com redes de pesca (Figura 3) e a degradação do seu hábitat (CMS, 2006). Estudos recentes têm apontado uma precária condição de saúde para o boto-cinza com a identificação de diversas patologias (VAN BRESSEM *et al.*, 2007) e ainda sua alta vulnerabilidade aos contaminantes presentes no ambiente (LAILSON-BRITO *et al.*, 2002; YOGUI *et al.*, 2003; KAJIWARA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2008; DORNELES *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2009b; DORNELES *et al.*, 2010).

Moura (2009) comparou as concentrações de mercúrio (Hg) em amostras de boto-cinza do estuário amazônico e da costa norte do Rio de Janeiro e observou diferenças significativas. As concentrações de Hg em músculo dos botos do estuário variaram de 0,07 a 0,79 $\mu\text{g/g}^{-1}$, sendo que a média dos níveis foi 0,38 $\mu\text{g/g}^{-1}$ PU. Enquanto que nos indivíduos analisados do Rio de Janeiro, as concentrações de Hg foram mais altas, variando de 0,20 a 1,66 $\mu\text{g/g}^{-1}$, sendo a média dos níveis 1,07 $\mu\text{g/g}^{-1}$ PU (Figura 4). Segundo o autor, esta variação está possivelmente vinculada a fatores de contaminação costeira diferenciada para cada localidade de estudo.

O boto-cinza está classificado como “ameaçado de extinção” no apêndice I da CITES (2008) e com status de conservação “desfavorável” no apêndice II da CMS (2006). A lista vermelha da IUCN (2008) classifica *S. guianensis* como dados deficientes (DD – *Data Deficient*) e aponta a necessidade de mais estudos sobre a estrutura e tamanho populacional, diversidade genética, magnitude da mortalidade das capturas acidentais e o nível de contaminação dos espécimes.



Figura 3 - Artefato de pesca preso a dorsal de um espécime de boto-cinza da Baía de Sepetiba. Foto: Leonardo Flach.

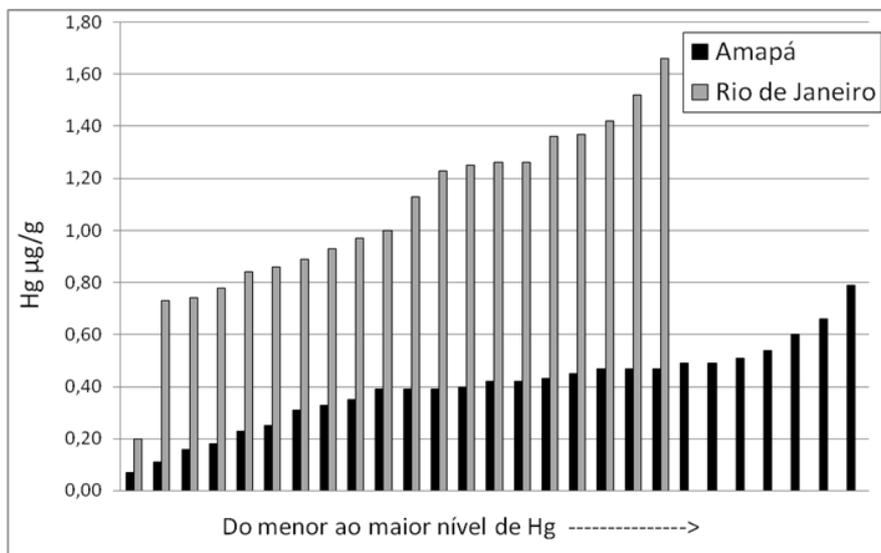


Figura 4 - Distribuição dos níveis de mercúrio em amostras de músculo de botos-cinza (*S. guianensis*) coletados na costa do estado do Amapá e do Rio de Janeiro (MOURA, 2009).

2. OBJETIVOS

Estudos populacionais proporcionam a base necessária para compreender e prever os efeitos da contaminação ambiental em níveis mais elevados de organização. Considerando ainda, que as ameaças a uma espécie podem ocorrer em diversos níveis ao longo de sua distribuição geográfica, é fundamental o reconhecimento e a caracterização da identidade das populações, a fim de que sejam implementados procedimentos de conservação e manejo em escala local.

Com o intuito de contribuir para a obtenção dessas informações para as populações de boto-cinza (*Sotalia guianensis*) das regiões norte e sudeste do Brasil, o objetivo geral deste estudo é caracterizar geneticamente populações de boto-cinza, uma espécie eleita como sentinela de saúde do ecossistema costeiro através da utilização de marcadores moleculares.

2.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar a diversidade genética do boto-cinza através da utilização de dois marcadores moleculares do DNA mitocondrial: a região controladora (*D-Loop*) e o gene citocromo *b* (*citb*);
- Comparar os índices de diversidade molecular das amostras do boto-cinza do Rio de Janeiro com as amostras do norte do Brasil, incluindo os estados do Pará e Amapá;
- Investigar a existência de estruturação populacional para confirmar a presença ou ausência de migração e fluxo gênico entre as supostas populações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

A área de estudo compreende duas áreas regionalmente distintas da costa brasileira: uma área situada na região sudeste, na porção nordeste do estado do Rio de Janeiro e a outra, no extremo norte do Brasil, na região costeira do Amapá e o Pará (Figura 5).

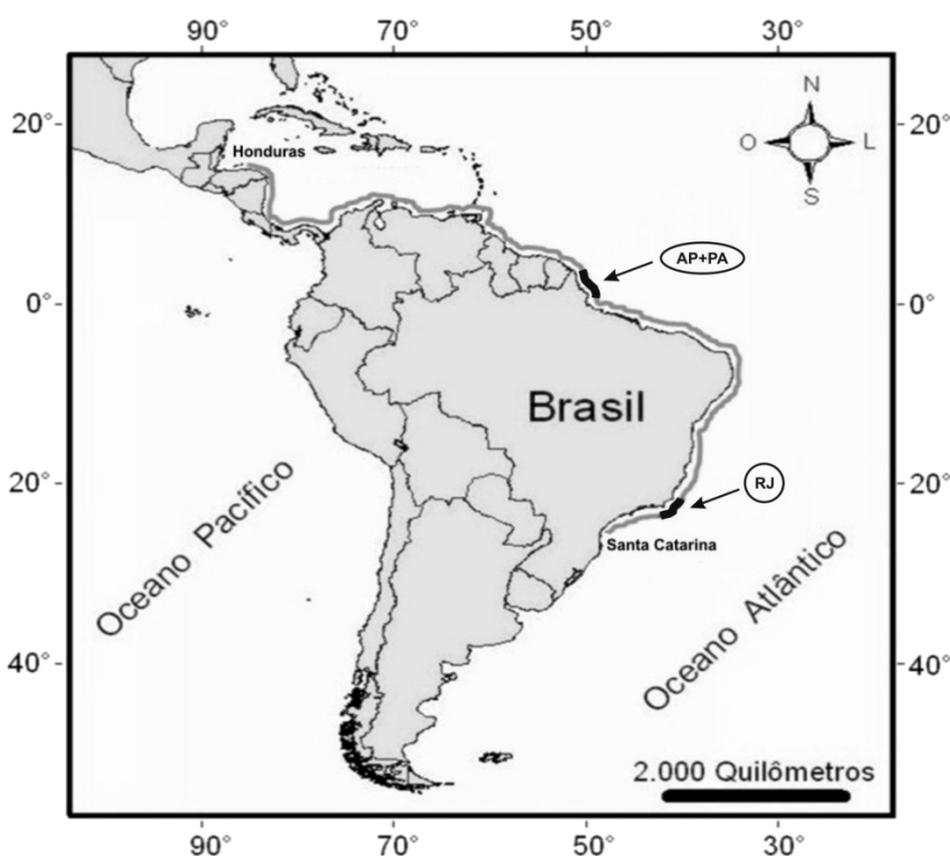


Figura 5 - Mapa com distribuição do boto-cinza (*S. guianensis*) que se estende desde Honduras até Santa Catarina, na região sul do Brasil. As regiões de estudo são marcadas pelas áreas em preto: a área ao norte abrange o estado do Amapá (AP) e Pará (PA) e, na região sudeste, o estado do Rio de Janeiro (RJ).

A costa norte do estado do Rio de Janeiro se estende desde o município de Saquarema, na Região dos Lagos, até Atafona, norte do estado do Rio de Janeiro (Figura 6). A região localizada entre Armação dos Búzios e Atafona recebe importante

aporte de matéria orgânica proveniente de rios localizados nesta região. O Rio Paraíba do Sul, que é o mais importante aporte fluvial do Rio de Janeiro, devido ao seu volume de água, é altamente impactado por receber aportes de atividades industriais, agrícolas e esgoto doméstico não tratado (VALENTIN e MONTEIRO-RIBAS, 1993). O estuário do Rio Paraíba do Sul é uma das áreas mais importantes do estado do Rio de Janeiro em termos de produtividade pesqueira. Esta região representa uma fonte de recursos tróficos para a biota aquática do estuário (BOROBIA *et al.*, 1991), sendo uma área favorável para o desenvolvimento de estudos sobre a acumulação e os impactos contaminantes ao longo da cadeia alimentar.

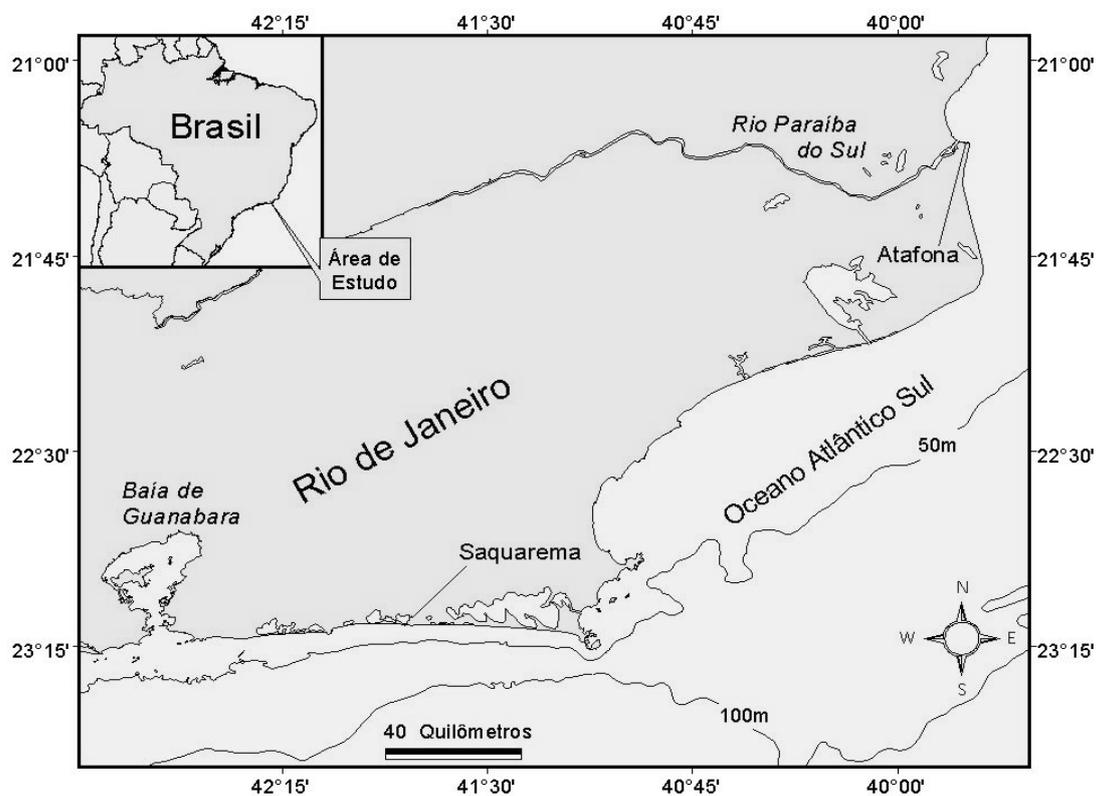


Figura 6 - Mapa com a região norte do estado do Rio de Janeiro. A área de estudo se estende desde o município de Saquarema, na Região dos Lagos, até Atafona, norte do estado do Rio de Janeiro.

Durante a primavera e o verão, ocorre o fenômeno de ressurgência na região que se estende da Armação dos Búzios até Saquarema, caracterizado pelo afloramento da

Água Central do Atlântico Sul (ACAS), pela baixa temperatura, alta salinidade e grande riqueza de nutrientes (MASCARENHAS *et al.*, 1971; GONZALEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 1992). Este fenômeno confere a esta região uma alta diversidade de espécies por situar-se geograficamente na fronteira de duas grandes províncias geográficas, com elementos faunísticos e florísticos de mares temperados, subtropicais e tropicais (VALENTIN e COUTINHO, 1990).

A área de estudo na região norte do Brasil estende-se da costa do Amapá a baía do Marajó no estado Pará (Figura 7). Nesta região destaca-se a influência do rio Amazonas que despeja um volume de água médio de 6,3 trilhões m³/ano, o que representa aproximadamente 16% de toda a água doce descarregada nos oceanos (RICHEY *et al.*, 1986). A descarga máxima de água carregada pelo rio Amazonas para a região marinha chega a 220 mil m³/s, já o transporte máximo de sedimentos é estimado em 1,2 bilhão de ton/ano (MEADE *et al.*, 1985).

A região de estudo é cercada por regiões metropolitanas, como Macapá (AP), Belém (PA) e São Luís (MA). Nestes três centros urbanos costeiros amazônicos estão concentrados, aproximadamente 2,8 milhões de habitantes que, através de um rápido e desordenado processo de urbanização, vem gerando sérios problemas ambientais como: desmatamento, sobrepesca, contaminação do lençol freático, contaminação dos rios e estuários (PEREIRA, 2007).

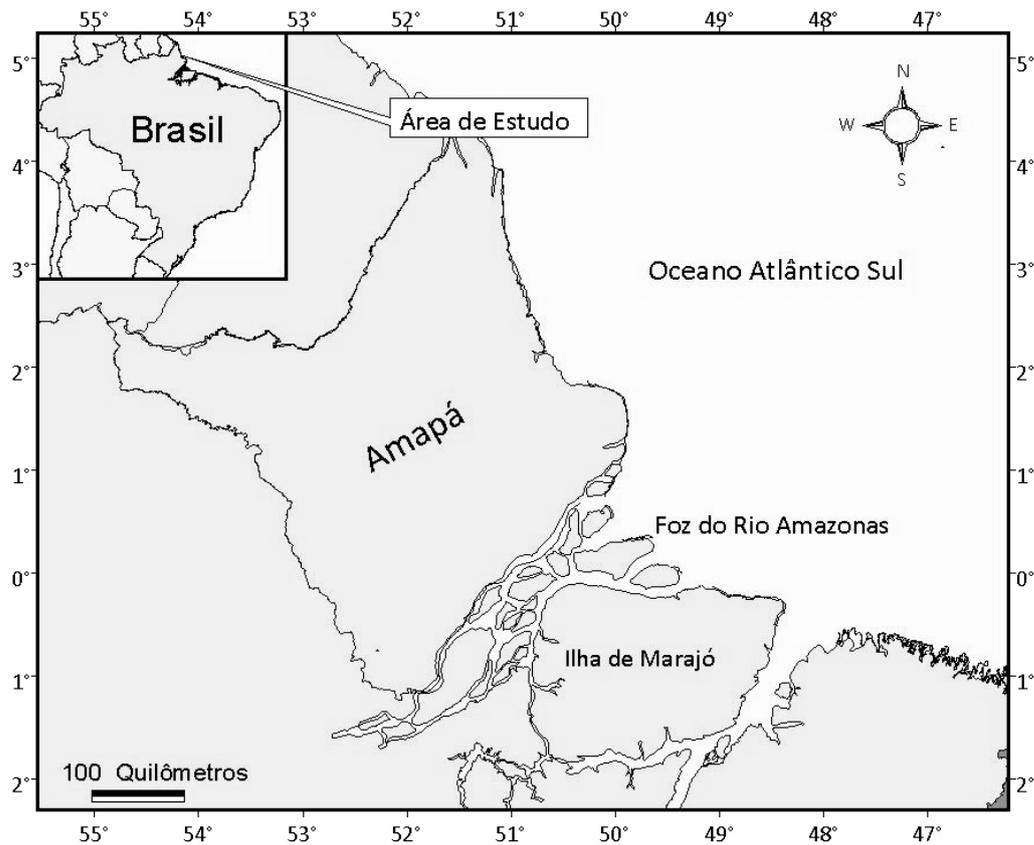


Figura 7 - Mapa da área de estudo que se estende da costa do Amapá a baía do Marajó.

3.2. Obtenção das Amostras

As amostras provenientes do estado do Rio de Janeiro ($n = 29$; Tabela 1) foram obtidas pelo GEMM-Lagos (Grupo de Estudos de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos) sob autorização para atividades com finalidade científica do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO/IBAMA Número 19665-1. Os monitoramentos de praia são conduzidos pelo GEMM-Lagos desde 1999 com a finalidade de coletar material biológico das espécies de mamíferos marinhos que são frequentemente encontrados encalhados ao longo da linha da costa da área de atuação do grupo de pesquisa.

As amostras do Amapá ($n = 41$) e Pará ($n = 7$) foram obtidas de exemplares de boto-cinza capturados acidentalmente em redes de pesca ou carcaças (Tabela 1)

recolhidas pelo GEMAM (Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos da Amazônia) sob autorização para atividades com finalidade científica do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO/IBAMA Número 19605-1.

Tabela 1 - Lista das amostras utilizadas neste estudo, com número de coleta, localidade e se a amostra é proveniente de encalhe (e) ou captura acidental em rede de pesca (c).

Amostras GEMM-Lagos			Amostras GEMAM		
Nº registro	Localidade de Coleta	e/c	No registro	Localidade de Coleta	e/c
GEMM037	Barra de São João, RJ	e	SOTMAR0	Ilha de Marajó, PA	e
GEMM038	Arraial do Cabo, RJ	e	GEMAM039	Ilha de Marajó, PA	e
GEMM047	Macaé, RJ	e	GEMAM040	Ilha de Marajó, PA	e
GEMM048	Quissamã, RJ	e	GEMAM043	Ilha de Marajó, PA	e
GEMM050	Quissamã, RJ	e	GEMAM044	Ilha de Marajó, PA	e
GEMM065	Búzios, RJ	e	GEMAM045	Ilha de Marajó, PA	e
GEMM073	Búzios, RJ	e	GEMAM073	Ilha de Marajó, PA	e
GEMM084	Quissamã, RJ	e	GEMAM077	Marapanim, PA	e
GEMM096	Quissamã, RJ	e	CA001	Amapá	c
GEMM104	Búzios, RJ	e	CA010	Amapá	c
GEMM105	Saquarema, RJ	e	CA040	Amapá	c
GEMM108	Quissamã, RJ	e	CA042	Amapá	c
GEMM111	Búzios, RJ	e	CA044	Amapá	c
SF88	Atafona, RJ	e	CA046	Amapá	c
SF89	Atafona, RJ	e	CA047	Amapá	c
SF90	Atafona, RJ	e	CA048	Amapá	c
SF93	Atafona, RJ	e	CA049	Amapá	c
SF94	Atafona, RJ	e	CA050	Amapá	c
SF95	Atafona, RJ	e	CA051	Amapá	c
SF96	Atafona, RJ	e	CA058	Amapá	c
SF98	Atafona, RJ	e	CA059	Amapá	c
SF100	Atafona, RJ	e	CA060	Amapá	c
SF101	Atafona, RJ	e	CA061	Amapá	c
SF103	Atafona, RJ	e	CA062	Amapá	c
SF104	Atafona, RJ	e	CA063	Amapá	c
SF105	Atafona, RJ	e	CA064	Amapá	c
SF107	Atafona, RJ	e	CA065	Amapá	c
SF109	Atafona, RJ	e	CA066	Amapá	c

Amostras GEMM-Lagos			Amostras GEMAM		
Nº registro	Localidade de Coleta	e/c	No registro	Localidade de Coleta	e/c
SF110	Atafona, RJ	e	CA069	Amapá	c
-----	-----	-----	CA070	Amapá	c
-----	-----	-----	CA072	Amapá	c
-----	-----	-----	CA078	Amapá	c
-----	-----	-----	CA079	Amapá	c
-----	-----	-----	CA080	Amapá	c
-----	-----	-----	CA081	Amapá	c
-----	-----	-----	CA082	Amapá	c
-----	-----	-----	CA083	Amapá	c
-----	-----	-----	CA084	Amapá	c
-----	-----	-----	CA085	Amapá	c
-----	-----	-----	CA086	Amapá	c
-----	-----	-----	CA087	Amapá	c
-----	-----	-----	CA088	Amapá	c
-----	-----	-----	CA090	Amapá	c
-----	-----	-----	CA091	Amapá	c
-----	-----	-----	CA092	Amapá	c
-----	-----	-----	CA093	Amapá	c
-----	-----	-----	CA094	Amapá	c
-----	-----	-----	CA097	Amapá	c
-----	-----	-----	CA098	Amapá	c

3.3. Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento do DNA Mitocondrial

Para extração do DNA total foi utilizado o método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989) modificado por Sholl e colaboradores (2008). Após a extração uma alíquota de 3,0 µL de DNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio a 0,3 µg/mL para estimativa de qualidade e concentração.

Para as análises de DNA mitocondrial de *S. guianensis* foram amplificados dois fragmentos do genoma mitocondrial utilizando diferentes procedimentos.

Um fragmento de aproximadamente 900 pares de bases (pb) da região controladora (*D-Loop*) foi amplificado utilizando os iniciadores descritos por Hoelzel e colaboradores (1991). Para um total de 50,0 µL de reação foram adicionados cerca de 10 ng de DNA; tampão de amplificação 10X (Invitrogen); 0,4 mM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂ (50 mM); iniciadores (0,3 pmol/µL), *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen; 0,04 U/µL), nas seguintes condições: uma etapa inicial a 94°C por 60 segundos; 30 ciclos iniciando a 94°C por 60 segundos; 57°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos, finalizando a fase de extensão a 72°C por 10 minutos.

O gene mitocondrial citocromo *b* (1140 pb) foi completamente amplificado por PCR utilizando um par de iniciadores externos (CASSENS *et al.*, 2000) (Figura 5). Para um total de 50,0 µL de reação foram adicionados 10 ng de DNA, tampão de amplificação 10X (Invitrogen); 0,4 mM de dNTPs 1,5 mM de MgCl₂ (50 mM); iniciadores (0,3 pmol/µL), *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen; 0,04 U/µL), nas seguintes condições: uma etapa inicial a 94°C por 120 segundos; 40 ciclos iniciando a 94°C por 60 segundos; 55°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos, finalizando a fase de extensão a 72°C por 10 minutos.

Uma alíquota de 3,0 μL do produto amplificado foi submetida à eletroforese horizontal com tampão TAE 1x em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio a 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e observados em transiluminador para confirmar se o tamanho do fragmento amplificado corresponde ao tamanho esperado. O produto restante foi purificado de acordo com o protocolo do kit de purificação "GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Pharmacia) para retirada de iniciadores e nucleotídeos livres na solução e visualizado novamente em gel de agarose 1,5%.

As reações de sequenciamento do *D-Loop* foram realizadas utilizando os mesmos iniciadores da reação de PCR, enquanto que para o gene citocromo *b* foram utilizados os iniciadores externos CB-out1 e CB-out2, e os iniciadores internos CB-in1 e CB-in2 (CASSENS *et al.*, 2000; Figura 5). A precipitação, as reações de sequenciamento e o sequenciamento *in situ* foram realizados pela Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA / PDTIS-FIOCRUZ.

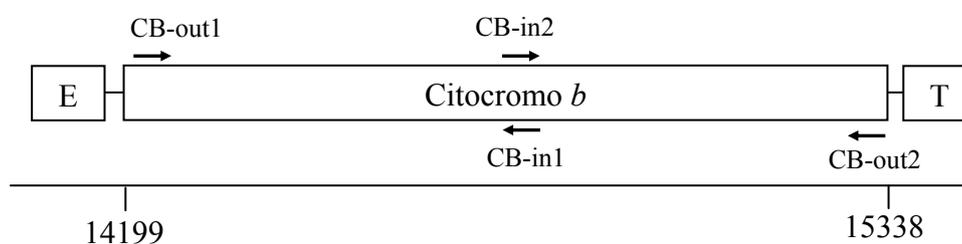


Figura 8 - Localização aproximada dos iniciadores utilizados neste estudo, adaptado de Irwin e colaboradores (1991). Retângulos representam o gene citocromo *b* e a região que o flanqueia, os genes tRNA de Ácido Glutâmico (E) e tRNA de *Lagenorhynchus albirostris* no GenBank (número de acesso: NC_005278.1).

3.4. Análise dos Dados

As sequências obtidas foram alinhadas manualmente utilizando o programa MEGA versão 4 (TAMURA *et al.*, 2007). Nas análises que requeriam estimativa de divergência de sequências (AMOVA, F_{ST} par a par e Índices de diversidade molecular)

foi utilizado o modelo de substituição de nucleotídeos de Tamura e Nei (1993), projetado para sequências de região controle. Este considera a existência de distintas taxas evolutivas para mutações do tipo transição e transversão, assim como a possibilidade de diferenças nas taxas de transição entre bases purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (timina, citosina e uracila).

O programa Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) foi utilizado com o objetivo de:

- Estimar frequências haplotípicas e índices de diversidade molecular, como diversidade genética ou haplotípica (h), a qual é uma função do número de haplótipos associada as suas frequências em cada população; diversidade nucleotídica (π), definida como o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre todos os pares de haplótipos (NEI, 1987).

- Investigar as diferenças entre as supostas populações através dos estimadores análogos ao índice de fixação (F_{ST} par a par, EXCOFFIER *et al.*, 1992) com significância estatística estimada a partir da simulação de 10.000 permutações randômicas. Os valores de F_{ST} par a par, índice de fixação originalmente definido por Wright (1951; 1965), são determinados a partir da permutação dos haplótipos entre pares de populações e podem ser utilizados para estimar as distâncias genéticas a curto prazo entre populações. O valor associado de P consiste na proporção de permutações que conduzem a valores de F_{ST} maiores ou iguais aos observados. Esta análise trabalha com a hipótese nula de que não existe diferenciação entre as populações (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Assim, valores de F_{ST} significativos ($P < 0,05$) conduzem à rejeição da hipótese nula, ou seja, indicam que há diferenças significativas entre as populações analisadas. Já valores de F_{ST} não significativos ($P > 0,05$) corroboram a hipótese nula, indicando que não há diferenças significativas entre elas.

- Avaliar a estrutura genética das supostas populações através da análise de variância molecular ou AMOVA (EXCOFFIER *et al.*, 1992) com 10.000 permutações para os valores associados de P . Esta análise testa a estrutura genética das populações através da determinação dos valores de estatística Φ e a significância dos índices de fixação foi testada usando uma abordagem de permutação não paramétrica descrita por Excoffier, Smouse & Quattro (1992), consistindo na permutação de haplótipos, indivíduos ou populações, entre indivíduos, populações ou grupos de populações: Φ_{CT} (variância entre os grupos em relação à variação total), Φ_{SC} (variância entre as populações dentro dos grupos) e Φ_{ST} (variância entre as populações em relação à variação total). Valores não significativos ($P > 0,05$) indicam que não existe diferenciação entre as populações ou que a estrutura proposta para elas *a priori* não representa adequadamente sua estruturação. Os valores de estatística Φ foram calculados inicialmente usando o método de distância de *pairwise difference* e na segunda vez, pelo método da estatística F convencional a partir de frequências haplotípicas (LONG, 1986).

- Correlacionar matrizes de distâncias genéticas (F_{ST} ou análogos) e geográficas entre as populações de *S. guianensis* deste estudo através do teste de Mantel (MANTEL, 1967) com 1.000 permutações. Este teste consiste em avaliar a significância da correlação entre duas ou mais matrizes através de permutação, definindo o coeficiente de correlação entre os elementos dessas matrizes (EXCOFFIER *et al.*, 2005). As distâncias geográficas foram estimadas em quilômetros com o auxílio do programa Google Earth 2009. Os dados genéticos e geográficos foram compilados em gráficos através do Microsoft Office Excel 2007. Tais gráficos permitem visualizar como a estrutura dessas populações é influenciada pelos diferentes modelos de fluxo gênico (FUTUYMA, 2002), dentre os quais se encontram os de: panmixia, ilhas, isolamento por distância e *stepping-stones* (Figura 9).

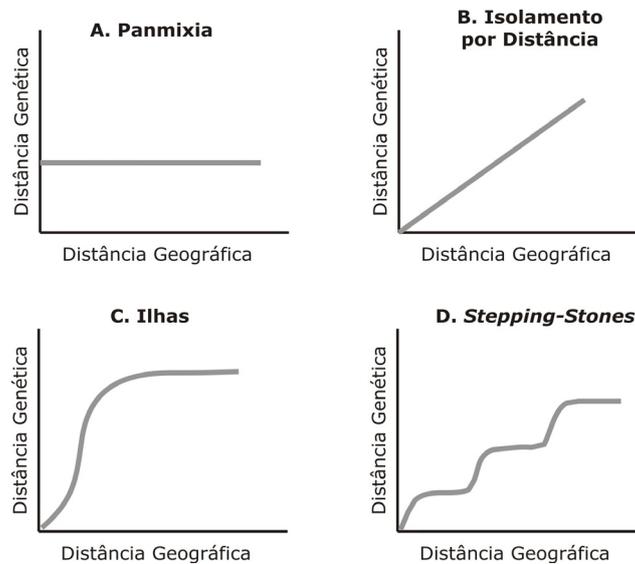


Figura 9 - Exemplos de gráficos de correlação entre distâncias genéticas e geográficas que permitem inferir sobre os modelos de fluxo gênico que influenciam a estrutura das populações.

- Testar a hipótese de expansão populacional através de *Mismatch Distribution* (SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999). Esta análise descreve a distribuição de diferenças nucleotídicas entre pares de sequências de DNA, neste caso de haplótipos de DNA mitocondrial, baseado no modelo de expansão populacional súbita (ROGERS e HARPENDING, 1992; HARPENDING *et al.*, 1998; SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999). Através dela é possível analisar a história demográfica das populações porque a forma das distribuições é afetada por assinaturas genéticas de expansão ou declínio populacional, o que pode ser utilizado para inferir sua dinâmica histórica usando modelos baseados na teoria da coalescência (ROGERS e HARPENDING, 1992; HARPENDING *et al.*, 1998). De forma geral, populações que estão em equilíbrio demográfico a um longo tempo apresentam distribuições caóticas e irregulares (multimodais), enquanto que aquelas que passaram por expansão demográfica recente, resultado de efeito gargalo (*bottlenecks*) ou de efeito fundador, apresentam distribuições homogêneas (unimodais). Intervalos de confiança ao redor do *mismatch distribution* foram calculados pelo método de percentil e baseados em 1.000 réplicas de *bootstrap* e

nível de significância (α) de 0,050. Valores de P maiores que 0,05 conduzem à não rejeição da hipótese nula, ou seja, indicam que a distribuição das diferenças é compatível com a hipótese de expansão populacional súbita. A validade do modelo de expansão súbita foi testada utilizando a abordagem paramétrica de *bootstrap* usando o desvio da soma de quadrados (SSD) entre a distribuição observada e esperada como um teste estatístico (Teste de Aderência; SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999).

O programa DnaSP v5 (LIBRADO e ROZAS, 2009) foi utilizado para calcular os testes de neutralidade D (TAJIMA, 1989), R_2 (RAMOS-ONSINS e ROZAS, 2002) e F_s (FU, 1997). Segundo a classificação de Ramos-Onsins e Rosas (2002), o teste D e o R_2 são testes de Classe I, pois se baseiam na frequência das mutações, enquanto o F_s se enquadra na Classe II relativa aos testes fundamentados na distribuição dos haplótipos. Os testes de neutralidade de Tajima e Fu foram utilizados por serem considerados sensíveis a fatores como *bottlenecks* ou expansão populacional. Assim, espera-se que apresentem valores negativos se a estrutura genética for influenciada por tais fatores (TAJIMA, 1996; NEI e KUMAR, 2000). O F_s leva em consideração o número de haplótipos diferentes dentro da amostra e tende a ser negativo quando há excesso de mutações recentes (FU, 1997). O teste D apresenta valor negativo quando há excesso de polimorfismos de baixa frequência indicando expansão do tamanho populacional e/ou seleção positiva, e valor positivo quando há baixos níveis de polimorfismos de alta e baixa frequência indicando diminuição do tamanho populacional e/ou seleção balanceada (TAJIMA, 1989). O R_2 foi calculado por ser considerado o melhor teste para detectar crescimento populacional em amostras pequenas, com número amostral menor que 20 (RAMOS-ONSINS e ROZAS, 2002; RAMIREZ-SORIANO *et al.*, 2008).

O programa NETWORK 4.5.1.6 (BANDELT *et al.*, 1999) foi utilizado para o cálculo da *median-joining* (MJ), cujo algoritmo está explicado em Bandelt e colaboradores (1999). Este programa é utilizado para reconstruir redes e árvores

filogenéticas, inferir ancestrais, além de estimar datações. Utilizando o critério da parcimônia, a MJ infere vetores medianos (*median vectors*) que podem ser interpretados como haplótipos extintos ou não amostrados na população (BANDELT *et al.*, 1999; POSADA e CRANDALL, 2001).

4. RESULTADOS

4.1. Extração de DNA, PCR e Sequenciamento do DNA mitocondrial

A maior parte das amostras obtidas foi de animais em elevado grau de decomposição, contudo o DNA genômico foi extraído com sucesso das 77 amostras.

Um exemplo pode ser observado na Figura 10.

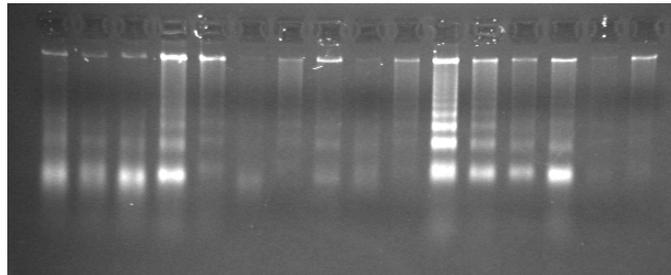


Figura 10 - Gel de agarose 0,8% mostrando resultado da extração de DNA genômico de 16 amostras de tecido de *S. guianensis*.

A amplificação pela PCR do gene citocromo *b* gerou fragmentos de aproximadamente 1200 pb (Figura 11) e para o *D-Loop* fragmentos de aproximadamente 1100 pb (Figura 12). O sequenciamento dos dois fragmentos gerou sequências de 1140 pb para citocromo *b* e 712 pb para o *D-Loop*.

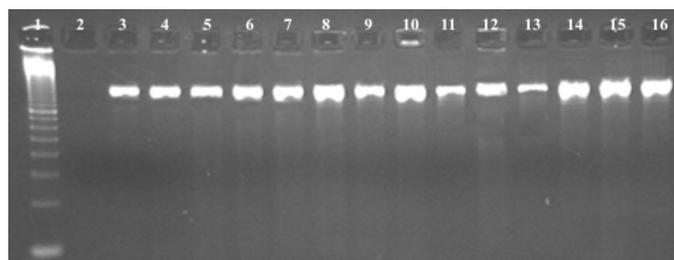


Figura 11 - Gel de agarose 1,5% mostrando resultado da amplificação do gene citocromo *b*. Na primeira coluna está o padrão de tamanho de fragmento de 100 pb, na segunda coluna o controle negativo e nas colunas de 3 a 16 as amostras amplificadas.

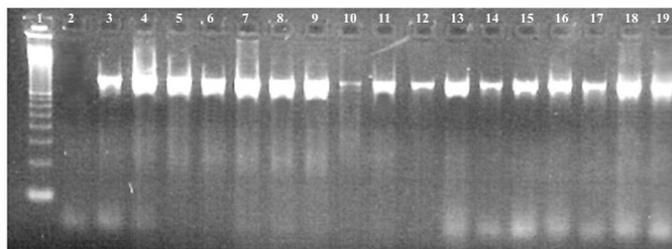


Figura 12 - Gel de agarose 1,5% mostrando resultado da amplificação da região controladora do DNA mitocondrial (*D-Loop*). Na primeira coluna está o padrão de tamanho de fragmento de 100 pb, na segunda coluna o controle negativo e nas colunas de 3 a 19 as amostras amplificadas.

4.3. Caracterização Genética das Populações do Boto-Cinza na Costa Brasileira

A análise do gene mitocondrial citocromo *b* (1140 pb) de *Sotalia guianensis* revelou a existência de 11 sítios polimórficos, definindo 10 haplótipos (Tabela 2). A composição nucleotídica média encontrada foi: Timina = 25,97%; Citosina = 31,3%; Adenina = 30,61%; e Guanina = 12,28%. Nenhuma inserção ou deleção foi encontrada, sendo a grande maioria das substituições compostas por transições (90% das substituições).

No fragmento de 712 pb do *D-Loop* foram encontrados 16 sítios polimórficos e 20 haplótipos (Tabela 3). A composição nucleotídica média encontrada foi: Timina = 33,72%; Citosina = 21,62%; Adenina = 29,79%; e Guanina = 14,88%. Nenhuma inserção ou deleção foi encontrada, sendo a grande maioria das substituições compostas por transições (93,7% das substituições).

O haplótipo mais frequente encontrado entre as sequências do citocromo *b* foi o hap07 e este foi o único compartilhado pelas três populações (Tabela 4). Já na análise do *D-Loop*, o haplótipo mais frequente foi o hap18 que é exclusivo das amostras do Rio de Janeiro. Nesta análise, apenas o hap10 foi compartilhado entre a população do Amapá e a do Rio de Janeiro. Tanto na análise do citocromo *b* quanto no *D-Loop* a amostra que apresentou maior número de haplótipos foi a do Amapá, com 9 e 14

haplótipos respectivamente (Tabela 4 e 5). Nas duas análises, o Amapá e o Pará compartilharam três haplótipos.

Tabela 2 - Posição dos sítios polimórficos dos haplótipos de *S. guianensis* encontrados na análise das sequências do gene citocromo *b*.

Posição dos Sítios Polimórficos											
			1	3	3	4	6	7	8	9	0
	4	7	2	6	9	4	9	3	1	8	1
	9	8	4	7	6	4	5	6	0	6	8
h01	G	C	A	G	C	T	C	A	A	C	G
h02	C	.	.	.	T	.
h03	A	T	.
h04	G	.	T	.
h05	.	.	G	.	T	T	.
h06	T	A
h07	T	.
h08	.	T	G	.	.	T	.
h09	.	.	G	A	T	T	.
h10	G	T	.

Tabela 3 - Posição dos sítios polimórficos dos haplótipos de *S. guianensis* encontrados na análise das sequências de *D-Loop*.

		Posição dos Sítios Polimórficos															
		1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	5	6	6
		9	9	0	6	7	8	8	9	2	7	9	0	7	5	0	0
		9	4	4	8	3	1	2	3	8	2	2	8	7	5	1	3
h01	C	A	C	C	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	G	G	
h02	.	.	T	.	.	.	C	C	.	.	A	.	
h03	.	.	T	.	.	.	C	C	.	C	.	.	
h04	.	.	T	.	.	.	C	C	
h05	.	.	T	.	.	C	C	.	.	.	C	
h06	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	C	C	
h07	.	.	T	.	C	.	C	.	.	C	.	.	C	.	.	.	
h08	.	.	T	.	.	.	C	.	.	C	C	C	
h09	.	.	.	T	
h10	.	.	T	.	.	.	C	.	.	C	.	C	
h11	.	.	T	T	.	.	C	C	.	C	.	C	.	.	A	.	
h12	.	.	T	C	C	.	.	A	A	
h13	.	.	T	.	.	.	C	.	T	.	.	C	
h14	.	.	T	.	.	C	C	
h15	T	C	.	C	
h16	T	C	
h17	C	
h18	.	.	T	C	
h19	.	C	T	C	
h20	.	.	T	

Tabela 4 - Frequência e distribuição geográfica dos haplótipos encontrados entre as sequências do gene citocromo *b* para *S. guianensis*.

Haplótipo	População			TOTAL
	Amapá	Pará	Rio de Janeiro	
h01	1	-	-	1
h02	1	-	-	1
h03	2	-	-	2
h04	10	-	-	10
h05	3	-	-	3
h06	18	1	-	19
h07	4	6	19	29
h08	1	-	-	1
h09	1	2	-	3
h10	-	-	10	10
TOTAL	41	9	29	79

Tabela 5 - Frequência e distribuição geográfica dos haplótipos encontrados entre as sequências do *D-Loop* para *S. guianensis*.

Haplótipo	População			TOTAL
	Amapá	Pará	Rio de Janeiro	
h01	1	-	-	1
h02	1	3	-	4
h03	1	-	-	1
h04	14	-	-	14
h05	5	2	-	7
h06	9	1	-	10
h07	1	-	-	1
h08	2	-	-	2
h09	2	-	-	2
h10	1	-	2	3
h11	1	-	-	1
h12	1	-	-	1
h13	1	-	-	1
h14	1	-	-	1
h15	-	1	-	1
h16	-	1	-	1
h17	-	1	-	1
h18	-	-	25	25
h19	-	-	1	1
h20	-	-	1	1
TOTAL	41	9	29	79

Os índices de diversidade molecular, diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (π), estimados para o citocromo *b* considerando todos os indivíduos foram de 0,7812 e 0,11% respectivamente, e para o *D-Loop*, 0,8481 e 0,37%. Considerando as amostras separadamente, a diversidade haplotípica do citocromo *b* variou de 0,7463 no Amapá a 0,4680 no Rio de Janeiro. As estimativas de diversidade nucleotídica para este marcador por sua vez variaram de 0,14% no Amapá a 0,04% no Rio de Janeiro (Tabela 6). Para o marcador molecular *D-Loop* (Tabela 7), os menores índices de diversidade haplotípica e

nucleotídicas foram encontrados no Rio de Janeiro ($h = 0,2586$; $\pi = 0,06\%$) e a maior no Pará ($h = 0,8889$; $\pi = 0,54\%$).

Tabela 6 - Índices de diversidade molecular obtidos através da análise do gene citocromo *b*.

Pops.	Índices de Diversidade Molecular				
	N	SV	H	<i>h</i>	π (%)
AP	41	10	9	0,746 +/- 0,053	0,139 +/- 0,001
PA	9	4	3	0,556 +/- 0,165	0,122 +/- 0,001
RJ	29	1	2	0,468 +/- 0,059	0,041 +/- 0,000

N = número amostral; SV = número de sítios variáveis; H = número de haplótipos; *h* = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica

Tabela 7 - Índices de diversidade molecular obtidos através da análise do marcador molecular *D-Loop*.

Pops.	Índices de Diversidade Molecular				
	N	SV	H	<i>h</i>	π (%)
AP	41	14	14	0,830 +/-0,042	0,315 +/-0,002
PA	9	8	6	0,889 +/-0,091	0,538 +/-0,003
RJ	29	4	4	0,259 +/-0,104	0,057 +/-0,001

N = número amostral; SV = número de sítios variáveis; H = número de haplótipos; *h* = diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica

4.4. Estruturação Populacional do Boto-Cinza na Costa Brasileira

Para avaliar a estrutura populacional do boto-cinza foram realizados dois testes. O primeiro consistiu na determinação dos índices de fixação (F_{ST} par a par; Tabelas 8 e 9) e o segundo na análise de variância molecular (AMOVA) entre os grupos de supostas populações (Tabelas 10 e 11).

Todos os valores de F_{ST} par a par foram significativos ($P < 0,05$) na análise dos dois marcadores com exceção do índice encontrado entre Pará e Rio de Janeiro, na

Tabela 8. Os valores significativos encontrados rejeitam a hipótese nula de que não existe diferenciação entre as populações, ou seja, indicam que há diferenças significativas entre as amostras do norte (Amapá e Pará) e do Rio de Janeiro (Tabelas 8 e 9).

Na análise de variância molecular (AMOVA) calculada para o citocromo *b* (Tabela 10) o cálculo de Φ_{CT} , tanto pelo método *pairwise difference* como pela estatística F, não mostrou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos (Norte e Rio de Janeiro), ou seja, estatisticamente não foi encontrada correlação entre os haplótipos aleatórios de cada população (AP, PA e RJ) em relação aos pares de haplótipos aleatórios extraídos do total de amostras analisadas. O cálculo do Φ_{SC} e do Φ_{ST} mostrou diferenças significativas ($P < 0,05$) quando calculados para os dois métodos. O teste Φ_{ST} mostrou que a maior proporção de variabilidade genética ocorre dentro das populações no método *pairwise difference* (77,64%) e na estatística F (69,26%).

Já na AMOVA calculada para o *D-Loop* (Tabela 11), quando foi utilizado o método *pairwise difference*, apenas o Φ_{ST} foi significativo. No método de estatística F convencional, o cálculo do Φ_{SC} e do Φ_{ST} mostrou diferenças significativas ($P < 0,05$). Os testes de Φ_{ST} e o Φ_{CT} indicaram que a variabilidade genética encontrada pelo método *pairwise difference* ocorre proporcionalmente entre os grupos (46,12%) e dentro das populações (47,58%). Enquanto que no método estatística F convencional, o teste Φ_{ST} indicou que a maior proporção de variabilidade genética ocorre dentro das populações (58,33%).

Tabela 8 - Diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações de *S. guianensis* (diagonal inferior) e valores associados de P (diagonal superior) para o gene citocromo *b*. * $P < 0,05$. ** $P < 0,001$

F_{ST} e P	Amapá	Pará	Rio de Janeiro
Amapá		0,001**	0,000**
Pará	0,236		0,084
Rio de Janeiro	0,341	0,1011	

Tabela 9 - Diferenciação genética (F_{ST}) entre as populações de *S. guianensis* (diagonal inferior) e valores associados de P (diagonal superior) para o *D-Loop*. * $P < 0,05$. ** $P < 0,001$

F_{ST} e P	Amapá	Pará	Rio de Janeiro
Amapá		0,025*	0,000**
Pará	0,090		0,000**
Rio de Janeiro	0,531	0,431	

Tabela 10 - Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se duas metodologias para o cálculo da matriz de distância: método de *pairwise difference* e estatística F convencional a partir das frequências haplotípicas do gene citocromo *b*. * $P < 0,05$. ** $P < 0,001$

Método: <i>pairwise difference</i>				
	Varição	%	Estatística Φ	P
Φ_{CT}	Entre grupos	11,31	0,113	0,340
Φ_{SC}	Entre pops./Dentro de grupos	11,05	0,125	0,049*
Φ_{ST}	Dentro de populações	77,64	0,224	0,000**
Método: estatística F convencional				
	Varição	%	Estatística Φ	P
Φ_{CT}	Entre grupos	5,48	0,055	0,660
Φ_{SC}	Entre pops./Dentro de grupos	25,26	0,268	0,000**
Φ_{ST}	Dentro de populações	69,26	0,307	0,000**

Tabela 11 - Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando-se duas metodologias para o cálculo da matriz de distância: método de *pairwise difference* e estatística F convencional a partir das frequências haplotípicas do *D-Loop*. * $P < 0,05$. ** $P < 0,001$

Método: <i>pairwise difference</i>				
	Variação	%	Estatística Φ	<i>P</i>
Φ_{CT}	Entre grupos	46,12	0,461	0,322
Φ_{SC}	Entre pops./Dentro de grupos	6,30	0,117	0,059
Φ_{ST}	Dentro de populações	47,58	0,524	0,000**
Método: estatística F convencional				
	Variação	%	Estatística Φ	<i>P</i>
Φ_{CT}	Entre grupos	32,56	0,325	0,328
Φ_{SC}	Entre pops./Dentro de grupos	9,11	0,135	0,012*
Φ_{ST}	Dentro de populações	58,33	0,417	0,000**

Para avaliar a correlação entre as distâncias genéticas (F_{ST} par a par) e geográficas (em Km) foi realizado o teste de Mantel. Na análise do citocromo *b*, o teste gerou um gráfico característico de populações em panmixia, no entanto, o valor não significativo de P ($P = 0,988$) indica a inexistência de correlação entre distâncias genéticas e geográficas. No gráfico gerado na análise do *D-Loop*, foi obtida uma reta que indica o modelo de isolamento por distância, porém este modelo não pode ser sugerido, pois o P não foi significativo ($P = 0,08$).

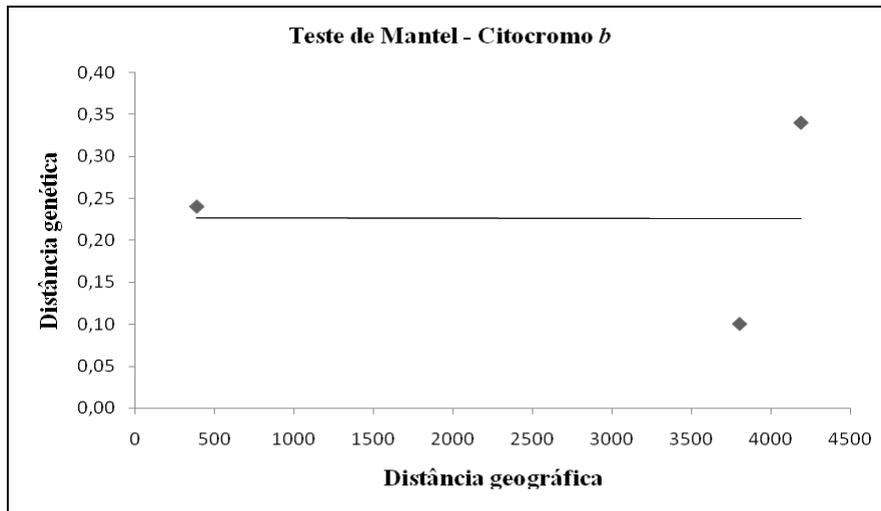


Figura 13 - Correlação entre distância genética (F_{ST}) obtido através da análise do gene citocromo *b* e geográfica (em Km) considerando as três populações de *S. guianensis* deste estudo. A linha de tendência reflete a extrapolação do comportamento dos pontos ($r = 0,019$; $P = 0,988$).

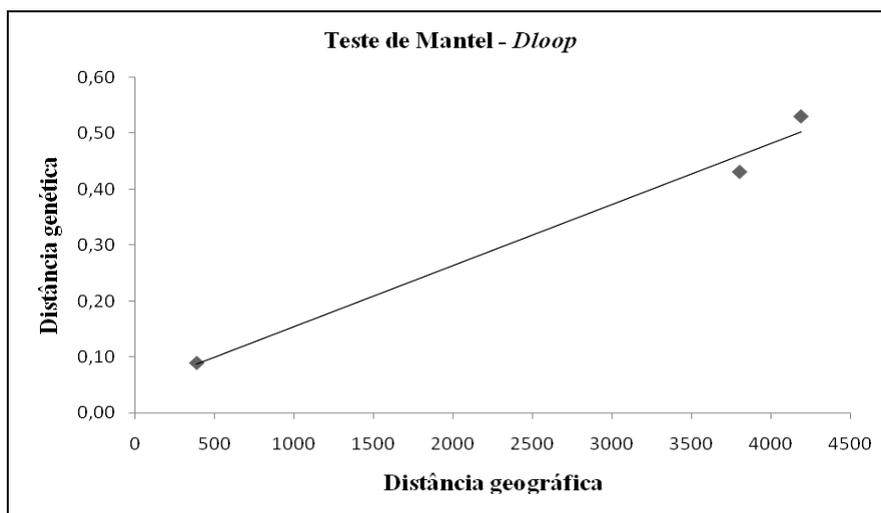


Figura 14 - Correlação entre distância genética (F_{ST}) obtido através da análise do *D-Loop* e geográfica (em Km) considerando as três populações de *S. guianensis* deste estudo. A linha de tendência reflete a extrapolação do comportamento dos pontos ($r = 0,992$; $P = 0,080$).

A distribuição de diferenças nucleotídicas entre pares de sequências (*mismatch distribution*) na análise do citocromo *b* mostrou uma distribuição bimodal para a amostra do Pará e unimodal para o Amapá e Rio de Janeiro enquanto as curvas formadas com os dados simulados (assumindo o modelo de sítios infinitos) para estas

populações mostraram uma distribuição unimodal (Figura 15). Para esta análise, as curvas dos dados observados e simulados enquadram-se dentro dos percentis 5% e 95%. O teste de aderência gerou valores de SSD menores para a população do Rio de Janeiro (Tabela 12), com o P significativo para o modelo de expansão demográfica ($P = 0,0490$) e para o modelo de expansão espacial ($P = 0,0160$). O teste de aderência também foi significativo para as amostras do Pará no modelo de expansão demográfica (Tabela 12).

Para dos dados de *D-Loop*, a análise de *mismatch distribution* também mostrou uma distribuição bimodal para o Pará e unimodal para as demais populações enquanto as curvas formadas com os dados simulados para estas populações mostraram uma distribuição unimodal (Figura 16). Nesta análise, as curvas dos dados observados e simulados encontram-se dentro dos percentis 5% e 95%. O teste de aderência originou valores de SSD não significativos para as populações três populações (Tabela 13).

Os valores encontrados nos testes de neutralidade obtidos na análise do citocromo *b* não foram significativos ($P > 0,05$) aceitando a hipótese nula de neutralidade das mutações e população em equilíbrio. No entanto, na análise dos dados do *D-Loop* (Tabela 15), o teste *D* foi negativo e significativo para a população do Rio de Janeiro ($-1,564$, $P = 0,006$) assim como o F_s para o Amapá ($-5,877$, $P = 0,005$) e Rio de Janeiro ($-1,725$, $P = 0,045$).

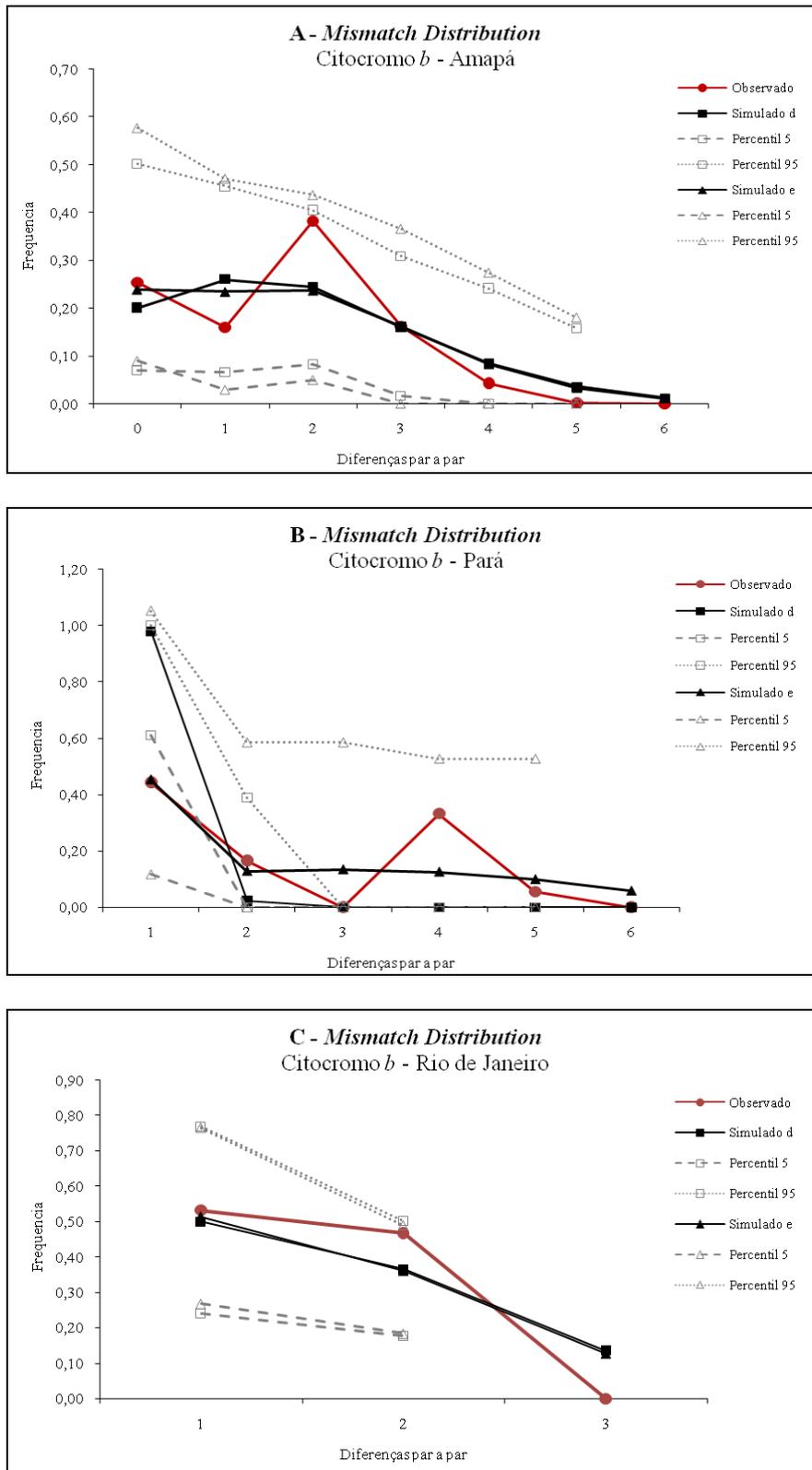


Figura 15 - *Mismatch distribution* para o gene citocromo *b*. ■ = Dados simulados de acordo com modelo de expansão demográfica súbita. ▲ = Dados simulados de acordo com modelo de expansão espacial súbita. ● = Dados observados a partir da distribuição do número de diferenças entre pares de sequências de DNA. Intervalos de confiança estão representados pelas curvas de percentil 5 e 95.

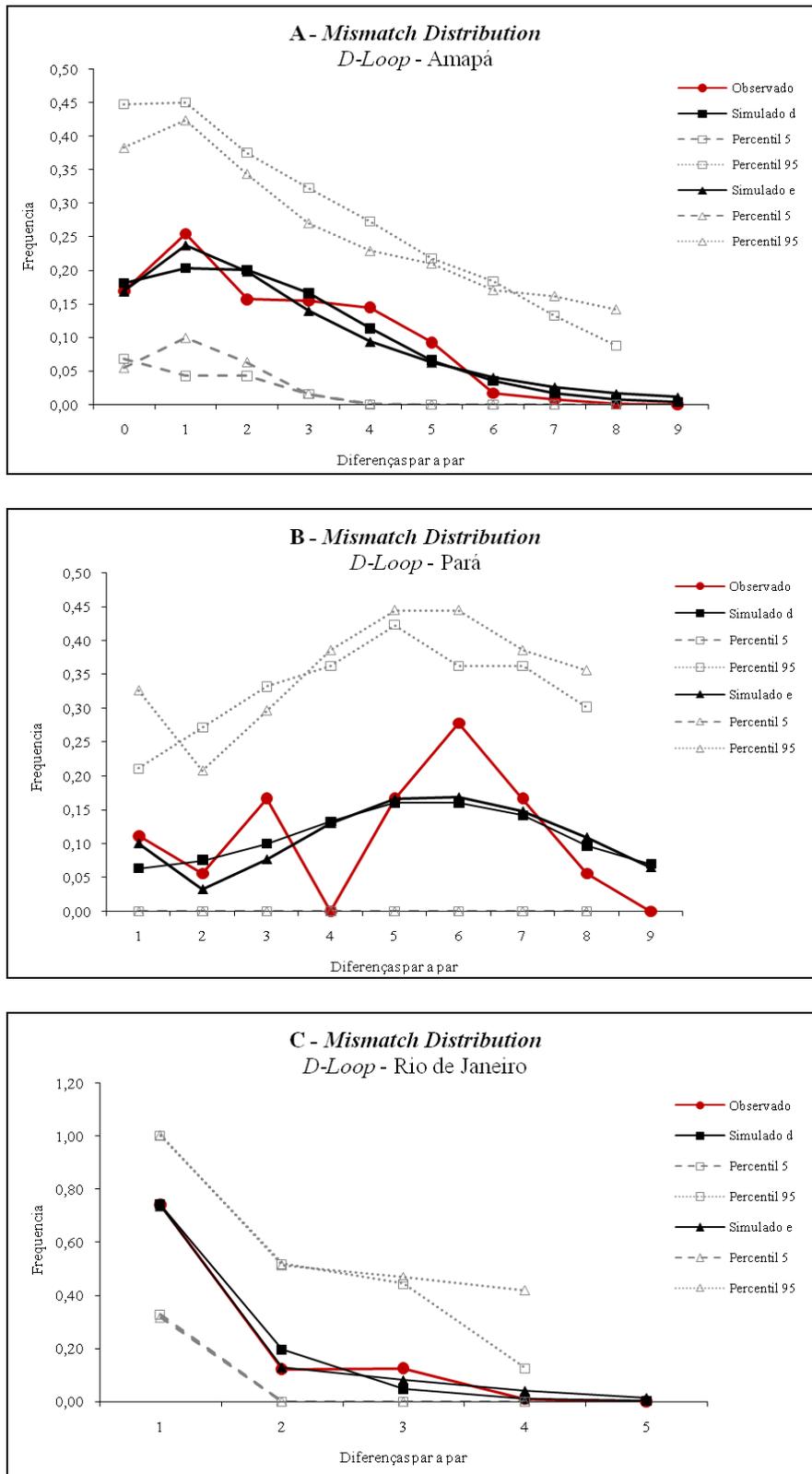


Figura 16 - *Mismatch distribution* para o *D-Loop*. ■ = Dados simulados de acordo com modelo de expansão demográfica súbita. ▲ = Dados simulados de acordo com modelo de expansão espacial súbita. ● = Dados observados a partir da distribuição do número de diferenças entre pares de sequências de DNA. Intervalos de confiança estão representados pelas curvas de percentil 5 e 95.

Tabela 12 - Valores do teste de *goodness-of-fit* de *Mismatch Distribution*, considerando modelos de expansão demográfica e espacial para o gene citocromo *b*. * $P < 0,05$

Expansão demográfica	Amapá	Pará	Rio de Janeiro
SSD	0,036	0,450	0,016
<i>P</i> -valor (SSD)	0,092	0,000*	0,049*
Expansão espacial	Amapá	Pará	Rio de Janeiro
SSD	0,029	0,064	0,016
<i>P</i> -valor (SSD)	0,158	0,289	0,016*

SSD = *Sum of Square Deviation*

Tabela 13 - Valores do teste de *goodness-of-fit* de *Mismatch Distribution*, considerando modelos de expansão demográfica e espacial para o *D-Loop*.

Expansão demográfica	Amapá	Pará	Rio de Janeiro
SSD	0,007	0,044	0,010
<i>P</i> -valor (SSD)	0,633	0,252	0,333
Expansão espacial	Amapá	Pará	Rio de Janeiro
SSD	0,007	0,042	0,002
<i>P</i> -valor (SSD)	0,455	0,347	0,526

SSD = *Sum of Square Deviation*

Tabela 14 - Valores de *D*, R_2 e F_s referentes aos testes de neutralidade obtidos da análise do gene citocromo *b*. Valores entre parênteses correspondem ao *P*.

Populações	<i>D</i>	R_2	F_s
Amapá	-0,958 (0,170)	0,078 (0,159)	-2,452 (0,109)
Pará	-0,229 (0,430)	0,166 (0,147)	0,993 (0,751)
Rio de Janeiro	1,320 (0,910)	0,234 (0,909)	1,490 (0,864)

Tabela 15 - Valores de D , R_2 e F_s referentes aos testes de neutralidade obtidos da análise do *D-Loop*. Valores entre parênteses correspondem ao P . * $P < 0,05$.

Populações	D	R_2	F_s
Amapá	-0,989 (0,175)	0,076 (0,158)	-5,877 (0,005)*
Pará	1,372 (0,937)	0,239 (0,927)	0,889 (0,794)
Rio de Janeiro	-1,564 (0,006)*	0,071 (0,071)	-1,725 (0,045)*

A análise de *median-joining* para o gene citocromo *b* (Figura 17A) apresentou uma topologia em forma de estrela na qual os haplótipos das extremidades ligam-se a um haplótipo central (h07), que é compartilhado por espécimes do Amapá, Pará e Rio de Janeiro. Nesta análise, há um máximo de duas mutações separando os haplótipos e não foram encontrados vetores medianos. Já na rede obtida dos dados de *D-Loop* foram observados quatro vetores medianos e uma mutação separando haplótipos, um máximo de duas mutações entre vetores medianos e haplótipos, e uma mutação entre vetores medianos (Figura 16B). Foram geradas alças (*loops*) entre alguns haplótipos resultando em conexões alternativas entre estes. Enquanto o haplótipo mais frequente na análise do citocromo *b* está no interior da rede, no *D-Loop* parte dos haplótipos estão conectados a vetores medianos.

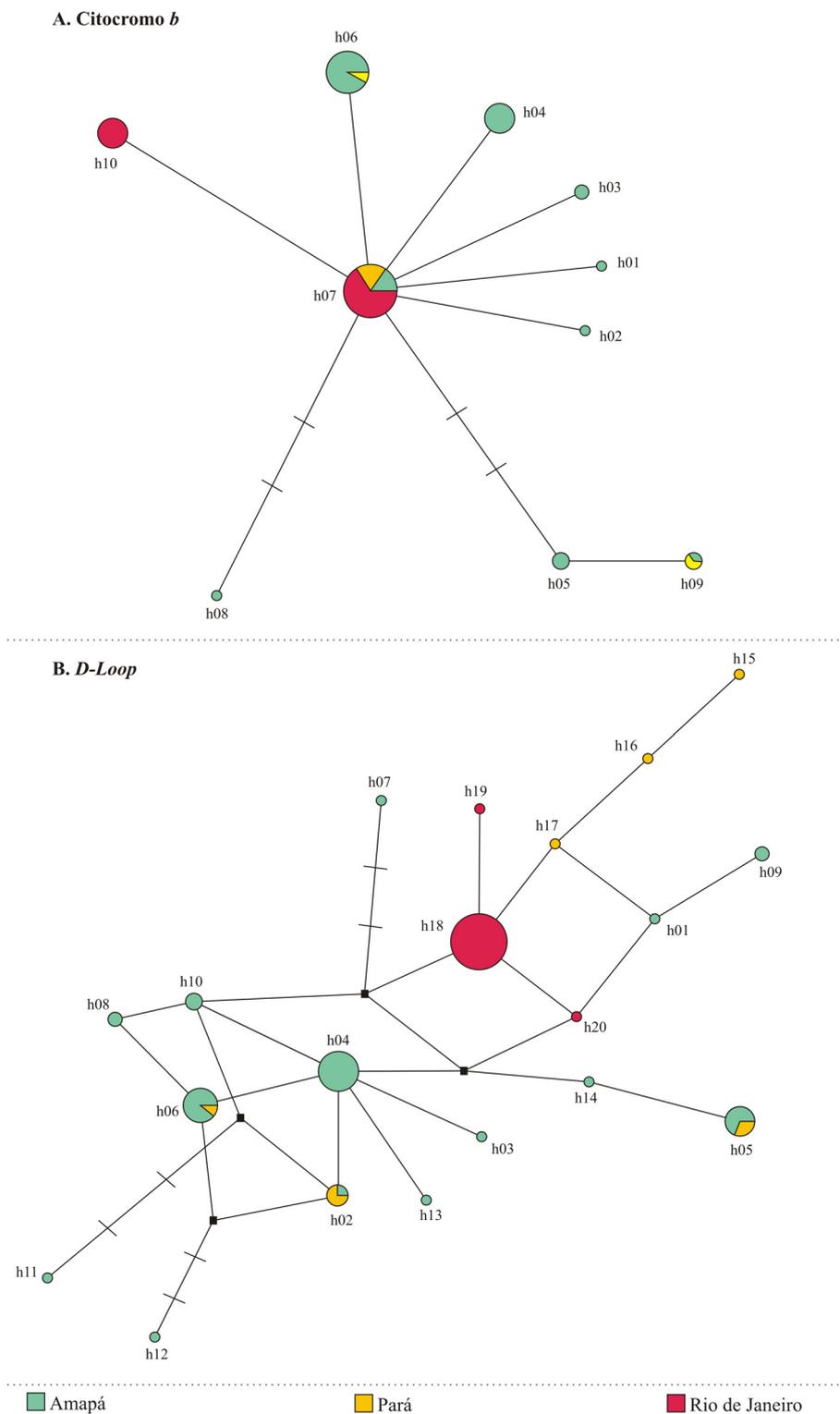


Figura 17 - Relações genealógicas entre haplótipos de *S. guianensis* para o DNA mitocondrial (A. Citocromo *b*; B. *D-Loop*) inferidas através da análise de *median-joining*. Os círculos representam os haplótipos, e seu diâmetro é proporcional ao número de indivíduos que compartilham cada haplótipo. Os traços representam as substituições. Os números dos haplótipos são os mesmos encontrados nas Tabelas 4 e 5.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização Genética e Estruturação Populacional do Boto-Cinza

A análise de dois fragmentos do DNA mitocondrial, o gene citocromo *b* (*citb*) e o *D-Loop*, mostrou-se eficiente em detectar uma maior variabilidade molecular nas populações do boto-cinza (*Sotalia guianensis*) do norte do Brasil (Amapá e Pará) em relação a população do Rio de Janeiro, traduzida pela presença de um total de 14 e 22 sítios variáveis para o gene *citb* e para o *D-Loop*, respectivamente (Tabelas 2 e 3). Somado a isso, é expressiva a diferença na composição haplotípica das populações estudadas, nas quais foram observados 12 haplótipos para o *citb* na população do norte, e 22 para o *D-Loop*, e para a população do Rio de Janeiro, apenas dois e quatro haplótipos para o *citb* e o *D-Loop* respectivamente (Tabelas 4 e 5).

Como pode ser observado na tabela 6, a diversidade nucleotídica do gene *citb* encontrada nas populações do norte foi aproximadamente três vezes maior que a encontrada para o Rio de Janeiro, e a diversidade haplotípica foi apenas um pouco maior nas populações do norte em relação a encontrada para o Rio de Janeiro. Já para o *D-Loop* esta diferença foi ainda maior, sendo a diversidade nucleotídica do Rio de Janeiro aproximadamente nove vezes menor que das populações do norte, e a diversidade haplotípica três vezes menor (Tabela 7).

Quando comparamos os níveis de diversidade genética mitocondrial do boto-cinza com outros cetáceos, verificamos que esta espécie apresenta índices de forma geral inferiores aos demais (Tabela 16).

Tabela 16 - Comparação entre índices de diversidade genética do DNA mitocondrial de diferentes espécies de cetáceos.

Citocromo <i>b</i>				
Espécie	n	h	π (%)	Referência
<i>Sotalia guianensis</i>	79	0,78	0,11	este estudo
<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	215	0,89	0,56	(CASSENS <i>et al.</i> , 2005b)
<i>D-Loop</i>				
Espécie	n	h	π (%)	Referência
<i>Sotalia guianensis</i>	79	0,85	0,37	este estudo
<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	153	0,97	1,63	(CASSENS <i>et al.</i> , 2005b)
<i>Cephalorhynchus hectori</i>	47	0,66	0,40	(PICHLER e BAKER, 2000)
<i>Phocoena phocoena</i>	81	0,90	1,37	(ROSEL <i>et al.</i> , 1995)
<i>Delphinapterus leucas</i>	94	0,70	0,38	(O'CORRY-CROWE <i>et al.</i> , 1997)

Os dados de diversidade molecular encontrados neste estudo sugerem que a população do Rio de Janeiro apresenta variabilidade genética expressivamente mais baixa que a população do norte do país. Vale ressaltar que, o tamanho amostral não deve ter influenciado este resultado uma vez que para a população do Pará foi analisado um número amostral três vezes inferior ao da população do Rio de Janeiro (Tabelas 6 e 7), e foram encontrados altos índices de diversidade molecular, confirmando a maior variabilidade da região norte.

Em relação a estrutura populacional do boto-cinza, os valores de F_{ST} par a par foram significativos para os dois marcadores moleculares indicando a existência de estruturação entre as populações do norte e do Rio de Janeiro ($P < 0,05$; Tabelas 8 e 9). A estruturação não foi confirmada pela AMOVA nos dois marcadores, uma vez que a estimativa de Φ_{CT} não foi significativa ($P > 0,05$; Tabelas 10 e 11). O Φ_{CT} não significativo pode ser indicativo de uma definição *a priori* inadequada das populações do norte, uma vez que a espécie não reconhece a divisão política dos estados, ainda

mais se tratando de uma espécie marinha, onde as barreiras geográficas são difíceis de definir. Na análise do citb, o Φ_{SC} foi significativo para os dois métodos utilizados para calcular a AMOVA, sendo que, em média, 18% da variação genética total ocorrem entre as populações, dentro dos grupos, ou seja, entre Amapá e Pará que foram agrupados como norte (Tabela 10). A estimativa Φ_{ST} mostrou que a maior variabilidade genética do citb encontra-se dentro das populações (Amapá, Pará e Rio de Janeiro) sendo de 77,64% com o método *pairwise difference* e 69,26% com o método estatística F convencional (Tabela 10). Ao nível do marcador *D-Loop*, os testes de Φ_{ST} e o Φ_{CT} indicaram que a variabilidade genética ocorre proporcionalmente entre os grupos e dentro das populações (Tabela 11).

O gráfico gerado pelo teste de Mantel na análise do citb é característico de populações panmíticas (Figura 13). No entanto, quando comparamos este resultado ao gráfico gerado pela análise do *D-Loop*, podemos postular que o tempo de separação entre as populações estudadas não foi o suficiente para que ocorresse diferenciação ao nível do citb. Lembrando que o tempo de diferenciação estimado entre as duas espécies do gênero *Sotalia*, a marinha *S. guianensis* e a fluvial *S. fluviatilis*, é de apenas 1,2 milhões de anos (CABALLERO *et al.*, 2007).

Em relação ao resultado do teste de Mantel para o *D-Loop* (Figura 14), foi indicada a inexistência de correlação entre distâncias genéticas e geográficas entre as populações do boto-cinza do norte e sudeste do Brasil. Isso porque, apesar do valor de r elevado ($r = 0,992$), a correlação não foi significativa ($P = 0,080$) apesar de o modelo de isolamento por distância (segundo o qual o fluxo gênico ocorre localmente entre vizinhos em uma população de distribuição contínua) ser condizente com o reduzido deslocamento realizado pelo boto-cinza de aproximadamente 30 Km (FLORES e BAZZALO, 2004). Lembrando que como outros pequenos delfínídeos como por

exemplo, *Cephalorhynchus hectori* e *Tursiops truncatus* (SLOOTEN e LAD, 1991; CONNOR *et al.*, 2000), *S. guianensis* é uma espécie residente (FLORES, 1999; SANTOS *et al.*, 2001). Azevedo e colaboradores (2004) registraram durante um intervalo de oito anos a fidelidade de um grupo de 69 indivíduos na Baía de Guanabara. Segundo o autor, a fidelidade ao local varia em função da disponibilidade de presas, ou seja, em áreas onde a densidade de presas é alta, os golfinhos não precisam se deslocar.

Os dados observados na análise da distribuição de diferenças nucleotídicas entre pares de sequências (*mismatch distribution*) do citb geraram um padrão de curvas unimodais para Amapá e Rio de Janeiro de acordo com o modelo de expansão súbita (Figura 15). No entanto, este padrão foi rejeitado pelo teste de aderência (SSD) significativo ($P = 0,09$) para a população do Amapá (Tabela 12). Para a população do Rio de Janeiro, a análise de *mismatch distribution* gerou uma curva unimodal com formato semelhante aos dados simulados para esta população, porém este resultado não foi corroborado pelo teste de aderência que gerou P significativo para esta população (Tabela 12), em discordância com o modelo hipotético de expansão súbita da população. Os valores negativos e significativos encontrados nos teste de neutralidade D e F_s (Tabela 15) para a população do Rio de Janeiro indicam excesso de mutações recentes sugerindo expansão populacional e/ou seleção positiva, ou seja, uma evidência contra a neutralidade das mutações (TAJIMA, 1989; FU e LI, 1993; FU, 1997; RAMIREZ-SORIANO *et al.*, 2008). O teste F_s também foi significativo e negativo para o Amapá indicando expansão populacional (Tabela 15).

A análise de *median-joining* para o gene citocromo *b* (Figura 17A) mostrou que o haplótipo mais frequente (h07) se encontra no interior da rede conforme sugerido por Crandall e Templeton (1993) e, da mesma forma, podemos interpretar os haplótipos das extremidades como sendo aqueles que divergiram mais recentemente (CASSENS *et al.*,

2005a). O formato típico de estrela encontrado nesta análise tem sido explicado como um provável evento recente de expansão populacional (SLATKIN e HUDSON, 1991). Esta provável expansão populacional indicada pelos testes de neutralidade e pela *mismatch distribution* também é corroborada por Cunha e colaboradores (2005), que sugeriu que após a separação da espécie em marinha e fluvial, *S. guianensis* provavelmente sofreu expansão ao longo da costa brasileira até a região Sul, onde barreiras biogeográficas limitaram a continuação da expansão. A rede obtida pela análise do *D-Loop* mostra um padrão de distribuição mais estruturado uma vez que este marcador apresenta taxas de evolução mais rápidas que o citocromo *b*. É possível observar a diferenciação que ocorreu entre as populações do norte e do sudeste do Brasil após a colonização da costa de norte para sul (Figura 16A e B).

O padrão de expansão demográfica encontrada na *median-joining* pode também explicar a baixa variabilidade encontrada na população do sudeste através de efeito fundador, ou seja, o deslocamento da espécie em direção ao sul transportou apenas parte do patrimônio genético da população original. Esta característica pode ser confirmada com a presença de haplótipos em comum entre as populações do norte e do sudeste.

5.2. Diversidade Genética e Contaminação Ambiental: Consequências para Populações do Boto-Cinza da Costa Brasileira

Bickham e colaboradores (2000) revisando os efeitos genéticos da contaminação ambiental elaboraram um modelo de como a contaminação química pode afetar a genética de populações naturais (Figura 18). Começando no nível molecular, mutágenos interagem com o DNA formando lesões (efeitos somáticos) que podem causar ao tecido danos que geram efeitos adversos à saúde do indivíduo. Consequentemente haverá redução do sucesso reprodutivo dos indivíduos com redução do tamanho populacional.

Esta, por sua vez, pode levar ao estrangulamento da população (um efeito ecológico) que pode resultar em redução da variabilidade genética nas populações (efeitos genéticos sobre a população). Mudanças nas frequências alélicas podem resultar da seleção em *loci* importantes para a sobrevivência em ambientes poluídos ou pela possibilidade de fixação de alelos deletérios em pequenas populações (efeitos evolutivos). Todos estes fatores podem conduzir a uma redução do *fitness* da população e, eventualmente, à extinção ou a extirpação da população.

Embora diversos estudos tenham indicado altas concentrações de contaminantes em espécimes de botos-cinza da costa brasileira (MONTEIRO-NETO *et al.*, 2003; YOGUI *et al.*, 2003; KAJIWARA *et al.*, 2004; KUNITO *et al.*, 2004; DORNELES *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2009a; b; DORNELES *et al.*, 2010), ainda não existem trabalhos que avaliem os efeitos mutagênicos desta contaminação sobre a população. Baseados nos resultados obtidos neste estudo, que indicam que a baixa variabilidade genética observada na população de botos-cinza do Rio de Janeiro é de origem histórica em consequência do processo de colonização e efeito fundador, podemos utilizar os efeitos apontados no modelo proposto por Bickham e colaboradores (2000) sob a ótica de uma população que já apresenta redução da variabilidade genética e está exposta a um ambiente altamente impactado.

Sabe-se que a perda de variabilidade genética em uma população pode limitar a habilidade (*fitness*) da espécie em conviver com mudanças a longo prazo do ambiente, tais como poluição ou novas doenças (FRANKHAM, 2003). Diversos estudos têm apontado a precária condição de saúde do boto-cinza, principalmente no sudeste do Brasil, com o surgimento de novas doenças e o aparecimento de malformações ósseas (LAETA, 2007; VAN BRESSEM *et al.*, 2007).

Van Bresseem e colaboradores (2007) publicaram uma revisão sobre doenças de pele e esqueléticas em pequenos cetáceos da América do Sul. Nesta revisão foi observado que os pequenos cetáceos habitantes das águas sul-americanas têm sido afetados por uma variedade de doenças congênitas, parasíticas e infecciosas, além de traumas diversos. A doença que mais chamou atenção neste estudo foi a Lobomicose, uma micose sistêmica que acomete humanos e golfinhos e tem se disseminado entre os botos-cinza do sul e sudeste do Brasil (VAN BRESSEEM *et al.*, 2007; BERMUDEZ *et al.*, 2009; VAN BRESSEEM *et al.*, 2009b). De acordo com Van Bresseem e colaboradores (2007), a incidência desta doença em pequenos cetáceos costeiros da América do Sul poderia estar associada com a presença de contaminantes persistentes no ambiente marinho, causando desequilíbrio imunológico nos cetáceos expostos e tornando-os vulneráveis à doença em questão.

Alterações ósseas e patológicas em cetáceos vêm sendo relatadas em diversos estudos e referem-se a fraturas, doenças congênitas, infecciosas e degenerativas (eg. FRAGOSO, 2001; LAETA, 2007; VAN BRESSEEM *et al.*, 2007; LAETA *et al.*, 2008b; COOPER e DAWSON, 2009). As lesões observadas têm sido relacionadas a envolvimento com artefatos de pesca, choques com embarcações, infecções bacterianas, contaminação ambiental e endocruzamento (ORTEGA-ORTIZ *et al.*, 2000; VAN BRESSEEM *et al.*, 2007; VAN BRESSEEM *et al.*, 2009a). Fragoso (2001) analisando alterações morfológicas e patológicas em esqueletos de boto-cinza do litoral do estado do Rio de Janeiro encontrou um alto percentual (77,33%) de anomalias de diversas naturezas como alterações traumáticas, infecciosas, degenerativas e de morfogênese, registrados no esqueleto axial, ossos do hióide, escápula e ossos das nadadeiras peitorais. Segundo a autora, o percentual de anomalias de desenvolvimento

(29,33%) encontrado neste estudo, no qual estão incluídas as anomalias congênitas, foi superior aos valores encontrados em outras espécies de delfínídeos.

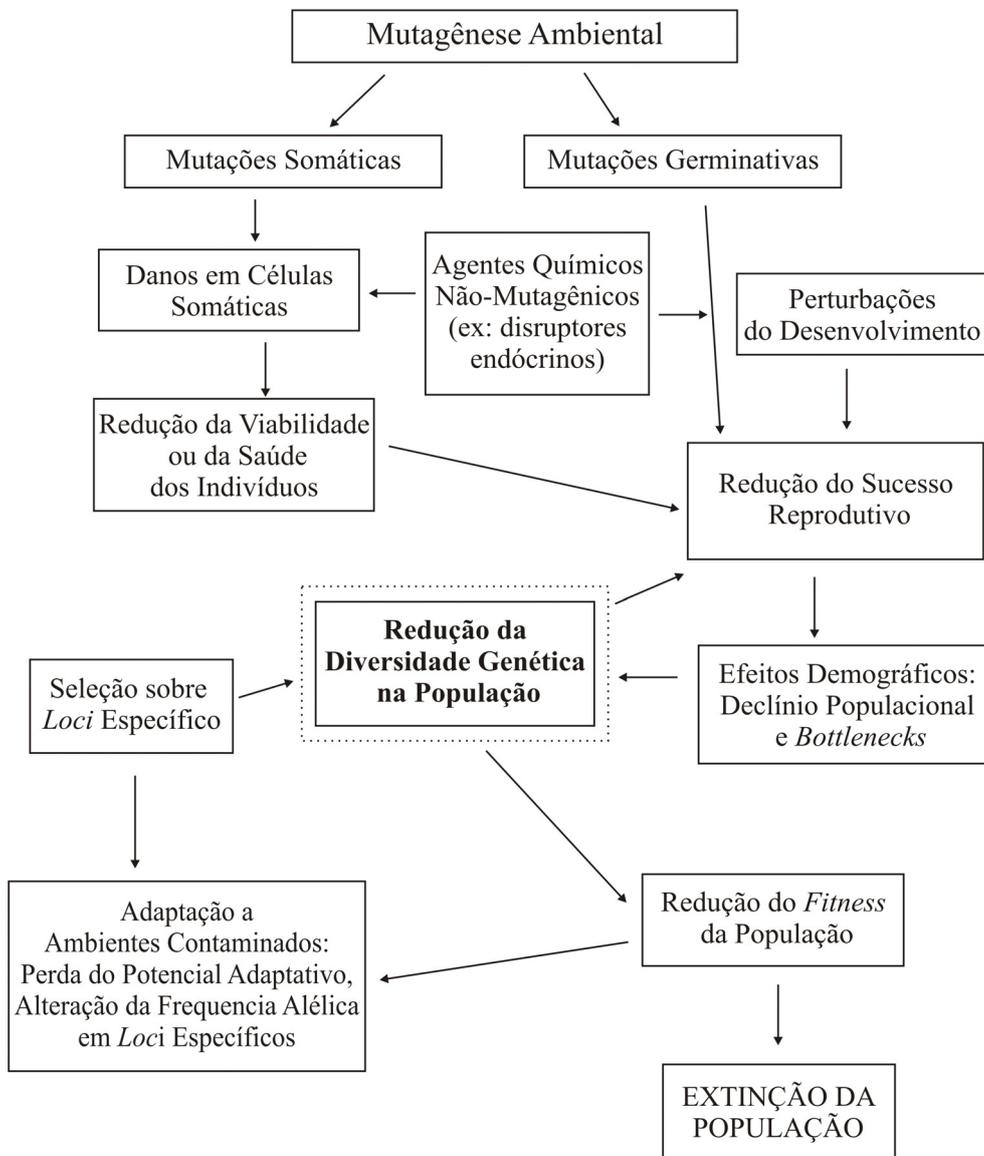


Figura 18 - Modelo para ilustrar as inter-relações entre os fatores relacionados à contaminação química ambiental com a diminuição da diversidade genética das populações. Adaptado de Bickham *et al.* (2000).

Em outro estudo, Laeta (2007) identificou a ocorrência de costelas cervicais em 45% dos animais estudados na costa centro-norte do estado do Rio de Janeiro. A autora chamou atenção para esta condição, uma vez que se tratando de animais de uma mesma área e possivelmente provenientes de um mesmo grupo, com supostas relações de consanguinidade, esta anomalia poderia expressar uma característica prevalente nesta população. No entanto, com os resultados do presente estudo podemos sugerir que esta alta prevalência seja explicada pela baixa variabilidade da população do Rio de Janeiro e pelo endocruzamento.

Neste mesmo estudo (LAETA, 2007) foi encontrada uma alta ocorrência (45%) do não fechamento do arco neural nos espécimes do Rio de Janeiro, em oposição a 14% em espécimes do estado do Pará (LAETA *et al.*, 2008a). Em populações humanas, este defeito pode surgir em consequência da deficiência de ácido fólico na dieta de gestantes (BARNES, 1994). A deficiência das vitaminas A, D, E nunca foram descritas para cetáceos de vida livre, no entanto o complemento destas vitaminas é recomendado para espécimes em cativeiro onde a dieta e a exposição a raios ultra-violeta podem ser insuficientes (REIDERSON, 2003). Segundo Laeta (2007), não parece provável que uma causa nutricional esteja relacionada a esta anomalia, uma vez que a probabilidade de ocorrer deficiência de vitamina D nos golfinhos é pequena, devido à grande capacidade de armazená-la na gordura, e por se tratar de animais de vida livre, com acesso a alimentos variados e a exposição solar.

Segundo Patton (1987), 90% dos defeitos de desenvolvimento é causado por influências genéticas que poder ser resultantes de desordens em um único gene desordens cromossômicas ou desordens multifatoriais, que são as mais frequentes. As desordens multifatoriais são resultado da interação entre fatores genéticos (intrínsecos) ou de fatores genéticos e ambientais (extrínsecos). Alguns estudos têm relacionado

casos de anomalias ósseas de desenvolvimento encontradas em espécies de cetáceos à baixa variabilidade genética das populações (BICKHAM *et al.*, 2000; ORTEGA-ORTIZ *et al.*, 2000). Somado a isso, estes autores também postulam que malformações congênitas em esqueletos de mamíferos marinhos podem ser um indicador de contaminação ambiental, pois contaminantes geralmente se acumulam e ficam concentrados em predadores de topo de cadeia alimentar, como é o caso do boto-cinza. Na costa fluminense, Fragoso (2001) relatou que ao longo da distribuição de *S. guianensis*, o local que os esqueletos apresentaram mais malformações foi a área que inclui a baía de Guanabara, o que se associava a contaminação por metais totais e organoclorados em tecidos das carcaças de botos-cinza (LAÍLSON-BRITO *et al.*, 2002; LAÍLSON-BRITO *et al.*, 2003; SEIXAS *et al.*, 2009b).

O conhecimento atual sobre o boto-cinza indica que a saúde do ecossistema no qual a espécie faz parte está ameaçada, e está refletindo os efeitos adversos causados pela atividade humana, em particular destruição do hábitat, a mobilização de contaminantes e a propagação de agentes patogênicos. Neste contexto, este estudo contribui para a fundamentação do uso do boto cinza, *Sotalia guianensis*, como espécie sentinela além de ser capaz de detectar as vulnerabilidades sobre a integridade ecológica marinha desta espécie e do ecossistema no qual ela pertence.

5.3. Considerações Finais

Segundo a classificação da CITES (2008) e da CMS (2006), o boto-cinza está, respectivamente, classificado como “ameaçado de extinção” e com status de conservação “desfavorável”. Contudo, os resultados apresentados neste estudo somados as recentes indicações da precária qualidade de saúde que a espécie vem apresentando,

principalmente na região sudeste do Brasil, apontam para urgência na conservação desta espécie e principalmente para a conservação do seu habitat.

Uma abordagem multidisciplinar incluindo a análise conjunta de várias informações biológicas (por exemplo, genética, morfologia, padrões de distribuição) é crucial para determinar as unidades ou áreas de manejo voltadas à conservação do boto-cinza. Uma vez definidos os estoques, torna-se essencial a coleta de dados para estimar parâmetros populacionais relevantes na avaliação do risco de extinção de cada estoque, os quais incluem taxas reprodutivas, taxas de mortalidade causada por pesca e estimativas de abundância. A obtenção de uma medida de risco relativo é fundamental para direcionar recursos, geralmente limitados, para o desenvolvimento de pesquisas prioritárias e/ou para a elaboração e implementação de estratégias de conservação ou manejo.

A criação de Unidades de Conservação dentro do limite de distribuição preferencial das populações da espécie, bem como, a criação de áreas de exclusão pesqueira para utilização de redes de espera, devem ser consideradas como alternativa de proteção de hábitat visando sua conservação. Propõe-se ainda que toda e qualquer ação antrópica de elevado impacto ambiental, como atividades sísmicas, atividades de exploração de petróleo e tráfego de embarcações de grande porte, seja controlada nas áreas de uso preferencial do boto-cinza.

6. CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A análise do gene citocromo *b* e o *D-Loop* mostrou-se eficiente em detectar, através dos índices de diversidade molecular, uma menor variabilidade genética na população de *Sotalia guianensis* do Rio de Janeiro em relação as populações do norte do Brasil (Amapá e Pará);
- Foi observado fluxo gênico reduzido entre estas populações que pode levar ao futuro isolamento destas;
- Os resultados das análises demográficas e a topologia encontrada na rede de *median-joining* sugerem que a população do Rio de Janeiro sofreu um processo de expansão demográfica recente e conseqüentemente, uma redução ancestral da variabilidade genética do boto-cinza através de efeito fundador.
- A precária condição de saúde do boto-cinza que vem sendo relatada em diversos estudos recentes, principalmente para o sul e sudeste do Brasil, pode estar sendo agravada pela baixa variabilidade genética encontrada nesta população como conseqüência da redução da capacidade adaptativa da espécie.

7. REFERÊNCIAS

ACEVEDO-GUTIÉRREZ, A.; DIBERARDINIS, A.; LARKIN, S.; LARKIN, K.; FORESTELL, P. Social interactions between tucuxis and bottlenose dolphins in Gandoca-Manzanillo, Costa Rica. Interacciones sociales entre delfines tucuxis y bufeos en Gandoca-Manzanillo, Costa Rica. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, v. 4, n. 1, p. 49-54, 2005.

AGUILAR, A.; BORRELL, A.; PASTOR, T. Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. *The Journal of Cetacean Research and Management*, n. 1, p. 33, 1999.

ANDERSON, S.; SADINSKI, W.; SHUGART, L.; BRUSSARD, P.; DEPLEDGE, M.; FORD, T. *et al.* Genetic and molecular ecotoxicology: A research framework. *Environmental Health Perspectives*, v. 102, n. SUPPL. 12, p. 3-8, 1994.

ANWAY, M. D.; SKINNER, M. K. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors. *Endocrinology*, v. 147, n. 6, p. s43-49, 2006.

AVISE, J. C. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, 2000. 477 ISBN 0-674-66638-0.

AVISE, J. C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Second. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2004. 541 ISBN 0-87893-041-8.

AZEVEDO, A. F.; LAÍLSON-BRITO JR., J.; CUNHA, H. A.; VAN SLUYS, M. A note on site fidelity of marine tucuxis (*Sotalia fluviatilis*) in Guanabara Bay, southeastern Brazil. *Journal of Cetacean Research and Management*, v. 6, p. 265-268, 2004.

AZEVEDO, A. F.; OLIVEIRA, A. M.; VIANA, S. C.; VAN SLUYS, M. Habitat use by marine tucuxis (*Sotalia guianensis*) (Cetacea: Delphinidae) in Guanabara Bay, south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 87, n. 01, p. 201-205, 2007.

AZEVEDO, A. F.; VIANA, S. C.; OLIVEIRA, A. M.; VAN SLUYS, M. Group characteristics of marine tucuxis (*Sotalia fluviatilis*) (Cetacea: Delphinidae) in Guanabara Bay, south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 85, n. 01, p. 209-212, 2005.

BADEN, D. G. Marine food-borne dinoflagellate toxins. *International Review of Cytology*, v. Vol. 82, p. 99-150, 1983.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BARNES, E. *Developmental defects of the axial skeleton in paleopathology*. Niwot: University Press of Colorado, 1994. 360

BARROS, N. B.; ZANELATTO, R. C.; OLIVEIRA, M. R.; ROSAS, F. C. W.; SIMÕES-LOPES, P. C. Hábitos alimentares do boto cinza, *Sotalia fluviatilis*, no extremo sul de sua distribuição. VIII Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul 1998. Olinda, Brasil. Outubro. p.25-29.

BELFIORE, N. M.; ANDERSON, S. L. Genetic patterns as a tool for monitoring and assessment of environmental impacts: The example of genetic ecotoxicology. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 51, n. 1-2, p. 465-479, 1998.

BELFIORE, N. M.; ANDERSON, S. L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, v. 489, n. 2-3, p. 97-122, 2001.

BERCKMOES, V.; SCHEIRS, J.; JORDAENS, K.; BLUST, R.; BACKELJAU, T.; VERHAGEN, R. Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n. 11, p. 2898-2907, 2005.

BERMUDEZ, L.; VAN BRESSEM, M. F.; REYES-JAIMES, O.; SAYEGH, A. J.; PANIZ-MONDOLFI, A. E. Lobomycosis in man and lobomycosis-like disease in bottlenose dolphin, Venezuela. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 8, p. 1301-1303, 2009.

BICKHAM, J. W.; SANDHU, S.; HEBERT, P. D. N.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: Implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 463, n. 1, p. 33-51, 2000.

BOL'SHAKOV, V. N.; MOISEENKO, T. I. Anthropogenic Evolution of Animals: Facts and Their Interpretation. *Russian Journal of Ecology*, v. 40, n. 5, p. 305-313, 2009.

BOROBIA, M.; SICILIANO, S.; LODI, L.; HOEK, W. Distribution of the South American dolphin *Sotalia fluviatilis*. *Canadian Journal of Zoology*, v. 69, p. 1025-1039, 1991.

BOSSART, G. D.; BADEN, D. G.; EWING, R. Y.; ROBERTS, B.; WRIGHT, S. D. Brevetoxicosis in manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from the 1996 epizootic: gross, histologic, and immunohistochemical features. *Toxicologic Pathology*, v. 26, n. 2, p. 276-82, 1998.

BOURRET, V.; COUTURE, P.; CAMPBELL, P. G. C.; BERNATCHEZ, L. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, v. 86, n. 1, p. 76-90, 2008.

BROWN, W. M.; GEORGE, M., JR.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 76, n. 4, p. 1967-71, 1979.

BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular and Evolution*, v. 18, n. 4, p. 225-39, 1982.

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, 2006.

CABALLERO, S.; TRUJILLO, F.; VIANNA, J. A.; BARRIOS-GARRIDO, H.; MONTIEL, M. G.; BELTRÁN-PEDREROS, S. *et al.* Taxonomic status of the genus *Sotalia*: species level ranking for "tucuxi" (*Sotalia fluviatilis*) and "costero" (*Sotalia guianensis*) dolphins. *Marine Mammal Science*, v. 23, n. 2, p. 358-386, 2007.

CARVALHO, C. E. V.; DI BENEDITTO, A. P. M.; SOUZA, C. M. M.; RAMOS, R. M. A.; REZENDE, C. E. Heavy metal distribution in two cetacean species from Rio de Janeiro State, south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 88, n. Special Issue 06, p. 1117-1120, 2008.

CASSENS, I.; MARDULYN, P.; MILINKOVITCH, M. C. Evaluating intraspecific "Network" construction methods using simulated sequence data: Do existing algorithms outperform the global maximum parsimony approach? *Systematic Biology*, v. 54, n. 3, p. 363-372, 2005a.

CASSENS, I.; VICARIO, S.; WADDE, V. G.; BALCHOWSKY, H.; BALLE, D. V.; WANG, D. *et al.* Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 11343 - 11347, 2000.

CASSENS, I.; WAEREBEEK, K. V.; BEST, P. B.; TZIKA, A.; HELDEN, A. L. V.; CRESPO, E. A. *et al.* Evidence for male dispersal along the coasts but no migration in pelagic waters in dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Molecular Ecology*, v. 14, p. 107-121, 2005b.

CASTRO, J. A.; PICORNELL, A.; RAMON, M. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *International Microbiology*, v. 1, n. 4, p. 327-32, 1998.

CHEN, X. Y.; LI, N.; SHEN, L.; LI, Y. Y. Genetic structure along a gaseous organic pollution gradient: a case study with *Poa annua* L. *Environ Pollut*, v. 124, n. 3, p. 449-55, 2003.

CHENUIL, A. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*, v. 127, n. 1-3, p. 101-20, 2006.

CHESSER, R. K.; SUGG, D. W. Toxicant As Selective Agents in Population and Community Dynamics. In: NEWMAN, M. C. A. J., CH.H. (Ed.). *Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment*. New York: Lewis Publ. Ltd, 1996. p.293–317.

CITES. Convention on trade in endangered species of wild fauna and flora - Appendix I. 2008. Disponível em: < <http://www.cites.org/eng/app/E-Feb12.pdf> >. Acesso em: 15 Mar

CLEMENTS, W. H.; ROHR, J. R. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, n. 9, p. 1789-1800, 2009.

CMS. Appendices I and II of the Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals. 2006. Disponível em: < http://www.cms.int/documents/appendix/Appendices_E.pdf >. Acesso em: 18 Nov.

COE, T. S.; HAMILTON, P. B.; GRIFFITHS, A. M.; HODGSON, D. J.; WAHAB, M. A.; TYLER, C. R. Genetic variation in strains of zebrafish (*Danio rerio*) and the implications for ecotoxicology studies. *Ecotoxicology*, v. 18, n. 1, p. 144-150, 2009.

COHEN, J. E. Population growth and earth's human carrying capacity. *Science*, v. 269, n. 5222, p. 341-346, 1995.

CONNOR, R. C.; WELLS, R. S.; MANN, J.; READ, A. J. The bottlenose dolphin: Social relationships in a fission-fusion society. In: MANN, J. (Ed.). *Cetacean Societies: Field studies of dolphins and whales*. Chicago: The University of Chicago Press, 2000. p.91-126.

COOPER, L. N.; DAWSON, S. D. The trouble with flippers: A report on the prevalence of digital anomalies in Cetacea. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 155, n. 3, p. 722-735, 2009.

COSTA, A. F.; EMIN-LIMA, N. R.; RODRIGUES, A. L. F.; SOUSA, M. E. M.; S, S. Encalhes do boto-cinza *Sotalia guianensis* em praias da costa leste da Ilha de Marajó - PA. VII ECOLAB Brasil - Ecossistemas Costeiros Amazônicos, 2007. Macapá. p.212-216.

CRANDALL, K. A.; TEMPLETON, A. R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, v. 134, n. 3, p. 959-969, 1993.

CREMER, M. J. *Ecologia e Conservação do Golfinho Sotalia fluviatilis guianensis (Cetacea: Delphinidae) na Baía de Babitonga, Litoral Norte de Santa Catarina*. . 2000. 226 (Masters). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brazil

CUNHA, H. A.; da SILVA, V. M. F.; LAILSON-BRITO, J.; SANTOS, M. C. O.; FLORES, P. A. C.; MARTIN, A. R. *et al.* Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Marine Biology*, v. 148, n. 2, p. 449-457, 2005.

da SILVA, V. M. F.; BEST, R. C. Tucuxi - *Sotalia fluviatilis* (Gervais 1853). In: RIDGWAY, S. H. e HARRISON, S. R. (Ed.). *Handbook of Marine Mammals: The first book of dolphins*. London: Academic Press, v.5, 1994. p.43-70.

de LA CRUZ, V. F.; NECKELMANN, N.; SIMPSON, L. Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 259, n. 24, p. 15136-15147, 1984.

DEHN, L. A.; FOLLMANN, E. H.; ROSA, C.; DUFFY, L. K.; THOMAS, D. L.; BRATTON, G. R. *et al.* Stable isotope and trace element status of subsistence-hunted bowhead and beluga whales in Alaska and gray whales in Chukotka. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, n. 3, p. 301-19, 2006.

DI BENEDITTO, A. P. M.; RAMOS, R. M. A.; LIMA, N. R. W. *Os golfinhos: origem, captura accidental, habito alimentar*. Porto Alegre Cinco continentes, 2001. 152

DI BENEDITTO, A. P. M.; SICILIANO, S. Stomach contents of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia guianensis*) from Rio de Janeiro, south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, v. 87, n. 01, p. 253-254, 2007.

DORNELES, P. R.; LAILSON-BRITO, J.; AZEVEDO, A. F.; MEYER, J.; VIDAL, L. G.; FRAGOSO, A. B. *et al.* High accumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in marine tucuxi dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Brazilian coast. *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 14, p. 5368-73, 2008.

DORNELES, P. R.; LAILSON-BRITO, J.; DIRTU, A. C.; WEIJS, L.; AZEVEDO, A. F.; TORRES, J. P. M. *et al.* Anthropogenic and naturally-produced organobrominated compounds in marine mammals from Brazil. *Environment International*, v. 36, n. 1, p. 60-67, 2010.

EDWARDS, H. H.; SCHNELL, G. D. Status and ecology of *Sotalia fluviatilis* in the Cayos Miskito Reserve, Nicaragua. *Marine Mammal Science*, v. 17, n. 3, p. 445-472, 2001.

EMIN-LIMA, N. R.; RODRIGUES, A. L. F.; MOURA, L. N.; SILVA, M. L. Habitat use and group characteristics of Tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) (Cetacea: Delphinidae) in Marapanim Bay, Pará, Brasil. Workshop on Research and Conservation of the genus *Sotalia*, 2006. Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, v. 1, p. 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v. 131, n. 2, p. 479-91, 1992.

FLORES, P. A. C. Preliminary results of a photoidentification study of the marine tucuxi, *Sotalia fluviatilis*, in Southern Brazil. *Marine Mammal Science*, v. 15, n. 3, p. 840-847, 1999.

FLORES, P. A. C.; BAZZALO, M. Home ranges and movements patterns on the marine tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) in Baía Norte, southern Brazil. *The Latin American Journal Of Aquatic Mammals*, v. 3, n. 1, 2004.

FRAGOSO, A. B. L. *Alterações morfológicas e patológicas em esqueletos de boto-cinza Sotalia fluviatilis (Gervais, 1853) do litoral do Estado do Rio de Janeiro*. 2001. (Masters). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. *Comptes rendus biologiques*, v. 326 Suppl 1, p. S22-9, 2003.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. *Fundamentos de Genética da Conservação*. 1. Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 259 ISBN 978-85-89265-08-09.

FRATINI, S.; ZANE, L.; RAGIONIERI, L.; VANNINI, M.; CANNICCI, S. Relationship between heavy metal accumulation and genetic variability decrease in the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus* (Decapoda; Grapsidae). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, v. 79, n. 4, p. 679-686, 2008.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, v. 147, n. 2, p. 915-25, 1997.

FU, Y. X.; LI, W. H. Statistical Tests of Neutrality of Mutations. *Genetics*, v. 133, n. 3, p. 693-709, 1993.

FUTUYMA, D. *Biologia Evolutiva*. 2. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002. 631

GARANT, D.; KRUK, L. E. How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 7, p. 1843-59, 2005.

GARCÍA, C.; TRUJILLO, F. Preliminary observations on habitat use patterns of the marine tucuxi, *Sotalia fluviatilis*, in Cispatá Bay, Colombian Caribbean Coast. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, v. 3, n. 1, p. 53-59, 2004.

GARDESTROM, J.; DAHL, U.; KOTSALAINEN, O.; MAXSON, A.; ELFWING, T.; GRAHN, M. *et al.* Evidence of population genetic effects of long-term exposure to contaminated sediments - A multi-endpoint study with copepods. *Aquatic Toxicology*, v. 86, n. 3, p. 426-436, 2008.

GEISE, L. *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae) population in the Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mammalia*, v. 55, n. 3, p. 371-379, 1991.

GEISE, L.; GOMES, N.; CERQUEIRA, R. Behaviour, habitat use and population size of *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853) (Cetacea, Delphinidae) in the Cananéia estuary region, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, p. 183-194, 1999.

GESAMP. *Protecting the Oceans from Land-based Activities*. UNEP, p.162. 2001a

GESAMP. *A Sea of Troubles*. UNEP, p.35. 2001b

GONZALEZ-RODRIGUEZ, E.; VALENTIN, J. L.; ANDRE, D. L.; JACOB, S. A. Upwelling and downwelling at Cabo Frio (Brazil): comparison of biomass and primary production responses. *Journal of Plankton Research*, v. 14, n. 2, p. 289-306, 1992.

HARPENDING, H. C.; BATZER, M. A.; GURVEN, M.; JORDE, L. B.; ROGERS, A. R.; SHERRY, S. T. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 4, p. 1961-7, 1998.

HARRISON, R. G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 4, p. 6-11, 1989.

HARWOOD, J. Marine mammals and their environment in the twenty-first century. *Journal of Mammalogy*, v. 82, n. 3, p. 630-640, 2001.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry*, v. 54, p. 1015-69, 1985.

HAUB, C. World population highlights: Key findings from PRB's 2007 world population data sheet. *Population bulletin*, 2007.

HAWKINS, A. J. Population responses to contaminant exposure in marine animals: influences of genetic diversity measured as allozyme polymorphism. *Archives of Toxicology Supplement*, v. 20, p. 429-39, 1998.

HEBERT, P. D.; LUIKER, M. M. Genetic effects of contaminant exposure--towards an assessment of impacts on animal populations. *Science of the Total Environment*, v. 191, n. 1-2, p. 23-58, 1996.

HOEKSTRA, P. F.; O'HARA, T. M.; FISK, A. T.; BORGÅ, K.; SOLOMON, K. R.; MUIR, D. C. G. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environmental Pollution*, v. 124, n. 3, p. 509-522, 2003.

HOELZEL, A. R.; HANCOCK, J. M.; DOVER, G. A. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology & Evolution*, v. 8, n. 4, p. 475-93, 1991.

IMAEDA, D.; KUNISUE, T.; OCHI, Y.; IWATA, H.; TSYDENOVA, O.; TAKAHASHI, S. *et al.* Accumulation features and temporal trends of PCDDs, PCDFs and PCBs in Baikal seals (*Pusa sibirica*). *Environmental Pollution*, v. 157, n. 3, p. 737-47, 2009.

IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, v. 32, n. 2, p. 128-44, 1991.

ISOBE, T.; OCHI, Y.; RAMU, K.; YAMAMOTO, T.; TAJIMA, Y.; YAMADA, T. K. *et al.* Organohalogen contaminants in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Japan: present contamination status, body distribution and temporal trends (1978-2003). *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, n. 3, p. 396-401, 2009.

IUCN. The International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. 2008. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/> >.

IVERSON, S. J.; FIELD, C.; DON BOWEN, W.; BLANCHARD, W. Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecological Monographs*, v. 74, n. 2, p. 211-235, 2004.

JEFFERSON, T. A.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M. A. *Marine mammals of the world*. Rome: FAO, 1993. 587 ISBN 92-5-103292-0.

JOHNSTON, D. W.; ROBBINS, J.; CHAPLA, M. E.; MATTILA, D. K.; ANDREWS, K. R. Diversity, habitat associations and stock structure of odontocete cetaceans in the waters of American Samoa, 2003-06. *Journal of Cetacean Research and Management*, v. 10, n. 1, p. 59-66, 2008.

KAJIWARA, N.; MATSUOKA, S.; IWATA, H.; TANABE, S.; ROSAS, F. C.; FILLMANN, G. *et al.* Contamination by persistent organochlorines in cetaceans incidentally caught along Brazilian coastal waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 46, n. 1, p. 124-34, 2004.

KNAP, A.; DEWAILLY, E.; FURGAL, C.; GALVIN, J.; BADEN, D.; BOWEN, R. E. *et al.* Indicators of ocean health and human health: developing a research and monitoring framework. *Environmental Health Perspective*, v. 110, n. 9, p. 839-45, 2002.

KNAPEN, D.; DE WOLF, H.; KNAEPKENS, G.; BERVOETS, L.; EENS, M.; BLUST, R. *et al.* Historical metal pollution in natural gudgeon populations: Inferences from allozyme, microsatellite and condition factor analysis. *Aquatic Toxicology*, v. 95, n. 1, p. 17-26, 2009.

KUNITO, T.; NAKAMURA, S.; IKEMOTO, T.; ANAN, Y.; KUBOTA, R.; TANABE, S. *et al.* Concentration and subcellular distribution of trace elements in liver of small cetaceans incidentally caught along the Brazilian coast. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, n. 7-8, p. 574-587, 2004.

LAETA, M. *Anomalias ósseas congênitas em Sotalia guianensis van Bénédén, 1864 (Cetacea, Delphinidae) da costa centro-norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil.* 2007. 73 (Monografia). Universidade Federal Fluminense, Niterói.

LAETA, M.; MENDONÇA de SOUZA, S. M. F.; EMIN-LIMA, N. R.; RODRIGUES, A. L. F.; COSTA, A. F.; SOUSA, M. E. M. Lesões ósseas nas colunas vertebrais de botos-cinza, *Sotalia guianensis*, da costa do Estado do Pará, Brasil. Anais da XIII Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Acuáticos de América del Sur y 7o. Congreso SOLAMAC, 2008a. Uruguay.

LAETA, M.; MENDONÇA de SOUZA, S. M. F.; SICILIANO, S.; EMIN-LIMA, N. R.; RODRIGUES, A. L. F.; COSTA, A. F. *et al.* Lesões ósseas nas colunas vertebrais de botos-cinza, *Sotalia guianensis*, da costa do Estado do Pará, Brasil., Anais da XIII Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Acuáticos de América del Sur y 7o. Congreso SOLAMAC, 2008b. Montevideo, Uruguai.

LAILSON-BRITO, J.; AZEREDO, M. A. A.; MALM, O.; RAMOS, R. A.; DI BENEDETTO, A. P. M.; SALDANHA, M. F. C. Trace metal concentrations in liver and kidney of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, of the North coast of the Rio de Janeiro State, Brazil. *The Latin American Journal of Aquatic Mammals*, v. 1, p. 107-114, 2002.

LAÍLSON-BRITO, J.; AZEREDO, M. A. A.; MALM, O.; RAMOS, R. A.; DI BENEDETTO, A. P. M.; SALDANHA, M. F. C. Trace metal concentrations in liver and kidney of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, of the North coast of the Rio de Janeiro State, Brazil. *The Latin American Journal of Aquatic Mammals*, v. 1, p. 107-114, 2002.

LAÍLSON-BRITO, J.; MEIRE, R. O.; SILVA, C. E. A.; MASSENA, E. P.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. *et al.* DDT and PCB in blubber of killer whale, *Orcinus orca*, and marine tucuxi dolphin, *Sotalia fluviatilis*, from Rio de Janeiro State, Brazil. *Organohalogen Compound*, v. 62, p. 364-366, 2003.

LAMON, L.; DALLA VALLE, M.; CRITTO, A.; MARCOMINI, A. Introducing an integrated climate change perspective in POPs modelling, monitoring and regulation. *Environmental Pollution*, 2009.

LANDE, R.; SHANNON, S. The Role of Genetic Variation in Adaptation and Population Persistence in a Changing Environment. *Evolution*, v. 50, n. 1, p. 434-437 1996.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v. 25, n. 11, p. 1451-2, 2009.

LODI, L. *Uso de habitat e preferências do boto-cinza, Sotalia fluviatilis (Cetacea, Delphinidae), na Baía de Paraty, Rio de Janeiro.* 2002. (Masters). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LODI, L. Tamanho e composição de grupo dos botos-cinza, *Sotalia guianensis* (van Bénédén, 1964) (Cetacea, Delphinidae), na baía de Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. *Atlântica*, v. 25, n. 2, p. 135-146, 2003.

LODI, L.; HETZEL, B. Grandes agregações do boto-cinza (*Sotalia fluviatilis*) na baía da Ilha Grande, Rio de Janeiro. *Bioikos*, v. 12, n. 2, p. 26-30, 1998.

LONG, J. C. The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-Statistics. *Genetics*, v. 112, n. 3, p. 629-647, 1986.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, v. 27, n. 2, p. 209-220, 1967.

MASCARENHAS, A. S.; MIRANDA, L. B.; ROCK, N. J. A study of oceanographic conditions in the region of Cabo Frio. In: JOHN D. COSTLOW, J. (Ed.). *Fertility of the Sea*. New York: Gordon and Breach, 1971. p.285–308.

MATSON, C. W.; GILLESPIE, A. M.; MCCARTHY, C.; MCDONALD, T. J.; BICKHAM, J. W.; SULLIVAN, R. *et al.* Wildlife toxicology: biomarkers of genotoxic exposures at a hazardous waste site. *Ecotoxicology*, v. 18, n. 7, p. 886-898, 2009.

MAY-COLLADO, L. J.; WARTZOK, D. A characterization of Guyana dolphin (*Sotalia guianensis*) whistles from Costa Rica: The importance of broadband recording systems. *The Journal of the Acoustical Society of America*, v. 125, n. 2, p. 1202-1213, 2009.

MEADE, R. H.; DUNNE, T.; RICHEY, J. E.; SANTOS, U. D. M.; SALATI, E. Storage and remobilization of suspended sediment in the lower amazon river of Brazil. *Science*, v. 228, n. 4698, p. 488-490, 1985.

MEDINA, M. H.; CORREA, J. A.; BARATA, C. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere*, v. 67, n. 11, p. 2105-2114, 2007.

MEEKS, H. N.; CHESSER, R. K.; RODGERS, B. E.; GASCHAK, S.; BAKER, R. J. Understanding the genetic consequences of environmental toxicant exposure: Chernobyl as a model system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, n. 9, p. 1982-1994, 2009.

MONTEIRO-NETO, C.; ITAVO, R. V.; DE SOUZA MORAES, L. E. Concentrations of heavy metals in *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae) off the coast of Ceará, northeast Brazil. *Environmental Pollution*, v. 123, n. 2, p. 319-324, 2003.

MOORE, S. E. Long-term environmental change and marine mammals. In: J. E. REYNOLDS III; W. F. PERRIN, *et al* (Ed.). *Marine mammal research: Conservation beyond crisis*. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, 2005. p.137–147.

MOORE, S. E. Marine mammals as ecosystem sentinels. *Journal of Mammalogy*, v. 89, n. 3, p. 534-540, 2008.

MOURA, J. F. *O boto-cinza (Sotalia guianensis) como sentinela da saúde dos ambientes costeiros: estudo das concentrações de mercúrio no estuário Amazônico e costa norte do Rio de Janeiro*. 2009. 124 Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro.

NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 1987.

NEI, M.; KUMAR, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press, 2000. 333 ISBN 0-19-513584-9.

NERY, M. F.; ESPÉCIE, M. D. A.; SIMÃO, S. M. Site fidelity of *Sotalia guianensis* (Cetacea: Delphinidae) in Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 25, p. 182-187, 2008.

NILSSON, E. E.; ANWAY, M. D.; STANFIELD, J.; SKINNER, M. K. Transgenerational epigenetic effects of the endocrine disruptor vinclozolin on pregnancies and female adult onset disease. *Reproduction*, v. 135, n. 5, p. 713-721, 2008.

O'CORRY-CROWE, G. M.; SUYDAM, R. S.; ROSENBERG, A.; FROST, K. J.; DIZON, A. E. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, v. 6, n. 10, p. 955-970, 1997.

O'HARA, T. M.; O'SHEA, T. J. Assessing impacts of environmental contaminants. In: J. E. REYNOLDS III; W. F. PERRIN, *et al* (Ed.). *Marine mammal research: Conservation beyond crisis* Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, 2005.

ODUM, E. *Ecologia*. 5^a. Editora Guanabara, 1988. 632

ORTEGA-ORTIZ, J. G.; VILLA-RAMÍREZ, B.; GERSENOWIES, J. R. Polydactyly and other features of the manus of the vaquita, *Phocoena sinus*. *Marine Mammal Science*, v. 16, n. 2, p. 277-286, 2000.

PATTON, M. A. Genetic aspects of congenital malformations. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 1, n. 3, p. 723-735, 1987.

PEREIRA, L. C. C. *A Zona Costeira Amazônica Brasileira: limite e características*. Anais da 59ª Reunião Anual do Simpósio Zona Costeira Amazônica, SBPC. Belém, PA: 2 p. 2007.

PERRIN, W. F.; WURSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M., Eds. *Encyclopedia of Marine Mammals*. San Diego, CA: Academic Press, p.1352, 2 ed. 2002.

PICHLER, F. B.; BAKER, C. S. Loss of genetic diversity in the endemic Hector's dolphin due to fisheries-related mortality. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 267, n. 1438, p. 97-102, 2000.

PNUMA. *GEO BRASIL 2002: Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil*. IBAMA/PNUMA. Brasília. 2002

PNUMA. *Perspectivas do Meio Ambiente Mundial 2002. GEO-3: Passado, presente e futuro*. IBAMA/PNUMA. Brasília. 2004

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, n. 1, p. 37-45, 2001.

RAMIREZ-SORIANO, A.; RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J.; CALAFELL, F.; NAVARRO, A. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, v. 179, n. 1, p. 555-67, 2008.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, n. 12, p. 2092-100, 2002.

REED, D. H.; BRISCOE, D. A.; FRANKHAM, R. Inbreeding and extinction: The effect of environmental stress and lineage. *Conservation Genetics*, v. 3, n. 3, p. 301-307, 2002.

REIDERSON, T. H. *Zoo and wild animal medicine*. St. Louis: Saunders, 2003. 782

RICHEY, J. E.; MEADE, R. H.; SALATI, E.; DEVOL, A. H.; NORDIN JR, C. F.; DOS SANTOS, U. Water discharge and suspended sediment concentrations in the Amazon River: 1982-1984. *Water Resources Research*, v. 22, n. 5, p. 756-764, 1986.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, v. 9, n. 3, p. 552-69, 1992.

ROSEL, P. E.; DIZON, A. E.; HAYGOOD, M. G. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on interoceanic and regional scales. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 52, p. 1210-1219, 1995.

ROSS, P. S.; BIRNBAUM, L. S. Integrated human and ecological risk assessment: A case study of persistent organic pollutants (POPs) in humans and wildlife. *Human and Ecological Risk Assessment*, v. 9, n. 1 SPEC. ISS., p. 303-324, 2003.

ROSS, P. S.; ELLIS, G. M.; IKONOMOU, M. G.; BARRETT-LENNARD, L. G.; ADDISON, R. F. High PCB concentrations in free-ranging Pacific killer whales,

Orcinus orca: effects of age, sex and dietary preference. *Marine Pollution Bulletin*, v. 40, n. 6, p. 504-515, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 ISBN 0-87969-309-6.

SANTOS, C.; MONTIEL, R.; ARRUDA, A.; ALVAREZ, L.; ALUJA, M. P.; LIMA, M. Mutation patterns of mtDNA: empirical inferences for the coding region. *BMC Evolutionary Biology*, v. 8, p. 167, 2008.

SANTOS, M. C. D. O.; BARÃO ACUÑA, L.; ROSSO, S. Insights on site fidelity and calving intervals of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in south-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 81, n. 6, p. 1049-1052, 2001.

SANTOS, M. C. O.; ROSSO, S.; SANTOS, R. A.; LUCATO, S. H. B.; BASSOI, M. Insights on small cetacean feeding habits in southeastern Brazil. *Aquatic Mammals* v. 28, p. 38-45, 2002.

SANTOS, M. C. O.; ROSSO, S.; SICILIANO, S.; ZERBINI, A. N.; ZAMPIROLI, E.; VICENTE, A. *et al.* Behavioral observations of the marine tucuxi dolphin (*Sotalia fluviatilis*) in São Paulo estuarine waters, Southeastern Brasil. *Aquatic Mammals*, v. 26, n. 3, p. 260-267, 2000.

SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, v. 152, n. 3, p. 1079-1089, 1999.

SEIXAS, T. G.; KEHRIG, H. A.; DI BENEDITTO, A. P. M.; SOUZA, C. M. M.; MALM, O.; MOREIRA, I. Essential (Se, Cu) and non-essential (Ag, Hg, Cd) elements: What are their relationships in liver of *Sotalia guianensis* (Cetacea, Delphinidae)? *Marine Pollution Bulletin*, v. 58, n. 4, p. 629-634, 2009a.

SEIXAS, T. G.; KEHRIG, H. A.; DI BENEDITTO, A. P. M.; SOUZA, C. M. M.; MALM, O.; MOREIRA, I. Trace elements in different species of cetacean from Rio de Janeiro coast. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 2, p. 243-251, 2009b.

SHOLL, T. G. C.; NASCIMENTO, F. F.; LEONCINI, O.; BONVICINO, C. R.; SICILIANO, S. Taxonomic identification of dolphin love charms commercialized in the Amazonian region through the analysis of cytochrome b DNA. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 88, n. Special Issue 06, p. 1207-1210, 2008.

SICILIANO, S.; MORENO, I. B.; SILVA, E. D.; ALVES, V. C. *Baleia, botos e golfinhos na Bacia de Campos*. Rio de Janeiro: ENSP/FIOCRUZ, 2005. 100

SIMÃO, S. M.; PIZZORNO, J. L.; PERRY, V. N.; SICILIANO, S. Aplicação da técnica de foto-identificação do boto-cinza, *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae) da Baía de Sepetiba. *Floresta e Ambiente* v. 7, p. 31-39, 2000.

SIMÕES-LOPES, P. C. Ocorrência de uma população de *Sotalia fluviatilis* (Gervais, 1853, Cetacea, Delphinidae) no limite sul de sua distribuição, Santa Catarina, Brasil. *Biotemas* v. 1, p. 57-62, 1988.

SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, v. 129, n. 2, p. 555-562, 1991.

SLOOTEN, E.; LAD, F. Population biology and conservation of Hector's dolphin. *Canadian Journal of Zoology*, v. 69, n. 6, p. 1701-1707, 1991.

SPIELMAN, D.; BROOK, B. W.; FRANKHAM, R. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 42, p. 15261-15264, 2004.

STATON, J. L.; SCHIZAS, N. V.; CHANDLER, G. T.; COULL, B. C.; QUATTRO, J. M. Ecotoxicology and population genetics: the emergence of "phylogeographic and evolutionary ecotoxicology". *Ecotoxicology*, v. 10, n. 4, p. 217-22, 2001.

STEIDINGER, K. A.; BADEN, D. G. Toxic marine dinoflagellates. *Dinoflagellates*, p. 201-261, 1984.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.

TABUCHI, M.; VELDHOEN, N.; DANGERFIELD, N.; JEFFRIES, S.; HELBING, C. C.; ROSS, P. S. PCB-related alteration of thyroid hormones and thyroid hormone receptor gene expression in free-ranging harbor seals (*Phoca vitulina*). *Environmental Health Perspective*, v. 114, n. 7, p. 1024-31, 2006.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.

TAJIMA, F. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, v. 143, n. 3, p. 1457-65, 1996.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology & Evolution*, v. 24, n. 8, p. 1596-9, 2007.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology & Evolution*, v. 10, n. 3, p. 512-26, 1993.

TIBBETTS, J. Coastal cities: living on the edge. *Environmental Health Perspective*, v. 110, n. 11, p. A674-81, 2002.

UNEP. *Marine and coastal ecosystems and human well-being: a synthesis report based on the findings of the Millennium Ecosystem Assessment*. UNEP, p.76. 2006

VALENTIN, J. L.; COUTINHO, R. Modelling maximum chlorophyll in the Cabo Frio (Brazil) upwelling: a preliminary approach. *Ecological Modelling*, v. 52, n. C, p. 103-113, 1990.

VALENTIN, J. L.; MONTEIRO-RIBAS, W. M. Zooplankton community structure on the east-southeast Brazilian continental shelf (18-23°S latitude). *Continental Shelf Research*, v. 13, n. 4, p. 407-424, 1993.

VAN BRESSEM, M.-F.; VAN WAEREBEEK, K.; REYES, J.; FÉLIX, F.; ECHEGARAY, M.; SICILIANO, S. *et al.* A preliminary overview of skin and skeletal diseases and traumata in small cetaceans from South American waters. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, v. 6, n. 1, p. 7-42, 2007.

VAN BRESSEM, M. F.; RAGA, J. A.; DI GUARDO, G.; JEPSON, P. D.; DUIGNAN, P. J.; SIEBERT, U. *et al.* Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the

possible role of environmental stressors. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 86, n. 2, p. 143-157, 2009a.

VAN BRESSEM, M. F.; SANTOS, M. C. D. O.; OSHIMA, J. E. D. F. Skin diseases in Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Paranaguá estuary, Brazil: A possible indicator of a compromised marine environment. *Marine Environmental Research*, v. 67, n. 2, p. 63-68, 2009b.

van STRAALLEN, N.; TIMMERMANS, M. Genetic Variation in Toxicant-Stressed Populations: An Evaluation of the "Genetic Erosion" Hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, v. 8, n. 5, p. 983 - 1002, 2002.

WEBER, R.; GAUS, C.; TYSKLIND, M.; JOHNSTON, P.; FORTER, M.; HOLLERT, H. *et al.* Dioxin- and POP-contaminated sites - contemporary and future relevance and challenges: overview on background, aims and scope of the series. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 15, n. 5, p. 363-93, 2008.

WELLS, R.; RHINEHART, H.; HANSEN, L.; SWEENEY, J.; TOWNSEND, F.; STONE, R. *et al.* Bottlenose dolphins as marine ecosystem sentinels: developing a health monitoring system. *EcoHealth*, v. 1, p. 246-254, 2004.

WILSON, L. C.; CANN, R. L.; CARR, S. M.; M, G.; GYLLENSTEN, U. B.; HELM-BYCHOWSKI, K. M. *et al.* Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 26, n. 4, p. 375-400, 1985.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, v. 15, p. 323-354, 1951.

WRIGHT, S. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution*, v. 19, n. 3, p. 395-420, 1965.

YASSI, A.; KJELLSTROM, T.; KOK, T.; GUIDOTTI, T. *Basic Environmental Health*. Oxford University Press, 2001. 456

YOGUI, G. T.; SANTOS, M. C. O.; MONTONE, R. C. Chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in marine tucuxi dolphins (*Sotalia fluviatilis*) from the Cananeia estuary, southeastern Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 312, n. 1-3, p. 67-78, 2003.

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, v. 12, n. 3, p. 563-84, 2003.