

## Metabolismo de lipídios em cetáceos: identificação de estoques populacionais, itens alimentares e gliceroneogênese



Glauco da Silva Caon

Porto Alegre, setembro de 2007.

# Metabolismo de lipídios em cetáceos: identificação de estoques populacionais, itens alimentares e gliceroneogênese

Aluno: Glauco da Silva Caon  
Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Kucharski

Esta tese faz parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia pelo programa de pós-graduação do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Cave ab omni unius librum.*  
(cuidado com o homem de um só livro)

## Agradecimentos

Este trabalho não poderia ser realizado sem a colaboração, parceria, amizade e carinho de várias pessoas. Por isso gostaria de agradecer especialmente a minha família, minha mãe, Olga (autora das xilogravuras presentes nesta tese), meu pai, Flávio, e meu irmão, Guilherme, e também tios, primos e avó. Todos sempre entenderam a minha necessidade de procurar novos horizontes, tentar fazer novas perguntas para encontrar diferentes respostas, e então perguntar de novo.

Ao meu orientador Luiz Carlos Rios Kucharski. Fui seu primeiro orientado no mestrado, e agora no doutorado. Isso me honra demais pois a admiração desde os tempos de graduação é baseada no exemplo que ele é para mim como profissional e amigo.

À Profa. Roselis, pela paciência e auxílio durante os experimentos, bem como a todos meus grandes amigos do laboratório, sejam colegas de pós ou estagiários, que tornaram as horas de experimento e redação muito mais felizes. Sem vocês esta tese não teria o sentido que tem hoje.

Aos grandes amigos da cetolaria, exemplos de como se faz pesquisa em biologia para o bem das espécies, do meio ambiente, do mundo em que vivemos, e não para nossos próprios umbigos ou carreiras. À Eduardo Secchi, Juliana Di Tulio, Lilian Hoffman, Márcia Bozzetti, Mônica Danielsky, Munir Mehsen, Paulo André Flores e Pedro Fruet. Aos amigos Fernando Rosas, Salvatore Siciliano, Ana Paula Di Benedetto e Shirley Pacheco de Souza, que também

foram colaboradores dos trabalhos aqui apresentados, sempre prontos para auxiliar nas dúvidas, coletas e sugestões.

A Eduardo Peixoto, Enrique Litman, e estagiários do IBF, ao Dr. Lauro Barcelos (MORG/FURG), ao Prof. Dr. Adriano Brandelli e Aline Leuven (ICTA) por permitirem o uso da infra-instrutura das suas instituições e acolhida para a realização dos trabalhos de campo e análise do material. À Profª. Ilma pelo uso dos equipamentos e infraestrutura para os experimentos de biologia molecular.

Ao CNPq que bancou todas as despesas deste doutorado.

Aos professores Edison Capp, Fafá, Denise Zancan, Adriane Belló, Ilma e Olegário pelos ensinamentos e paciência.

Ao pessoal da secretaria do pós-graduação que sempre auxiliou no desenvolvimento dessa tese.

À Janaína Caobelli pelo carinho, amizade e pelo exemplo de força de vontade e amor às coisas importantes da vida.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, muito obrigado.

# Índice

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>PREFÁCIO</b> .....	<b>1</b>
ESTRUTURA DA TESE .....	4
<b>CAPÍTULO 1. UTILIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA CAMADA DE GORDURA COMO MARCADORES POPULACIONAIS</b> .....	<b>6</b>
1.1. PROBLEMAS DE CONSERVAÇÃO EM CETÁCEOS .....	6
1.1.1. <i>Caça</i> .....	7
1.1.2. <i>Captura acidental</i> .....	8
1.1.3. <i>Outros problemas de conservação</i> .....	10
1.2. PLANOS DE AÇÃO E MANEJO .....	10
1.2.1. TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTOQUES POPULACIONAIS.....	12
1.2.1.1. Biologia molecular .....	12
1.2.1.2. Fotoidentificação .....	14
1.2.1.3. Morfometria .....	15
1.2.1.4. Assinaturas de ácidos graxos.....	16
1.3. EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA CAMADA DE GORDURA DA FRANCISCANA ( <i>PONTOPORIA BLAINVILLEI</i> ) NA COSTA BRASILEIRA COMO PARÂMETRO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTOQUES POPULACIONAIS.....	22
1.3.1. RESUMO.....	23
1.3.2. INTRODUÇÃO .....	24
1.3.2.1. Distribuição geográfica e características gerais.....	24
1.3.2.2. Tamanho populacional e principais problemas de conservação .....	25
1.3.3. OBJETIVO.....	27
2.7.1. <i>Objetivos específicos</i> .....	27
1.3.4. MÉTODO .....	28
1.3.4.1. Coleta da camada de gordura.....	28
1.3.4.2. Extração dos lipídios totais.....	30
1.3.4.3. Identificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa .....	30
1.3.4.4. Análise estatística .....	33
1.3.5. RESULTADOS .....	37
1.3.6. DISCUSSÃO .....	42
1.4. EXPERIMENTO 2: COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA CAMADA DE GORDURA DA BALEIA JUBARTE ( <i>MEGAPTERA NOVAEANGLIAE</i> ) NO LITORAL BRASILEIRO E NA ANTÁRTICA. ....	50
1.4.1. RESUMO.....	51
1.4.2. INTRODUÇÃO .....	52
1.4.2.1. A baleia jubarte ( <i>Megaptera novaeangliae</i> ) (Borowski, 1781) .....	52
1.4.3. OBJETIVO.....	55
1.4.3.1. <i>Objetivos específicos</i> .....	55
1.4.4. MÉTODO .....	55
1.4.4.1. Coleta do tecido adiposo .....	55
1.4.4.2. Análise estatística .....	58
1.4.5. RESULTADOS .....	59
1.4.6. DISCUSSÃO .....	62
<b>CAPÍTULO 2. UTILIZAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA CAMADA DE GORDURA NA IDENTIFICAÇÃO DA DIETA EM CETÁCEOS</b> .....	<b>67</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	67
2.1.1. <i>Metodologias utilizadas para identificação da ecologia alimentar</i> .....	68

2.1.1.1. Observação direta .....	68
2.1.1.2. Conteúdo estomacal .....	68
2.1.1.3. Isótopos estáveis .....	70
2.1.1.4. Ácidos graxos .....	71
2.2. EXPERIMENTO 3: IDENTIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA CAMADA DE GORDURA DO BOTO ( <i>TURSIOPS TRUNCATUS</i> ) NA LAGOA DOS PATOS, RIO GRANDE DO SUL, E SUA RELAÇÃO COM A DIETA. ....	73
2.2.1. RESUMO .....	74
2.2.2. INTRODUÇÃO .....	75
2.2.2.1. O golfinho-nariz-de-garrafa, <i>Tursiops truncatus</i> (Montagu 1821) .....	75
2.2.3. OBJETIVO .....	78
2.2.3.1. Objetivos específicos .....	78
2.2.4. MÉTODO .....	78
2.2.4.1. Coleta das amostras .....	78
2.2.5. RESULTADOS .....	81
2.2.6. DISCUSSÃO .....	87
<b>CAPÍTULO 3. GLICERONEOGÊNESE EM CETÁCEOS .....</b>	<b>92</b>
3.1. Introdução .....	92
3.1.1. A via gliceroneogênica .....	92
3.1.1.1. O papel da PEPCK-C na gliceroneogênese e a sua regulação .....	96
3.1.1.2. Porque estudar a gliceroneogênese em cetáceos? .....	98
3.2. EXPERIMENTO 4: IDENTIFICAÇÃO DA VIA GLICERONEOGÊNICA EM BALEIAS-FRANCA-DO-SUL ( <i>EUBALAENA AUSTRALIS</i> ) E NO BOTO ( <i>TURSIOPS TRUNCATUS</i> ): A VIA DA MIGRAÇÃO? .....	101
3.2.1. RESUMO .....	102
3.2.2. INTRODUÇÃO .....	103
3.2.2.1. A baleia-franca-do-sul, <i>Eubalaena australis</i> (Desmoulin 1822) .....	103
3.2.2.2. O golfinho-nariz-de-garrafa, <i>Tursiops truncatus</i> (Montagu 1821) .....	106
3.2.3. OBJETIVO GERAL .....	106
3.2.3.1. Objetivos específicos .....	106
3.2.4. MÉTODO .....	107
3.2.4.1. Biópsias .....	107
3.2.4.2. Incubação do tecido adiposo .....	113
3.2.4.3. Extração de RNA .....	114
3.2.5. RESULTADOS .....	116
3.2.5.1. Incorporação do piruvato-[1-C <sup>14</sup> ] pelo tecido adiposo .....	116
3.2.5.2. Teste de integridade da amostra coletada .....	117
3.2.6. DISCUSSÃO .....	117
<b>4. REFERÊNCIAS CITADAS .....</b>	<b>122</b>
<b>5. ANEXOS .....</b>	<b>138</b>
ANEXO I. FICHA DE REAÇÃO À BIÓPSIA. ....	139
ANEXO II. ARTIGO SUBMETIDO COMO <i>SHORT COMMUNICATION</i> PARA PUBLICAÇÃO NA <i>JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY</i> . ....	140

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados de campo sobre as franciscanas (*P. blainvillei*) analisadas no experimento 1 (página 29).

Tabela 2. Padrões de ácidos graxos utilizados nos experimentos 1, 2 e 3 (página 32).

Tabela 3. Espécies predadas pela franciscana ao longo da costa brasileira, onde A= Pinedo (1982); B= Bassoi (1997); C= Ott (1995); D= Oliveira et al. (1998); E= Schimegelow (1990); F= Di Benedetto (2000). 'x' representa presença da espécie na dieta da franciscana para a região correspondente (página 35).

Tabela 4. Porcentagens dos ácidos graxos (AG) presentes na camada de gordura das franciscanas do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ) (página 38).

Tabela 5. Dados das baleias jubartes (*Megaptera novaeangliae*) coletadas na Antártica e litoral brasileiro utilizadas neste estudo (página 59).

Tabela 6. Porcentagens dos ácidos graxos identificados nos animais coletados na Antártida e no Rio de Janeiro (página 61).



Tabela 7. Indivíduos de *T. truncatus* coletados encalhados no litoral do Rio Grande do Sul e utilizados neste trabalho (página 79).

Tabela 8. Espécies de peixes que compõem a alimentação de *T. truncatus* analisados neste trabalho (página 80).

Tabela 9. Porcentagens dos ácidos graxos identificados nas camadas interna e externa de gordura do boto (*T. truncatus*) (página 82).

Tabela 10. Ácidos graxos presentes nos peixes presentes na dieta de *T. truncatus* para o litoral sul do Rio Grande do Sul. (página 84).

Tabela 11. Variação de significância estatística através do teste-t de Student entre as porcentagens dos ácidos graxos identificados nos peixes e os ácidos graxos identificados na camada de gordura interna e externa dos botos (*T. truncatus*) (página 84).

Tabela 12. Composição do krill descongelado e seco (página 99).

Tabela 13. Valores de formação de glicerol marcado no tecido adiposo da baleia franca do sul (*E. australis*) e do golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) (página 116).

## Lista de figuras

Figura 1: Sugestão de organização do trabalho de criação de ações de manejo e conservação, adaptado de Sutherland (2000) (página 11).

Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos polinsaturados (página 19).

Figura 3. Exemplar de franciscana (*Pontoporia blainvillei*) capturada acidentalmente no litoral norte do Rio Grande do Sul. (foto: Glauco Caon©).

Figura 4. Distribuição e Áreas de Manejo da Franciscana (FMAs) (adaptado de Secchi et al. 2001) (página 27).

Figura 5. Exemplo de camada de gordura da franciscana demonstrando a epiderme, camada de gordura externa, camada interna e musculatura adjacente (página 28).

Figura 6. Cromatógrafo gasoso Shimadzu GC14-B com detector de FID (página 31).

Figura 7. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa demonstrando os picos com seus respectivos tempos de retenção e ácidos graxos identificados, onde o primeiro número representa o tempo de retenção (e.g. 15.324) e o segundo o ácido graxo representado por aquele pico (e.g. 18:0, 22:4n-6) (página 33).

Figura 8. Ácidos graxos identificados na camada de gordura das franciscanas do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ) (página 37).

Figura 9. Cluster da composição de ácidos graxos da camada de gordura da franciscana (*P. blainvillei*) para os animais do RS, PR, SP e RJ (animais com código BB[no.]-Pb[no.]) utilizando o padrão FAME MIX ® (página 40).

Figura 10. Cluster da composição de ácidos graxos da camada de gordura da franciscana (*P. blainvillei*) para os animais do RS, PR, SP e RJ utilizando os padrões PUFA-2 (*Animal Source*) e PUFA-3 (*Menhaden Oil*) (página 41).

Figura 11. Cluster realizado com as espécies de peixes, cefalópodes e crustáceos na dieta da franciscana (*P. blainvillei*) ao longo da distribuição na costa brasileira (página 42).

Figura 12. Concentração de lipídios totais da camada de gordura de franciscanas (*P. blainvillei*) entre os estados brasileiros do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e São Paulo (SP). \*= diferença significativa entre o RS e PR ( $P < 0,05$ ) (página 47).

Figura 13. Detalhe dorsal da cabeça e das nadadeiras peitoral e dorsal da baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) no Estreito de Gerlache, Península Antártica (fotos: Glauco Caon<sup>©</sup>) (página 52).

Figura 14. Mapas da localização das biópsias de baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) realizadas no Estreito de Gerlache, oeste da Península Antártica (página 56).

Figura 15. Detalhe da balestra e ponteira utilizadas na coleta de biópsias do tecido adiposo e pele de cetáceos (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>) (página 57).

Figura 16. Porcentagem da composição dos ácidos graxos encontrados na Antártida e no litoral do Rio de Janeiro (página 60).

Figura 17. Dendograma da composição de ácidos graxos e tempos de retenção do cromatograma da camada de gordura das baleias jubartes (*M. novaeangliae*) coletadas no Estreito de Gerlache (Antártica) e no litoral do Rio de Janeiro (página 61).

Figura 18. Exemplo de otólito de peixe (foto: cortesia da Australian Antarctic Division © Commonwealth of Australia 2006) (página 69).

Figura 19. Golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*)(Arquipélago de São Pedro e São Paulo, 0°56'N, ©Glauco Caon 2005) (página 76).

Figura 20. Porcentagem dos ácidos graxos identificados na camada interna e externa do boto (*T. truncatus*) (página 82).

Figura 21. Dendograma da composição dos ácidos graxos presentes na camada de gordura dos botos (TT) identificados na tabela 7 e das vísceras, músculo e pele dos peixes (P) identificados na tabela 8 (página 86).

Figura 22. Análise de componentes principais (PCA) realizado utilizando a composição dos ácidos graxos presentes na camada de gordura dos botos (TT) e das vísceras, músculo e pele dos peixes (P) (página 87).

Figura 23. Representação da via gliceroneogênica no tecido adiposo (adaptado de Beale et al. 2002) (página 94).

Figura 24. Esquema da regulação da gliceroneogênese no fígado e no tecido adiposo branco (TAB). O sinal ‘+’ indica os fatores que estimulam a transcrição da PEPCCK, enquanto o sinal ‘-’ indica aqueles que a inibem em cada tecido (adaptado de Forest et al. 2003) (página 97).

Figura 25. Vista da região dorsal da cabeça da baleia franca (©Glauco Caon) (página 104).

Figura 26. Foto do filhote de baleia franca IBF#01 na Praia da Ferrugem, litoral de Santa Catarina (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>) (página 108).

Figura 27. Fotoidentificação da fêmea IBF#02 na Praia da Ferrugem, litoral de Santa Catarina (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>) (página 109).

Figura 28. Mapa dos locais de coleta de tecido para os experimentos sobre gliceroneogênese (página 109).

Figura 29. Imagem de satélite da área de coleta do par mãe e filhote IBF#01 e IBF#02 em Santa Catarina (Fonte: Google Earth<sup>®</sup>) (página 110).

Figura 30. Embarcação utilizada para coleta da baleia franca em Santa Catarina (página 110).

Figura 31. Imagem de satélite da área de coleta dos golfinhos-nariz-de-garrafa LMM-P#24, LMM-P#25 e LMM-P#26, na Barra da Lagoa dos Patos em Rio Grande, Rio Grande do Sul (Fonte: Google Earth<sup>®</sup>) (página 111).

Figura 32. Fotoidentificação dos animais LMM-P#24, LMM-P#25 e LMM-P#26 na Barra da Lagoa dos Patos, Rio Grande, Rio Grande do Sul (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>) (página 112).

Figura 33. Detalhe do tecido adiposo na ponteira após a biópsia, utilizado para os experimentos com RNAm (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>) (página 113).

Figura 34. Gel de agarose demonstrando a integridade do tecido coletado do produto do PCR do 28S para o golfinho LMM-P#25 (*T. truncatus*), a mosca-da-fruta (*Drosophila sp.*), e o controle negativo com água (página 117).



## Prefácio

Estudos sobre a biologia de mamíferos marinhos, de maneira geral, são caros e demandam longo tempo. Especialmente para estudos em fisiologia a dificuldade de acesso às amostras dos animais em seu *habitat* natural são imensas e poucas informações são obtidas se compararmos outras áreas do conhecimento. No Brasil, o acesso quase exclusivo a animais provenientes de captura acidental ou de encalhes em praias é um fator de restrição à pesquisa em fisiologia, devido ao estado de conservação do tecido nestas condições. Porém, é possível observar uma melhoria gradual da infra-estrutura para estes estudos, apontando para o desenvolvimento de novas metodologias para a realização de experimentos *in vitro*, em animais em seu habitat natural e a obtenção de material biológico.

No geral, os recursos são preferivelmente destinados a pesquisas diretamente aplicadas em projetos de conservação e planos de manejo das principais espécies ameaçadas de extinção, como a franciscana (*Pontoporia blainvillei*), por exemplo (Secchi et al. 2003). Os dados obtidos com trabalhos em fisiologia permitem o entendimento de várias etapas do ciclo de vida destes animais e a sua relação com o meio ambiente (Lockyer 1987, 1995), como a ecologia alimentar (Hooker et al. 2001), relações energéticas entre indivíduos (e.g. mãe e filhote) (Grahl-Nielsen et al. 1993) e as reservas de alimento e, mais recentemente, a

identificação de populações e ecótipos utilizando a composição de ácidos graxos (Olsen e Grahl-Nielsen 2003, Herman et al. 2005).

Dados a respeito da fisiologia de mamíferos marinhos são na grande maioria referentes à pinípedes (focas, lobos, leões e elefantes marinhos) devido à facilidade em observar, capturar, e manter em cativeiro estas espécies. Informações básicas sobre os animais, principalmente com relação à cetáceos, são cruciais para a realização de experimentos em fisiologia, mas ainda são escassas na literatura. Por exemplo, dados sobre a temperatura corporal, quantidade de tecido necessária para realizar determinado experimento, ou as diluições necessárias para adaptar as técnicas inicialmente desenvolvidas para animais de laboratório, são praticamente inexistentes. Apesar do crescente número, são ainda escassos os trabalhos realizados sobre fisiologia de cetáceos para o Atlântico Sul ocidental. No Brasil a totalidade dos estudos são baseados em animais mortos por captura acidental. A principal espécie estudada é a franciscana (*P. blainvillei*) pela facilidade de acesso aos animais capturados acidentalmente pela pesca comercial ao longo de sua distribuição (Secchi et al. 2001).

Demonte e Pilleri (1971, 1977) descrevem a mobilidade relativa da hemoglobina e frações de plasma na família Platanistidae (botos de rio). Diversos dados, como peso da camada de gordura, parâmetros vitais, parasitas, distribuição, taxas de mortalidade acidental e reprodução são descritos por Kamia e Yamasaki (1974) e Brownell (1989) para franciscanas do Uruguai.

A composição do leite do boto rosa (*Inia geoffrensis*) e da franciscana (*P. blainvillei*) foram apresentados por Rosas e Lethi (1996) e Caon et al. (2007), respectivamente, descrevendo a sua composição e a concentração de minerais e metais pesados. O estudo apresentado por Caon et al. (2007a) é o primeiro a sugerir uma variação na composição de



gordura e proteínas ao longo da lactação para odontocetáceos, até então só descrito para mysticetáceos e pinípedes.

Rocha et al. (2000) utilizou a camada de gordura como um indicador do estágio reprodutivo de franciscanas capturadas no litoral de São Paulo quantificando a concentração dos hormônios esteróides contidos neste tecido em comparação a outros métodos tradicionais como a análise das gônadas e morfometria (Kasuya e Brownell 1979, Danilewicz 2003; 2004).

Dados sobre a condição corporal e a utilização das reservas lipídicas através do peso e espessura da camada de gordura comparada a parâmetros morfométricos, como o comprimento total, o peso total e o estágio reprodutivo em franciscanas do Rio Grande do Sul foram apresentados por Caon (1998) e Caon et al. (2007b). Um trabalho muito semelhante foi apresentado por Araújo (2005) para franciscanas capturadas acidentalmente em Rio Grande, Rio Grande do Sul. Caon (2003) descreve as concentrações de lipídios totais, triglicerídios, colesterol e a identificação dos ácidos graxos da camada de gordura em diferentes regiões do corpo do animal, demonstrando diferentes funções desta camada para a manutenção de temperatura e o estoque energético para o indivíduo.

O coeficiente de condição corporal (Kn) (LeCren 1951) também foi estimado para as franciscanas da Argentina (Rodríguez et al. 2002) e do Rio Grande do Sul (Caon 1998). O Kn é utilizado com o intuito de fornecer informações sobre as reservas energéticas dos indivíduos no ambiente em que vivem. Por conseguinte, o fator de condição apresenta oscilações durante o ano os quais podem refletir principalmente a época e duração do período reprodutivo e a taxa de alimentação.

As metodologias utilizadas para verificar o metabolismo de lipídios, em especial o de ácidos graxos, permitem o desenvolvimento de estudos relacionados diretamente com a conservação e planos de manejo nestes animais (Olsen e Grahl-Nielsen 2003, Herman et al.

2005). Assim, técnicas utilizadas tradicionalmente na fisiologia podem auxiliar na obtenção de dados importantes para a preservação destas espécies.

O principal objetivo desta tese foi utilizar dados sobre o metabolismo de lipídios na identificação de populações e dos principais itens alimentares da dieta em cetáceos, além da ação de vias metabólicas no controle da utilização das reservas lipídicas. Para isto, a franciscana (*P. blainvillei*), o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*), a baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) e a baleia franca (*Eubalaena australis*) foram estudados, contribuindo para estabelecer novas metodologias e fornecer dados para futuros trabalhos sobre este assunto.

## Estrutura da tese

Devido aos diferentes temas aqui abordados, esta tese foi organizada de maneira a incluir em cada capítulo os experimentos realizados sobre cada assunto, sendo assim estruturada:

- Dados iniciais e gerais sobre a tese. Folha de rosto, agradecimentos, índice, lista de abreviaturas, lista de tabelas e lista de figuras.
- Prefácio. Introdução geral sobre a importância dos estudos em fisiologia, descrição dos trabalhos já realizados em mamíferos marinhos no Atlântico Sul Ocidental e descrição da estrutura da tese.

- Capítulo 1. Utilização dos ácidos graxos da camada de gordura como marcadores populacionais.
- Capítulo 2. Utilização dos ácidos graxos da camada de gordura na identificação da dieta em cetáceos.
- Capítulo 3. Gliceroneogênese em cetáceos.
- Anexos Panilhas e materiais acessórios aos estudos aqui apresentados e o artigo submetido para publicação.
- Referências bibliográficas.



## Capítulo 1. Utilização dos ácidos graxos da camada de gordura como marcadores populacionais

### 1.1. Problemas de conservação em cetáceos

A exploração excessiva dos estoques de baleias durante os períodos de caça comercial, assim como a captura acidental de pequenos cetáceos em redes de pesca, ocasionou a quase extinção de algumas espécies e incluiu outras no status de *vulnerável*, *ameaçado* ou *criticamente ameaçado* em listas de espécies ameaçadas de todo o mundo (IBAMA 2003, IUCN 2006). Cetáceos são reconhecidamente importantes tanto nas cadeias tróficas como recurso natural e diversas ações são atualmente realizadas a fim de conhecer estas populações e assim realizar planos de conservação para estas espécies. Aqui serão descritos brevemente alguns dos principais problemas de conservação relativos aos cetáceos, a importância das ações conservacionistas para a preservação destas espécies e algumas metodologias utilizadas para auxiliar nestas ações.

### 1.1.1. Caça

Os primeiros registros da caça de mamíferos marinhos são muito antigos e geralmente relacionados com a subsistência de povos litorâneos. A caça aos cetáceos é conhecida desde 8.500 anos atrás, através de ossos pré-históricos de baleias e pequenos cetáceos encontrados em depósitos de restos de grupos primitivos (Beland 1996). Os primeiros a realizarem a pesca comercial foram os bascos no século XII sobre baleias francas do norte (*Eubalaena glacialis*) e os japoneses no século XVI, que caçavam as baleias cinzentas (*Eschrichtius robustus*) próximas da costa (Omura 1984). Devido à tecnologia rudimentar e aos poucos exemplares capturados em cada estação por estas práticas mais artesanais, o número de animais abatidos destas populações de baleias não foi impactado significativamente.

A revolução industrial e o desenvolvimento de novas técnicas de produção de equipamentos e embarcações relativos à caça teve em 1860 o fator determinante para o aumento do número de animais capturados com a invenção do canhão arpão e da ponta explosiva aliados ao desenvolvimento de navios mais rápidos e com uma maior autonomia em alto mar. Estas novas tecnologias permitiram que mais animais fossem capturados de uma única vez, bem como a captura de baleias maiores e mais rápidas, como a baleia fin (*Balaenoptera physalus*) e a baleia azul (*B. musculus*), até então livres da caça. Em 1904 a primeira estação baleeira na Antártica foi montada nas ilhas Geórgia do Sul, sendo capturadas 195 baleias neste ano. Porém em 1913, com o aumento no número de embarcações, 10.760 baleias já haviam sido capturadas (Donovan 1995).

Assim, ao longo do século 20, várias espécies começaram a ter seus estoques diminuídos drasticamente, principalmente baleias maiores, como a baleia azul, e as baleias francas e cinzenta. Essa pressão de caça culminou na criação em 1946 da *International Convention for the Regulation of Whaling*, que resultaria em 1948 na criação da *International*

*Whaling Commission* (IWC) com o objetivo de regular e coordenar a indústria baleeira de maneira a não esgotar totalmente estes estoques. A IWC voltou suas ações para a proteção das espécies mais impactadas, culminando décadas depois na moratória mundial à caça de baleias em 1986 (Hofman 1995).

Países como o Japão, Noruega e Islândia continuam realizando atualmente a caça de baleias justificando esta captura como ‘cotas científicas’ e promovendo campanhas a favor da liberação da caça às baleias junto à IWC. O fato é que com a pressão de caça durante este período algumas espécies tiveram seus números significativamente reduzidos, como a baleia franca do norte (*E. glacialis*) que não conseguiu recuperar seus números originais, além da baleia cinzenta do Atlântico, que foi extinta. Outras espécies, como a baleia franca do sul (*E. australis*) e a baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*), aos poucos começam a reocupar as áreas originais de ocorrência através do aumento do número de indivíduos reavistados anualmente (Zerbini et al. 2004, Groch et al. 2005), porém ainda estão incluídas nas listas de espécies ameaçadas como *vulneráveis* (IBAMA 2003, IUCN 2006).

#### 1.1.2. Captura acidental

Um dos maiores problemas mundiais na conservação de pequenos cetáceos são as capturas acidentais por redes de pesca. Onde a presença destes animais e a de redes de pesca de emalhe coexistem, ocorre a captura acidental. Como agravante deste problema, a exploração dos recursos marinhos durante um grande período de tempo culminou com a diminuição de todos os estoques de peixes comerciais no mundo. Assim, para atingir as mesmas cotas de pescado que eram obtidas anteriormente, foi necessário um aumento no comprimento das redes e conseqüente área de captura. Por causas ainda não esclarecidas estas

redes não são percebidas pelos golfinhos que terminam se emalhando e, sem conseguir subir à tona para respirar, morrem afogados (Secchi et al. 2003).

A informação a respeito destas capturas indicam que grande parte dos estoques não resistiriam às taxas de captura a que estão submetidas, uma vez que a taxa de reprodução em cetáceos é baixa. Perrin et al. (1994) estimaram anualmente a mortalidade de animais como a vaquita (*Phocoena sinus*) no Golfo da Califórnia (30-40 animais/ano), o Baiji (*Lipotes vexilifer*) no Rio Yangtze, o humpback dolphin do Indo-Pacífico (*Souza plumbea*) (7-8 animais/ano), os golfinhos nariz de garrafa (*T. truncatus*) da costa sul da África do Sul (30-40 animais/ano), os golfinhos listrados (*Stenella coeruleoalba*) do Mar Mediterrâneo (5000-10000 animais/ano) e os harbour porpoises (*P. phocoena*) no oeste do Atlântico norte (5000-8600 animais/ano). As comunidades pesqueiras, no momento da captura, ainda podem descartar os animais no mar, tornando impossível saber o número preciso de animais mortos por emalhe.

No Brasil, a franciscana, devido à sua distribuição estritamente costeira, sofre com a captura acidental em todas as principais comunidades pesqueiras ao longo de sua distribuição (Praderi et al. 1989, Secchi et al. 1997, Pinedo e Polacheck 1999, Secchi et al. 2003). Estimativas de abundância utilizando observações aéreas entre os 32°08'S até 32°25' realizada por Secchi et al. (2001) concluíram que a população de franciscanas é de 0,657 indivíduos/km<sup>2</sup> nos 435 km<sup>2</sup> da área estudada, o que significa dizer que nesta área existem aproximadamente 286 franciscanas. Estes dados sugerem que a população pode não suportar os atuais níveis de pressão pela captura tornando urgente a formulação de metas e planos de ação para espécie, como as apresentadas pelo IV Workshop para a pesquisa coordenada e conservação da franciscana, *P. blainvillei* (Secchi et al. 2001).

### 1.1.3. Outros problemas de conservação

Além da caça comercial e a captura acidental, outros problemas são igualmente preocupantes para a conservação de mamíferos marinhos. Fatores como a contaminação por organoclorados como os bifenilos policlorados (PCBs) e dioxinas como o TCDD (Kannan 1997), metais pesados, dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (De Guise et al. 1995, Beland 1996) e a degradação de habitat afetam diretamente os animais alterando seu desenvolvimento e diminuindo suas taxas de reprodução.

Leaper et al. (2006) demonstram o efeito do aquecimento global sobre a dinâmica populacional de cetáceos. Existem fortes indícios de que o aquecimento global interfere diretamente na temperatura da superfície do mar através de anomalias do fenômeno El Niño, influenciando a produção de krill na região das Ilhas Geórgias do Sul. Este fato parece interferir diretamente na dinâmica populacional de baleias francas (*E. australis*) através da redução do número de nascimentos de filhotes pela diminuição da disponibilidade de alimento (Leaper et al. 2006).

## 1.2. Planos de ação e manejo

Como alternativa para a diminuição dos problemas de conservação das espécies de cetáceos, como a captura acidental de pequenos cetáceos e manutenção dos estoques atuais das grandes baleias, medidas conservacionistas tiveram que ser adotadas para viabilizar a manutenção dessas espécies. Para a realização de um plano de conservação ou manejo de espécies são necessários vários dados a respeito da espécie alvo, sendo um dos mais importantes avaliar o seu status populacional, assim como o status de conservação da espécie,



tamanho populacional, distribuição geográfica, ecologia, fatores limitantes, e as ameaças que afetam o número da população (Sutherland 2000). Uma sugestão sobre como organizar um plano de manejo e as principais etapas para que este seja efetivo na preservação das espécies foi proposto por Sutherland (2000) (figura 1).

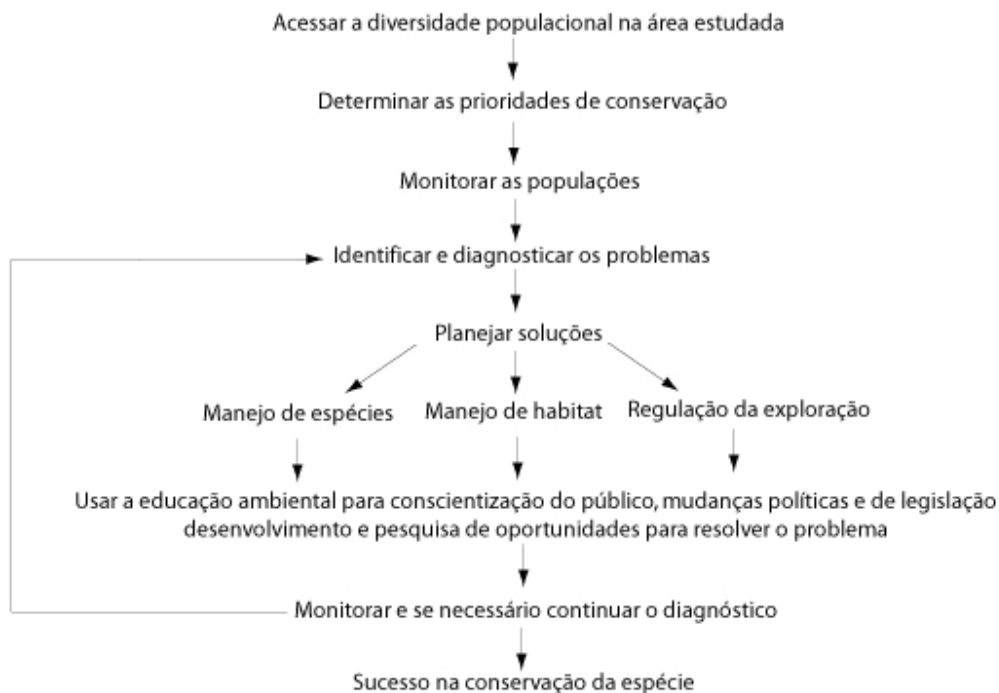


Figura 1: Sugestão de organização do trabalho de criação de ações de manejo e conservação, adaptado de Sutherland (2000).

Assim, estudos de estimativa de abundância, foto-identificação, caracterização genética, entre outros são atualmente realizados em mamíferos marinhos com o objetivo de obter informações sobre as populações das espécies estudadas (Secchi et al. 2001, Caon e Ott 2000, 2001, Groch 2005, Dalla-Rosa et al. 2001, Zerbini et al. 2004). A seguir, algumas destas técnicas de identificação de estoques populacionais serão rapidamente discutidas.

## 1.2.1. Técnicas para identificação de estoques populacionais

### 1.2.1.1. Biologia molecular

As técnicas moleculares são utilizadas em conservação para a identificação de unidades como espécies, raças, populações, famílias ou indivíduos, de acordo com o objetivo do estudo. Existem seqüências de DNA que são alteradas rapidamente, como microsátélites e minisátélites, apresentando grande variabilidade entre os indivíduos. Outras seqüências possuem uma alteração mais lenta, sendo importantes ferramentas para a identificação de populações e espécies (Avice 1994, Smith e Wayne 1996).

As frações de DNA que não são sujeitas à troca de genes durante o pareamento na meiose são preferivelmente utilizadas para a identificação de populações. O DNA mitocondrial (DNAMt), por exemplo, é transmitido inteiramente da mãe para os descendentes. Como apenas a mãe transmite a informação contida na mitocôndria a população efetiva é menor aumentando a taxa com que as mutações se tornam extintas ou fixadas em uma população, simplificando a comparação com outras populações. O DNAMt evolui de 5 a 10 vezes mais rápido que o DNA nuclear, e assim os polimorfismos são melhor detectáveis que em proteínas ou DNA genômico (Brown et al. 1979). O DNA mitocondrial permite entender vários aspectos da estrutura e dinâmica das populações, o seu padrão de relação, ou seja, o quanto divergiram e quão próximos são estas populações. As taxas de migração entre populações ou suas subdivisões, bem como a identificação do tamanho da população efetiva através da medição da diversidade genética também são possíveis utilizando esta metodologia, porém a utilização mais importante é sem dúvida a determinação da identidade de espécies e a estrutura dos estoques populacionais em várias espécies ameaçadas de extinção.

Por exemplo, seções variáveis do DNAMt podem ser amplificadas por PCR e utilizadas para identificar o consumo de carne ilegal de espécies de cetáceos protegidas em restaurantes

japoneses como as baleias jubartes, *Megaptera novaeangliae* (Baker e Palumbi 1994). O tamanho da população efetiva da baleia minke, *Balaenoptera acutorostrata*, em 400.000 animais foi estimado por Hoelzel e Dover (1991) baseado na variação do DNAmT em três populações. Rosel et al. (1995) sugerem que os baixos níveis de divergência entre as seqüências das populações de baleia jubarte analisadas por Baker et al. (1990) e orcas, *Orcinus orca* (Hoelzel e Dover 1991), são consequência da grande mobilidade destas espécies, resultando em altos níveis de fluxo gênico entre populações.

A estrutura genética das populações da franciscana (*P. blainvillei*) foi analisada por Secchi et al. (1998), Ramos et al. (2000) e Lázaro et al. (2004), através de 94 seqüências da região controle do DNAmT de animais coletados no Rio de Janeiro (n= 10), Rio Grande do Sul (n= 15), Rio da Prata, no Uruguai (n= 38) e em Claramecó, Argentina (n= 31). Os animais do Rio de Janeiro não apresentaram haplótipos compartilhados com os outros animais. Assim, como o nível de fluxo gênico é maior entre populações mais próximas, os dados sugerem que as populações mais ao sul tenham se originado no Rio de Janeiro ocorrendo uma expansão da distribuição da espécie até a Argentina (Lázaro et al. 2004).

Além das análises de DNAmT, outras análises moleculares podem ser realizadas para fins de conservação, assim como as análises de sítios de restrição (RFLP), DNA *fingerprinting* e a análise de microsátélites. Dizon et al. (1991) comparou o DNAmT RFLP, resultado da análise dos sítios de restrição, de diferentes populações de golfinhos-rotatores (*Stenella longirostris*) demonstrando o alto grau de variação entre as populações estudadas. Estudos sobre paternidade em um grupo de 34 pares mãe-filhote de baleias piloto (*Globicephala melas*) capturadas nas ilhas Faroe foram realizadas por Amos et al. (1991) através de DNA *fingerprinting*. Microsátélites são geralmente usados para a identificação inequívoca de cada indivíduo, como uma alternativa aos métodos tradicionais devido ao *loci* ser permanente e

estar presente em todos os animais (Palsbøll et al. 1997, Clapham e Palsbøll 1997). Assim, para se obter dados a respeito dos movimentos locais e migratórios das baleias jubarte, esta marcação genética permitiu a primeira estimativa de abundância baseada em técnicas moleculares (Palsbøll et al. 1997).

#### 1.2.1.2. Fotoidentificação

A fotoidentificação é o reconhecimento individual através do registro fotográfico das marcas naturais, pigmentação, calosidades ou qualquer outro fator que altere o formato ou coloração originalmente apresentadas pelo animal ao longo da sua vida. Esta técnica de marcação-recaptura permite que dados a respeito da história de vida e informações populacionais sejam obtidas (Hammond et al. 1990). Geralmente é baseada na fotografia de alguma região específica do corpo, como a nadadeira dorsal, nadadeira caudal, cabeça ou outros. Estas imagens podem ser catalogadas, servindo de base de dados para o acompanhamento dos indivíduos em áreas preferenciais de alimentação, rotas migratórias ou a genealogia de grupos específicos (Würsig e Würsig 1977).

No Brasil, um grupo de golfinhos nariz de garrafa (*Tursiops truncatus*) presente no arquipélago de São Pedro e São Paulo (00°55'N, 029°20'W) vem sendo fotoidentificado sistematicamente desde 1999, permitindo o monitoramento deste que é o único grupo residente oceânico da espécie conhecido no Atlântico sul (Caon e Ott 2001, 2002). Estes trabalhos demonstraram que este grupo formado por 33 animais são residentes, habitando as águas próximas à ilha as quais utilizam para se alimentar. Através deste trabalho já foram identificadas 5 fêmeas acompanhadas de seus filhotes, características de coloração e informações a respeito de tamanhos de grupo, além da reavistagem de um indivíduo (ASP#01) nas cinco expedições realizadas desde 1999 até 2005.

Baleias jubartes são fotoidentificadas na Antártica desde 1994 através do Projeto 'Caracterização dos estoques de baleia jubarte, *Megaptera novaeangliae* (Borowski 1781), e estimativas de abundância relativa de cetáceos nos oceanos Atlântico sul ocidental e Antártico', vinculado ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). A fotoidentificação nesta espécie é realizada através do registro em fotogramas dos padrões das manchas presentes na região ventral da nadadeira caudal. Estas manchas, assim como o recorte da borda nestas nadadeiras, permite o reconhecimento individual de cada animal. Entre 1997 e 2000, 154 indivíduos foram fotoidentificados e catalogados na Península Antártica, incluindo Estreito de Gerlache, Ilha Rei George e Estreito de Bismarck (Dalla-Rosa et al. 2001). Estes dados permitiram a reavistagem interanual de dois animais para a região, demonstrando assim que a espécie possui algum grau de fidelidade às áreas de alimentação. Este catálogo permite ainda a comparação com outros catálogos de fotoidentificação realizadas por diferentes grupos de pesquisa ao longo de áreas de ocorrência da espécie, auxiliando a identificação das suas rotas migratórias.

#### 1.2.1.3. Morfometria

Mamíferos marinhos podem apresentar diferenças morfométricas entre diferentes populações. De uma maneira geral, a morfometria craniana de animais adultos podem ser comparadas através de diversas medidas específicas, como o comprimento condilo-basal, comprimento do rosto, entre outros. Além disso, dados sobre o comprimento total dos animais associado à informações como estimativa de idade e análise de gônadas também podem e devem ser utilizadas com as medidas de crânio.

Baseada na morfometria da franciscana, por exemplo, Pinedo (1991) propôs ao menos duas populações distintas, uma distribuída desde o Espírito Santo até Santa Catarina, de menor

tamanho, e outra desde o sul de Santa Catarina até a Argentina, de maior tamanho. Este resultado foi corroborado pelas análises de DNAmt realizadas por Secchi et al. (1998), Ramos et al. (2000) e Lázaro et al. (2004). Ramos et al. (2002), através da morfometria do crânio de franciscanas, compararam as populações dos animais capturados acidentalmente ao norte da distribuição da espécie, mais especificamente no Espírito Santo de Itaúnas a Regência (18°30'S e 19°40'S), no norte do Rio de Janeiro de Atafona a Macaé (21°35'S a 22°25'S) e em São Paulo desde Ubatuba até Cananéia (23°30'S e 25°30'S). Este trabalho resultou na distinção dos animais nas três áreas estudadas através de análise multivariada.

Esta variação presente nas franciscanas estudadas por Ramos et al. (2002) sugere que os hiatos da distribuição para esta região são a consequência da falta de drenagem fluvial, que aumentaria a abundância de recursos tróficos, e a grande profundidade próxima a costa pela pequena extensão da plataforma continental nesta região (Siciliano et al. 2001), induzindo ao isolamento destas populações.

#### 1.2.1.4. Assinaturas de ácidos graxos

Reservas energéticas na forma de gordura são requeridas por cetáceos não somente para manutenção do metabolismo basal, mas também como estoque energético para a reprodução, conservação da temperatura interna, ajuste da flutuação e amamentação (Ryg et al. 1988). Segundo Lockyer (1987), estas reservas podem variar anualmente dependendo das condições do ambiente e suprimento alimentar. Em mamíferos, a condição corporal é comumente considerada uma medida geral das reservas energéticas de um indivíduo (Hanks 1981). Em cetáceos, a maior parte destas reservas está armazenada na camada de gordura (Yasui e Gaskin 1986), sendo este o mais importante local de estoque de energia nestes animais (Pond 1978).

A camada de gordura possui funções extremamente importantes para a adaptação e sobrevivência no meio marinho. Informações sobre as reservas energéticas permitem entender a relação entre o animal e o ambiente em que ele vive. Os padrões de aquisição de energia podem ainda indicar as estratégias desenvolvidas pelas espécies de mamíferos marinhos para sobreviver e reproduzir, além de compreender sua utilização na manutenção das funções corporais e do crescimento (LeCren 1951). A medição desta camada é uma ferramenta importante para uma análise comparativa de como machos e fêmeas, em seus estágios de maturidade sexual, estocam as reservas energéticas durante os diferentes meses do ano (Caon 1998, 2003).

Trabalhos referentes à topografia da camada de gordura, condição corporal e composição lipídica desta camada em cetáceos vem se concentrando sobre espécies capturadas durante os períodos de caça comercial (*e.g.* baleia fin [*Balaenoptera physalus*], baleia sei [*B. borealis*], baleia jubarte [*Megaptera novaeangliae*]) (Ackman et al. 1975, Lockyer 1987, Aguilar e Borrel 1990) e captura acidental, principalmente de pequenos cetáceos como a vaquita, *Phocoena phocoena* (Read 1990, Lockyer 1995, Kastelein et al. 1997, Koopman 1998) e a franciscana, *P. blainvillei* (Caon 1998, 2003 e 2007).

Com o objetivo de utilizar as reservas lipídicas como marcador populacional, Grahl-Nielsen e Barnung (1985) desenvolveram no Departamento de Química da Universidade de Bergen um método de classificação baseado na composição dos ácidos graxos presentes em amostras de animais marinhos. Este método consiste na metilação das amostras, identificação dos ácidos graxos em cromatografia e utilização de tratamento estatístico multivariado (PCA, CCA, cluster). Este método já foi utilizado para algumas espécies de peixes marinhos (Grahl-Nielsen e Mjaavatten 1992, Ulvund e Grahl-Nielsen 1988, Grahl-Nielsen e Ulvund 1990), fungos marinhos (Cooney et al. 1993) e focas como a *harp seal* (*Phoca groenlandica*) (Grahl-

Nielsen et al. 1993), sendo incluído na lista de metodologias de identificação de estoques da *International Council for the Exploitation of the Sea* (ICES) (Grahl-Nielsen 1997).

Os ácidos graxos e o glicerol 3-fosfato são incorporados através da ingestão de alimentos, sendo responsáveis pela formação de triglicerídios no tecido adiposo. Estes ácidos são ácidos carboxílicos que possuem cadeias de hidrocarbonetos e podem ser classificados como saturados (sem ligações duplas) ou insaturados (com ligações duplas) ou ácidos graxos de cadeia curta (menos de 8 carbonos), média, (de 8 a 16) e longa (mais de 16 carbonos).

Estes ácidos estão divididos em três famílias. A primeira inclui aqueles ácidos graxos biosintetizados por mamíferos através de outros precursores, como ácido palmítico (16:0) e o esteárico (18:0) e os isômeros dos ácidos palmitoleico (16:1) e oleico (18:0). Os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), incluindo os da família omega-3 e omega-6 (18:2n-6, 18:3n-3, 18:3n-6, 20:3n-3, 20:3n-6, 20:5n-3 e 22:6n-3), e os monoenóicos 20:1n-9 e 22:1n-11 compõem uma segunda família cujos ácidos graxos não são interconvertíveis em mamíferos, pois a enzima que converte o ácido linoleico em  $\alpha$ -linoleico está presente apenas em plantas (Ganong 2003). Os ácidos omega-3 e omega-6 são denominados ‘essenciais’ em razão do organismo ser incapaz de sintetizá-los, sendo exclusivamente providos pela dieta. Estes PUFAs são geralmente de origem vegetal, mas podem estar presentes nas reservas lipídicas ao longo da cadeia trófica (Käkelä et al. 1995). Após a ingestão, os ácidos graxos essenciais podem sofrer uma série de reações para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa. Neste processo estão envolvidas enzimas de alongação, que introduzem dois átomos de carbono nos ácidos graxos, e a desaturação, que se caracteriza pela inclusão de uma ligação dupla na cadeia de carbono (figura 2). Ácidos graxos como o 14:0 e 20:1 podem ainda denotar uma origem alimentar (Iverson 1993).



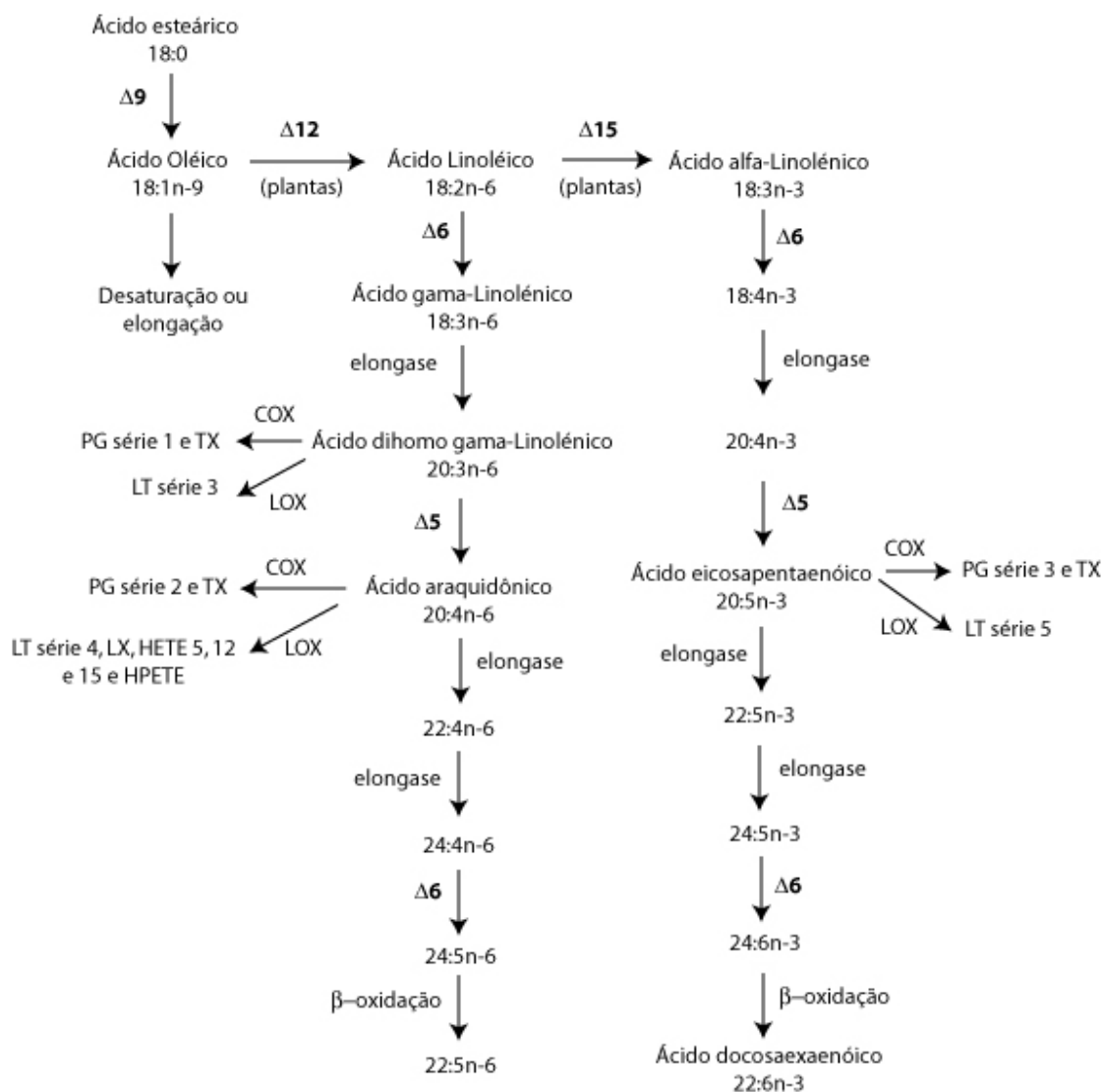


Figura 2. Metabolismo dos ácidos graxos polinsaturados. Enzimas desaturases delta 5, 6, 12 e 15; COX: enzima ciclooxigenase; LOX: enzima lipogenase; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; TX: tromboxanos; LX: lipoxinas; HETE: ácidos hidroxieicosatetraenóicos; HPETE: ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóicos. (adaptado de Aikawa 2004).

O ácido linoléico (18:2n-6) é o principal precursor do ácido araquidônico (AA 20:4n-6), enquanto o ácido  $\alpha$ -linolênico é o precursor do ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3).

AA e EPA são ácidos graxos com 20 átomos de carbono que formam os fosfolipídios das membranas biológicas. O ácido  $\alpha$ -linolénico também é o precursor do ácido docosahexaenóico (DHA 22:6n-3). Os ácidos linoléico e  $\alpha$ -linolénico são substratos das mesmas desaturases, de forma que as n-3 e n-6 competem pelas mesmas enzimas nas vias metabólicas. O AA e EPA são precursores de eicosanóides, que são moduladores químicos em diversos processos biológicos, como na resposta inflamatória, agregação plaquetária, permeabilidade vascular e na formação de interleucinas. Os eucosanóides compreendem as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas, ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE) e hidroxieicosatetraenóicos (HETE).

Os organismos marinhos possuem uma grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) adquiridos através de microorganismos planctônicos e algas marinhas que compõem sua dieta. A camada de gordura de cetáceos possui uma grande variedade de ácidos graxos uma vez que sua dieta é baseada em alimentos provenientes desta cadeia alimentar marinha (Ackman e Eaton 1966, Ackman 1980). A composição de ácidos graxos presentes nesta camada permitem a observação de “assinaturas de ácidos graxos”, formando padrões característicos para cada espécie, população ou ecótipo (Grahl-Nielsen 2000, Herman et al. 2005).

Apesar do padrão da composição de ácidos graxos na camada de gordura depender diretamente da alimentação, a facilidade de metabolização de um ou outro ácido graxo é efetuada por características genéticas. Em outras palavras, dois animais de diferentes populações que se alimentam em uma mesma área e do mesmo alimento teoricamente terão composições de ácidos graxos diferenciados na camada de gordura (Grahl-Nielsen 1999).

Esta abordagem demonstrou-se eficiente para a identificação dos estoques definidos pela *International Whaling Commission* (IWC) para a baleia minke (*Balaenoptera*

*acutorostrata*) no Mar do Norte e Mar da Noruega, com a vantagem dos baixos custos e da rapidez na obtenção e análise dos resultados através desta técnica em comparação às outras empregadas para a identificação de estoques (Olsen e Grahl-Nielsen 2003).

Trabalhos sobre a composição de ácidos graxos e variações populacionais são relativamente novos para cetáceos. Porém, Olsen e Grahl-Nielsen (2003) não relacionam diretamente as diferenças desta composição com as características genéticas. A maioria das espécies de baleias migratórias possuem fidelidade às áreas de reprodução e alimentação (Bastida et al. 2007). Estas áreas estão localizadas em diferentes regiões que podem possuir diferentes regimes de correntes e de produção primária, fazendo com que a composição de ácidos graxos seja explicada simplesmente por este fato. Assim, para testar esta metodologia, utilizamos como objeto de estudo a franciscana (*P. blainvillei*) que é uma espécie não migratória e seus estoques populacionais foram descritos utilizando metodologias moleculares (Secchi 1998, Lázaro et al. 2004) e morfométricas (Pinedo 1991) permitindo uma abordagem mais completa sobre os dados aqui apresentados. A composição dos ácidos graxos da camada de gordura da baleia jubarte (*M. novaeangliae*) também foi analisada, comparando as áreas de alimentação (Península Antártica) e áreas de reprodução (litoral brasileiro). Assim, será possível verificar se os animais presentes na região de estudo na Antártica são os mesmos presentes no litoral brasileiro nos meses de inverno, trazendo mais dados a respeito de rotas migratórias da espécie.

### 1.3. Experimento 1: Avaliação da composição dos ácidos graxos da camada de gordura da franciscana (*Pontoporia blainvillei*) na costa brasileira como parâmetro para identificação de estoques populacionais.

**Glauco Caon**

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC),  
Departamento de Fisiologia, ICBS/UFRGS, Porto Alegre, RS.

**Fernando C. W. Rosas**

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

**Ana Paula M. Di Beditto**

Universidade Estadual do Norte Fluminense, Laboratório de Ciências Ambientais, CBB, Campos dos Goytacazes, RJ.

**Shirley Pacheco de Souza**

Programa de Pós-Graduação em Ecologia, IB, UNICAMP, Campinas, SP &  
Projeto SOS Mamíferos Marinhos, Instituto Terra & Mar, São Sebastião, SP,  
Brasil

**Luiz C. Kucharski**

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC),  
Departamento de Fisiologia, ICBS/UFRGS, Porto Alegre, RS.

### 1.3.1. Resumo

A franciscana (*P. blainvillei*) possui três estoques definidos por biologia molecular e morfometria, sendo uma distribuída do ES ao RJ, outra incluindo os animais de SP, PR e SC, e uma terceira desde o RS até a Argentina. Esta metodologia, que envolve a extração dos lipídios, metilação e quantificação dos ácidos graxos, e aplicação de análise estatística multivariada foi utilizada para as populações conhecidas de franciscanas ao longo da distribuição no Brasil. A camada de gordura de 24 animais provenientes do Rio Grande do Sul (n= 5), Paraná (n= 8), São Paulo (n= 6) e Rio de Janeiro (n= 5) foi analisada. Os ácidos graxos foram quantificados através de cromatografia gasosa e comparados por teste-t, ANOVA de uma via e dendograma. Foram identificados 19 ácidos graxos encontrados na camada de gordura da franciscana: 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 15:1, 16:0, 16:1, 16:1n7, 16:2n4, 16:3n4, 17:0, 17:1, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, 18:1n3, 20:5n3, 22:6n3 e 24:0. Apenas o ácido 16:0 apresentou diferença significativa entre os animais do RJ e RS. Porém, analisando a composição de ácidos graxos através de dendograma realizado com o padrão Fame Mix®, foi observada diferença da composição entre os animais do Rio Grande do Sul em comparação com os animais do PR, SP e RJ. A diferença desta composição é provavelmente resultado da alimentação e não às características genóticas como sugerido por trabalhos realizados anteriormente para a baleia minke, como demonstrado pelo dendograma realizado com os itens alimentares da espécie para o Brasil. Esta metodologia, apesar de ser uma ferramenta para estudos de ecologia alimentar da franciscana, não parece ser indicada para a identificação de estoques da espécie.

Palavras-chave: Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, ácidos graxos, estoques populacionais, Brasil.

## 1.3.2. Introdução

### 1.3.2.1. Distribuição geográfica e características gerais

A franciscana ou toninha (figura 3), *Pontoporia blainvillei* (Gervais e D'Obigny 1844), é uma espécie endêmica do Oceano Atlântico Sul Ocidental, sendo registrada no Brasil, Uruguai e Argentina. Sua distribuição se estende de Itaúnas (18°25'S), no Espírito Santo (Siciliano 1994), até o Golfo Nuevo (42°35'S), na Patagônia Argentina (Crespo et al. 1998) (figura 2.2.).



Figura 3. Exemplar de franciscana (*Pontoporia blainvillei*) capturado acidentalmente no litoral norte do Rio Grande do Sul. (foto: Glauco Caon©).

Esta espécie ocorre até 25 milhas náuticas da costa e em profundidades de até 30 metros, tendo hábitos caracteristicamente costeiros (Pinedo et al. 1989, Danilewicz 2000). Esta distribuição costeira tem colocado em risco a espécie, já que existe uma forte degradação nesta região devido à poluição e tráfego de embarcações. A pesca comercial por rede de emalhe, que ocorre em toda a sua distribuição geográfica, é a principal ameaça para a franciscana (Praderi et al. 1989, Secchi et al. 1997, Ott 1998, Rosas 2000). Devido a esta mortalidade e à grande quantidade de dados obtidos através de estudos em toda a sua

distribuição, a franciscana pode ser considerada a espécie de pequeno cetáceo mais ameaçada do Atlântico Sul Ocidental.

Esta espécie atinge um comprimento máximo de 174,0 cm em fêmeas e 158,0 cm em machos. O rostro alongado com grande quantidade de dentes, a nadadeira em forma de espátula e a coloração variando do amarelo escuro ao marrom são característicos da espécie (Bastida et al. 2007).

#### 1.3.2.2. Tamanho populacional e principais problemas de conservação

A mortalidade acidental de franciscanas em operações de pesca tem sido observada por aproximadamente 60 anos. Relatos de capturas acidentais da espécie em redes de pesca de tubarões no Uruguai datam de 1940 (Van Erp 1969) e tem sido documentados e estudados desde então (Secchi et al. 2001). A partir da década de 1980 as atividades pesqueiras direcionadas a peixes de fundo tornaram-se o principal problema de conservação para a franciscana no Brasil e na Argentina. Atualmente, capturas acidentais têm sido relatadas para todas as principais comunidades pesqueiras ao longo da distribuição da espécie (*e.g.* Corcuera et al. 1994, Pinedo 1994, Praderi 1997, Secchi et al. 1997, Zanelatto 1997, Ott 1998, Rosas 2000, Di Benedetto e Ramos 2001). A população sofre uma alta probabilidade de quase-colapso, ou seja, declinar a menos de 10% do tamanho atual com os níveis atuais de mortalidade, sendo a mortalidade anual de franciscanas para todo o Rio Grande do Sul estimada entre 495 e 1.069 animais (Secchi et al. 1997, Ott 1998, Kinas e Secchi 1998, 1999, Secchi 1999). A partir de levantamentos aéreos realizados na região da desembocadura da Lagoa dos Patos, Secchi et al. (2001) estimaram uma densidade de 0,657 animais/km<sup>2</sup>, o que resultou em uma estimativa de 286 franciscanas para a área coberta pelos vôos.

Em relação ao seu *status* de conservação em listas oficiais, a franciscana foi considerada uma espécie “*Vulnerável*” durante o workshop sobre Conservação e Biologia dos Golfinhos Platanistóides (Perrin e Brownell 1989). Embora seja provavelmente a espécie de cetáceo mais estudada na América do Sul, paradoxalmente aparece listada na categoria de “*Dados Deficientes*” no Livro Vermelho da União Mundial para a Conservação da Natureza (*Red Data Book* – IUCN 2006). A franciscana encontra-se também citada na Lista Oficial das Espécies da Fauna e Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA 1989) e foi classificada como “*Vulnerável*” pelo Plano de Ação dos Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA 2002).

Atualmente são conhecidas pelo menos duas formas geográficas distintas para a espécie. Com base em diferenças morfológicas, foi identificada uma forma sul (de maior tamanho) e outra forma norte (de menor tamanho), distribuídas ao sul e ao norte do Estado de Santa Catarina, respectivamente (Pinedo 1991). Diferenças significativas na seqüência do DNA mitocondrial entre franciscanas do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro forneceram evidências genéticas diretas para existência de pelo menos duas populações desta espécie (Secchi et al. 1998), corroborando os estudos morfológicos.

Mais recentemente, Secchi et al. (2000) empregaram o método filogeográfico de separação de estoques proposto por Dizon et al. (1992) para reconhecer Áreas de Manejo para a franciscana denominadas *Franciscana Management Areas* (FMAs) (figura 4). Revisando informações sobre distribuição, resposta populacional, genótipo e fenótipo, os autores fornecem evidências para a existência de 4 populações de toninha para fins de manejo: duas habitando as águas costeiras do litoral sudeste do Brasil até Santa Catarina (FMA I e FMA II), uma terceira habitando as águas costeiras do Rio Grande do Sul e do Uruguai (FMA III), e uma quarta habitando as águas costeiras da Argentina (FMA IV).



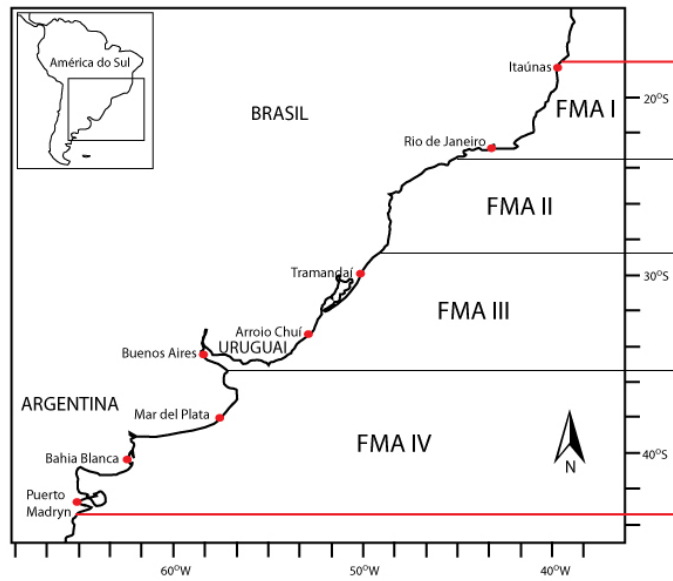


Figura 4. Distribuição e Áreas de Manejo da Franciscana (FMAs) (adaptado de Secchi et al. 2001).

### 1.3.3. Objetivo

Utilizar os ácidos graxos da camada de gordura para caracterizar os estoques populacionais da franciscana (*Pontoporia blainvillei*) ao longo da costa brasileira.

#### 2.7.1. Objetivos específicos

- Quantificar os ácidos graxos presentes na camada de gordura;
- Comparar a utilização dos ácidos graxos como marcadores populacionais com outras técnicas já empregadas para este fim.
- Relacionar dados alimentares com a quantificação dos ácidos graxos ao longo da distribuição da espécie na costa brasileira.

### 1.3.4. Método

#### 1.3.4.1. Coleta da camada de gordura

A camada de gordura de franciscanas capturadas acidentalmente em redes de pesca ao longo da costa brasileira (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul) foi coletada aproximadamente 24 horas *post mortem* durante necropsia desde a pele até a musculatura adjacente (figura 5) do lado esquerdo do corpo, lateralmente na altura da nadadeira dorsal. Para este estudo 24 animais foram coletados (tabela 1) sendo 05 do RJ, 06 de SP, 8 do PR e 05 do RS, totalizando 9 machos, 9 fêmeas e 06 não identificados. Dos animais coletados, 03 eram sexualmente maduros, 01 púbere, 08 imaturos e 12 não identificados. Todos foram coletados entre maio de 1998 e maio de 2005. A maturidade sexual dos animais foi determinada pelos pesquisadores colaboradores em seus locais de coleta através da análise das gônadas de cada animal. Após coleta, as amostras da camada de gordura foram embaladas em papel alumínio e armazenadas em freezer -20° C. Aproximadamente 100 mg de tecido adiposo foram retiradas da porção adjacente à pele e da porção mais central do tecido a fim de evitar a oxidação periférica.

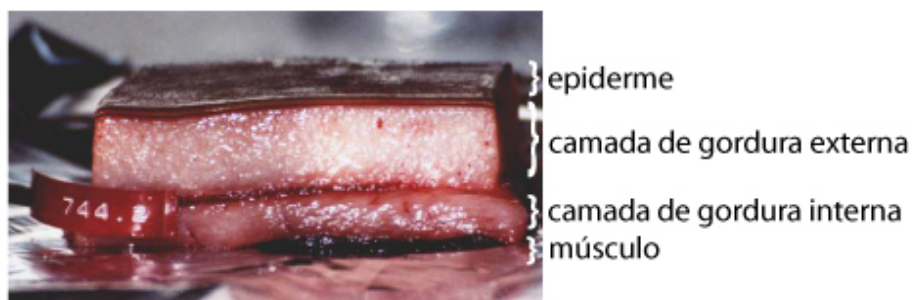


Figura 5. Exemplo de camada de gordura da franciscana demonstrando a epiderme, camada de gordura externa, camada interna e musculatura adjacente.

Tabela 1. Dados de campo sobre as franciscanas (*P. blainvillei*) analisadas no experimento 1.

Código do animal	Região	Data de coleta	Sexo	CT (cm)
RS01	Torres (RS)	15/03/04	M (n.i.)	123,0
RS02	Torres (RS)	15/03/04	F (n.i.)	126,5
RS03	Torres (RS)	29/07/04	F (imaturo)	118,0
RS04	Torres (RS)	03/05/05	M (n.i.)	122,0
RS05	Torres (RS)	04/05/05	M (imaturo)	110,5
PR 216	Paraná	26/05/98	F (imaturo)	114,0
PR 247	Paraná	12/09/98	M (maturo)	113,7
PR 255	Paraná	30/09/98	F (imatura)	97,2
PR 259	Paraná	07/10/98	M (Púbere)	112,3
PR 260	Paraná	07/10/98	F (imatura)	107,5
PR 262	Paraná	31/10/98	M (imaturo)	65,6
PR 263	Paraná	25/10/98	M (imaturo)	107,0
PR 264	Paraná	28/10/98	M (imaturo)	95,0
SP 02	Litoral sul de SP	n.i.	n.i.	n.i.
SP 03	Litoral sul de SP	n.i.	n.i.	n.i.
SP 04	Litoral sul de SP	n.i.	n.i.	n.i.
SP 06	Litoral sul de SP	n.i.	n.i.	n.i.
SP 07	Litoral sul de SP	n.i.	n.i.	n.i.
SP 08	Litoral sul de SP	n.i.	n.i.	n.i.
BB224-Pb109	Rio de Janeiro	Jan/01	F (neonato)	68,0
BB228-Pb111	Rio de Janeiro	Jun/01	F (maturo)	147,5
BB231-Pb112	Rio de Janeiro	Set/01	F (n.i.)	107,0
BB233-Pb113	Rio de Janeiro	Out/01	F (maturo)	135,0
BB234-Pb114	Rio de Janeiro	Out/01	M (n.i.)	107,0

M= macho; F= fêmea; CT = comprimento total; n.i.= não identificado.

#### 1.3.4.2. Extração dos lipídios totais

Os lipídios totais foram extraídos com clorofórmio-metanol (2:1) segundo Folch et al. (1957). Após a maceração do tecido adiposo em Potter com clorofórmio-metanol, o líquido restante e o tecido foram centrifugados com água destilada. Formaram-se duas fases, sendo a primeira formada pela água e metanol que foi descartada, e a segunda formada pelo clorofórmio e o lipídio. Após, foi adicionado novamente água destilada, agitado e centrifugado. A fase lipídica foi então separada da fase aquosa e o clorofórmio foi retirado através de evaporação por nitrogênio.

#### 1.3.4.3. Identificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa

Uma fração de 10 µl dos lipídios totais extraídos foram metilados utilizando trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>) e hexano. A amostra foi submetida à banho a 100° C durante 30 minutos para metilação dos ácidos graxos. Em seguida, esta amostra foi resfriada e adicionados hexano e água destilada. Formaram-se então duas fases, uma superior composta pelo hexano e os ácidos graxos metilados e uma inferior composta por água destilada e BF<sub>3</sub>. A fase inferior foi descartada e a superior foi submetida à evaporação do hexano utilizando nitrogênio, restando apenas os ácidos graxos metilados.

Para a identificação dos ácidos graxos, 1 µl do lipídio extraído foi analisado por cromatografia gás-líquida em cromatógrafo Shimadzu GC14-B com detector de FID (ionização de chama) (figura 6) e coluna capilar DB-1 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. Os ciclos foram realizados utilizando 150° C durante 4 minutos e acréscimo de 3° C por minuto até 240° C ou com temperatura inicial de 100° C por 1 minuto, com acréscimo de 20° C por minuto até atingir 140° C e depois 3° C por

minuto até 240° C. A temperatura do injetor e do detector foi de 250° C. O gás de arraste utilizado foi o hélio com pressão de 100 KPa. Os tempos de corrida foram de aproximadamente 35 minutos.

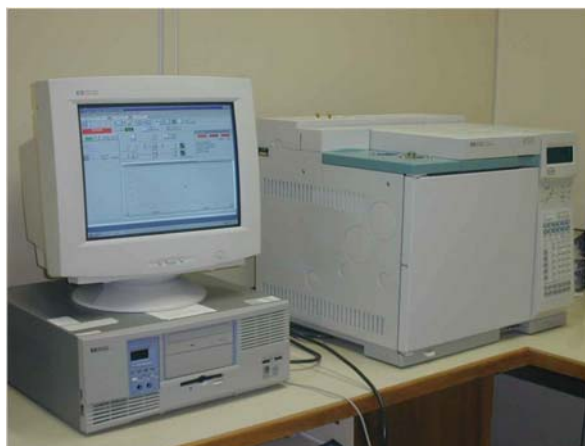


Figura 6. Cromatógrafo gasoso Shimadzu GC14-B com detector de FID.

Os padrões para ácidos graxos utilizados foram os padrões FAME MIX, PUFA-2 *Animal Source*, e PUFA-3 *Menhaden Oil* (Supelco®), compreendendo os ácidos graxos descritos na tabela 2. A quantidade de cada ácido graxo foi calculada através da área dos picos encontrados no cromatograma (figura 7) que representa a porcentagem deste ácido na amostra injetada. As amostras foram submetidas em duplicata no cromatógrafo para a confirmação que os picos não identificados realmente eram ácidos graxos. Assim, os cromatogramas foram comparados entre si e os picos com os mesmos tempos de retenção foram incluídos na análise estatística. Outros picos podem ser formados por compostos não hidrolizados e não podem ser incluídos na análise por não representarem ácidos graxos.

Tabela 2. Padrões de ácidos graxos utilizados nos experimentos 1, 2 e 3.

	FAME MIX	PUFA-2 ( <i>Animal Source</i> )	PUFA-3 ( <i>Menhaden Oil</i> )
1	C12:0	-	-
2	C13:0	-	-
3	C14:0	C14:0	C14:0
4	C14:1	-	-
5	C15:0	-	-
6	C15:1	-	-
7	-	C16:0	C16:0
8	C16:1	-	-
9	-	C16:1n7	C16:1n7
10	-	-	C16:2n4
11	-	-	C16:3n4
12	C17:0	-	-
13	C17:1	-	-
14	C18:0	C18:0	C18:0
15	C18:1n9t	-	-
16	C18:1n9c	C18:1n9	C18:1n9
17	-	C18:1n7	C18:1n7
18	-	C18:2n6	C18:2n6
19	-	-	C18:3n4
20	-	C18:3n6	-
21	-	C18:3n3	C18:3n3
22	-	-	C18:4n3
23	C20:0	-	-
24	-	C20:1n9	C20:1n9
25	-	-	C20:4n3
26	-	C20:4n6	C20:4n6
27	-	C20:5n3	C20:5n3
28	C22:0	-	-
29	-	C22:4n6	-
30	-	-	C22:5n3
31	-	C22:6n3	C22:6n3
32	C24:0	-	-

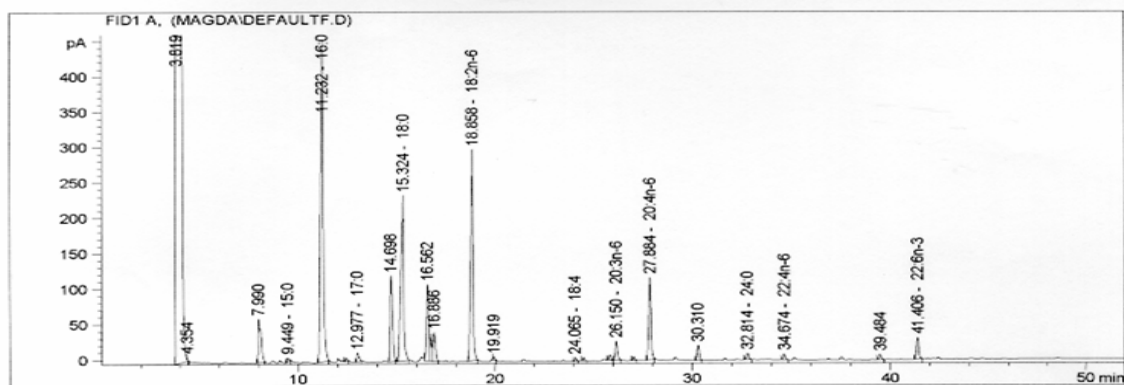


Figura 7. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa demonstrando os picos com seus respectivos tempos de retenção e ácidos graxos identificados, onde o primeiro número representa o tempo de retenção (e.g. 15.324) e o segundo o ácido graxo representado por aquele pico (e.g. 18:0, 22:4n-6).

#### 1.3.4.4. Análise estatística

Para a comparação da composição dos ácidos graxos presentes na camada de gordura entre os animais coletados em diferentes estados brasileiros foi utilizada a estatística exploratória multivariada (análise de componentes principais {PCA} e dendograma). As matrizes foram calculadas a partir das porcentagens dos ácidos graxos identificados, com os dados transformados logaritmicamente ( $\log e$ ). Os dendogramas foram realizados utilizando a variância mínima devido ao seu maior rigor na separação dos grupos. Além dos ácidos graxos identificados, foram incluídas na análise os tempos de retenção presentes em 50% ou mais das unidades amostrais de uma mesma população ou presentes em mais de uma população independente da quantidade de amostras. Desta maneira, além de diminuir a possibilidade de se incluir na análise um tempo de retenção que não seja um ácido graxo, a tendência é que os dados fiquem mais homogêneos, tornando a análise mais rigorosa. Assim, as porcentagens dos ácidos graxos identificados não somam 100%, uma vez que alguns tempos de retenção foram

incluídos na análise. O tratamento estatístico foi realizado nos programas MVSP<sup>®</sup> 8.0 e SigmaStat<sup>®</sup> 2.0 para Windows<sup>®</sup>. Para verificar diferenças entre os grupos foi utilizado teste-t de Student e ANOVA de uma via, sendo considerada diferença significativa quando  $P < 0,05$ .

As espécies de peixes, cefalópodes e crustáceos encontrados no estômago de franciscanas foram analisadas a partir de dados sobre a sua dieta já publicados e compilados por Secchi et al. (2001). Os itens alimentares foram classificados de acordo com a presença ou ausência em cada uma das quatro regiões analisadas. No Rio Grande do Sul Pinedo (1982) e Basso (1997) descrevem a dieta dos animais coletados na região sul do estado, enquanto Ott (1996) descreve o conteúdo estomacal dos animais encontrados no litoral norte. Estes trabalhos caracterizam a dieta dos animais presentes na FMA III. Oliveira et al. (1998) descreve a dieta das franciscanas acidentalmente capturadas no Paraná, enquanto Schmiegelow (1990) descreve a dieta de um animal do Paraná e outro de São Paulo, ambos realizados em animais da FMA II. Na FMA I, Di Benedetto (2000) descreve a dieta dos animais do Rio de Janeiro. A partir da matriz formada com as informações sobre presença e ausência dos itens alimentares da franciscana ao longo da distribuição no Brasil (tabela 3), foi realizado dendograma com variância mínima e distância Euclideana. O objetivo deste dendograma foi observar quais regiões são mais próximas entre si na composição dos itens alimentares permitindo assim um melhor entendimento dos resultados obtidos para os ácidos graxos, uma vez que a sua incorporação na camada de gordura depende diretamente da sua alimentação. Não foram utilizados os Índices de Importância Relativa (IIR) das presas em razão da discrepância entre os tamanhos amostrais dos estômagos analisados em cada região, que variou de 2 a 277 estômagos. Optou-se pela utilização da presença/ausência das espécies predadas pela franciscana encontradas nos estômagos pelos autores acima citados.



Tabela 3. Espécies predadas pela franciscana ao longo da costa brasileira, onde A= Pinedo (1982); B= Bassoi (1997); C= Ott (1995); D= Oliveira et al. (1998); E= Schimegelow (1990); F= Di Benedetto (2000). 'x' representa presença da espécie na dieta da franciscana para a região correspondente.

<b>FMA</b>	III	III	III	II	II	I
<b>Região</b>	Sul -RS	Sul-RS	Norte - RS	PR	PR-SP	Norte - RJ
<b>Autores</b>	A	B	C	D	E	F
<b>No. de estômagos analisados</b>	277	36	36	12	2	89
<b>Ano</b>	1982	1997	1995	1998	1990	2000
<b>Peixes</b>						
<b>Sciaenidae</b>						
<i>Cynoscion guatucupa</i>	x	x	x			
<i>Cynoscion jamaicensis</i>		x	x			x
<i>Cynoscion microlepidotus</i>				x		
<i>Cynoscion virescens</i>						x
<i>Paralichthys brasiliensis</i>	x	x	x	x		x
<i>Macrodon ancylodon</i>	x	x	x			x
<i>Micropogonias furnieri</i>	x	x				x
<i>Umbrina canosai</i>	x	x	x			
<i>Menticirrhus sp.</i>	x	x				
<i>Menticirrhus littoralis</i>			x			
<i>Isopisthus parvipinnis</i>				x	x	x
<i>Stellifer rastrifer</i>			x		x	x
<i>Stellifer brasiliensis</i>					x	x
<i>Stellifer sp.</i>					x	x
<i>Ctenosciaena gracilicirrhus</i>						x
<i>Larimus breviceps</i>						x
<b>Pomatomidae</b>						
<i>Pomatomus saltatrix</i>	x	x				
<b>Mugilidae</b>						
<i>Mugil sp.</i>		x				
<b>Phycidae</b>						
<i>Urophycis brasiliensis</i>	x	x	x			
<b>Trichiuridae</b>						
<i>Trichiurus lepturus</i>	x	x	x			
<b>Batrachoididae</b>						
<i>Porichthys porosissimus</i>	x	x	x			x
<b>Stromateidae</b>						
<i>Peprilus paru</i>	x	x				x
<b>Merlucciidae</b>						
<i>Merluccius hubbsi</i>		x				
<b>Engraulidae</b>						
<i>Anchoa marinii</i>	x	x	x		x	
<i>Anchoa filifera</i>				x		x
<i>Engraulis anchoita</i>	x	x	x			
<i>Cetengraulis edentulus</i>				x		
<i>Anchoviella lepidentostole</i>						x
<i>Lycengraulis olidus</i>	x					

Ophidiidae	<i>Raneya fluminensis</i>		x				
Triglidae	<i>Prionotus sp.</i>		x				
Congridae	<i>Conger orbignyanus</i>					x	
Ophichthyidae	<i>Ophichthus cf. gomesii</i>					x	
Carangidae	<i>Trachurus lathami</i>	x	x		x		
Clupeidae	<i>Sardinella brasiliensis</i>						x
	<i>Odontognathus mucronatus</i>						x
	<i>Chirocentrodon bleekermanus</i>						x
	<i>Pellona harroweri</i>						x
Atherinopsinae	<i>Odonthestes bonariensis</i>	x					
Bothidae	<i>Syacium papillosum</i>			x			
	<i>Paralichthys isosceles</i>			x			
<b>Cefalópodes</b>							
Loliginidae	<i>Loligo sanpaulensis</i>	x	x		x		x
	<i>Loligo plei</i>		x		x	x	x
	<i>Lolliguncula brevis</i>				x		x
Argonautidae	<i>Argonauta nodosa</i>		x		x		
Octopodidae	<i>Eledone gaucha</i>				x		
<b>Crustáceos</b>							
Solenoceridae	<i>Pleoticus muelleri</i>	x	x				
Penaeidae	<i>Penaeus paulensis</i>	x					
	<i>Penaeus spp.</i>					x	
	<i>Xyphopenaeus kroyeri</i>						x
Palaenomidae	<i>Artemesia longinaris</i>	x	x				x

### 1.3.5. Resultados

Foram identificados 19 ácidos graxos, sendo eles o 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 15:1, 16:0, 16:1, 16:1n7, 16:2n4, 16:3n4, 17:0, 17:1, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, 18:1n3, 20:5n3, 22:6n3 e 24:0. As porcentagens encontradas para cada região estão apresentadas figura 8 e as médias com seus respectivos desvios padrão estão apresentados na tabela 4.

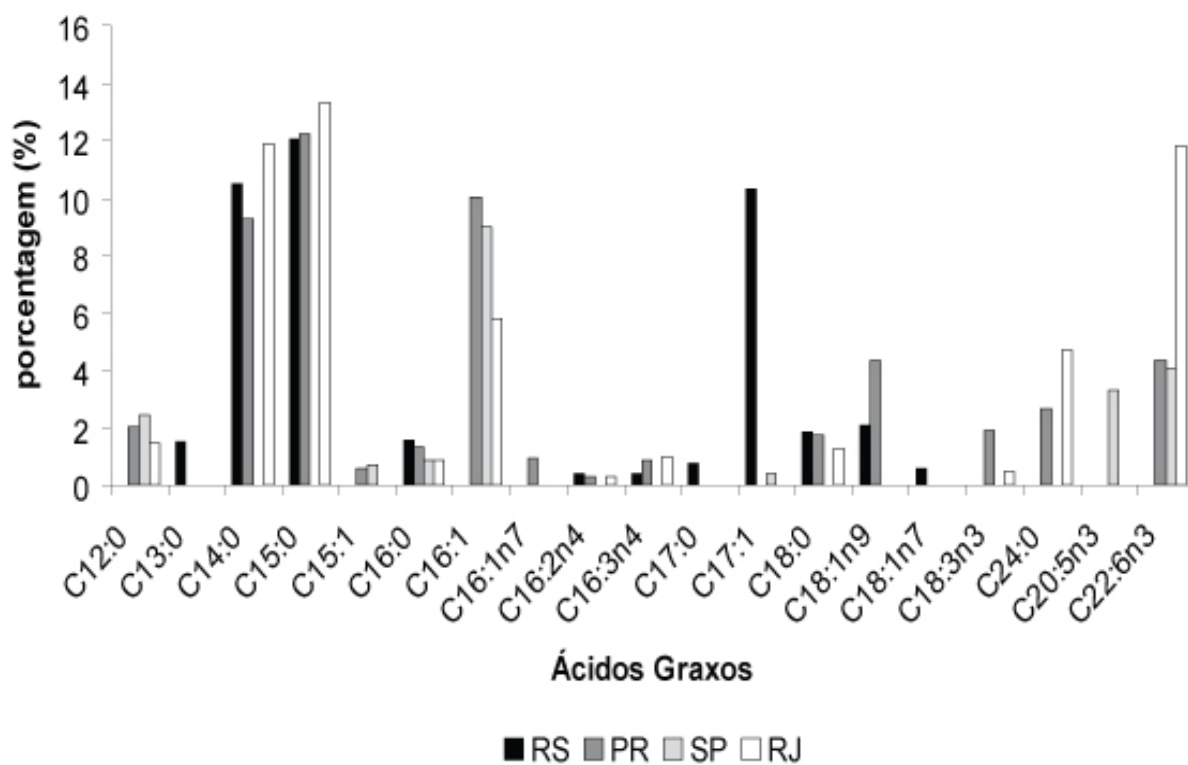


Figura 8. Ácidos graxos identificados na camada de gordura das franciscanas do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ).

Tabela 4. Porcentagens dos ácidos graxos (AG) presentes na camada de gordura das franciscanas do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ).

AG	Origem das amostras*				P
	RS	PR	SP	RJ	
12:0	n.d.	2,05 ± 1,48 (5)	2,42 ± 2,15 (6)	1,43 ± 0,72 (4)	0,665
13:0	1,49 ± 0,39 (5)	n.d.	n.d.	n.d.	-
14:0	10,47 ± 1,78 (5)	9,26 ± 1,79 (6)	n.d.	11,86 ± 5,21 (4)	0,436
15:0	12,07 ± 2,47 (5)	12,23 ± 1,79 (6)	n.d.	13,36 ± 5,93 (4)	0,840
15:1	n.d.	0,61 (1)	0,67 ± 0,12 (3)	n.d.	-
16:0	1,58 ± 0,60 (5)	1,35 ± 0,29 (4)	0,86 ± 0,15 (4)	0,85 ± 0,22 (3)	0,048 <sup>a</sup>
16:1	n.d.	10,04 ± 2,86 (8)	9,00 ± 5,29 (6)	5,81 ± 4,23 (5)	0,217
16:1n-7	n.d.	0,94 (1)	n.d.	n.d.	-
16:2n-4	0,39 (1)	0,32 ± 0,09 (3)	n.d.	0,28 (1)	-
16:3n-4	0,42 (1)	0,86 ± 0,41 (4)	n.d.	0,99 ± 0,12 (2)	0,698
17:0	0,78 ± 0,17 (3)	n.d.	n.d.	n.d.	-
17:1	10,30 ± 1,45 (5)	n.d.	0,42 ± 0,11 (2)	n.d.	<0,001 <sup>b</sup>
18:0	1,84 ± 0,86 (5)	1,72 ± 0,47 (5)	n.d.	1,27 ± 0,24 (2)	0,600
18:1n-9	2,09 ± 0,62 (3)	4,33 ± 1,34 (2)	n.d.	n.d.	0,077
18:1n-7	0,59 (1)	n.d.	n.d.	n.d.	-
18:3n-3	1,89 ± 0,39 (2)	n.d.	0,44 (1)	n.d.	-
24:0	n.d.	2,66 ± 1,95 (4)	n.d.	4,69 ± 1,86 (3)	0,224
20:5n-3	n.d.	n.d.	3,30 ± 3,95 (4)	n.d.	-
22:6n-3	n.d.	4,33 ± 3,48 (6)	4,04 ± 4,33 (5)	11,84 ± 9,11 (5)	0,098
Σ saturados	28,23	29,27	3,28	33,46	
Σ monoinsaturados	12,98	15,92	10,09	5,81	
Σ PUFAs	2,7	5,51	7,78	13,11	
Σ n-3	1,89	4,33	7,78	11,84	

\*dados apresentados como média ± desvio padrão; número amostral representado entre parênteses.

<sup>a</sup> = diferença encontrada entre os animais do RS e RJ; <sup>b</sup> = diferença encontrada entre os animais do RS e SP.

n.d.= não detectado.

A quantidade de ácido palmítico 16:0 foi significativamente diferente entre os animais do RS e RJ ( $P= 0.048$ ) e o heptadecenóico 17:1 entre os animais do RS e SP ( $P<0.001$ ) (tabela 4). Os ácidos graxos 13:0, 17:0, 18:1n-7 foram observados apenas nos animais provenientes do RS, enquanto os ácidos láurico (12:0), palmitoléico (16:1) e docosahexaenóico (22:6:n-3) foram observados apenas nos animais do PR, SP e RJ. Alguns ácidos graxos foram observados apenas como traços ( $<0.5\%$  da composição) como o 16:2n-4, 16:3n-4 nos animais do RS e o ácido heptadecenóico (17:1) e o ácido linolênico (18:3n-3) para os animais de SP.

Através do dendograma foi possível observar que os animais do Rio Grande do Sul ( $n= 5$ ) apresentaram uma diferenciação na composição de ácidos graxos na camada de gordura para o padrão Fame Mix em comparação aos animais coletados nos estados do Paraná ( $n= 8$ ), São Paulo ( $n= 6$ ) e Rio de Janeiro ( $n= 5$ ) (figura 9). A matriz de cálculo do cluster para o padrão Fame Mix foi realizado separadamente da análise dos outros padrões em razão das colunas possuírem polaridades diferentes, o que resultou em cromatogramas com diferentes quantidades para o tempo de retenção. Assim, o dendograma para Fame Mix foi realizado utilizando 45 variáveis (tempos de retenção do cromatograma que representam ácidos graxos) e 24 unidades amostrais.

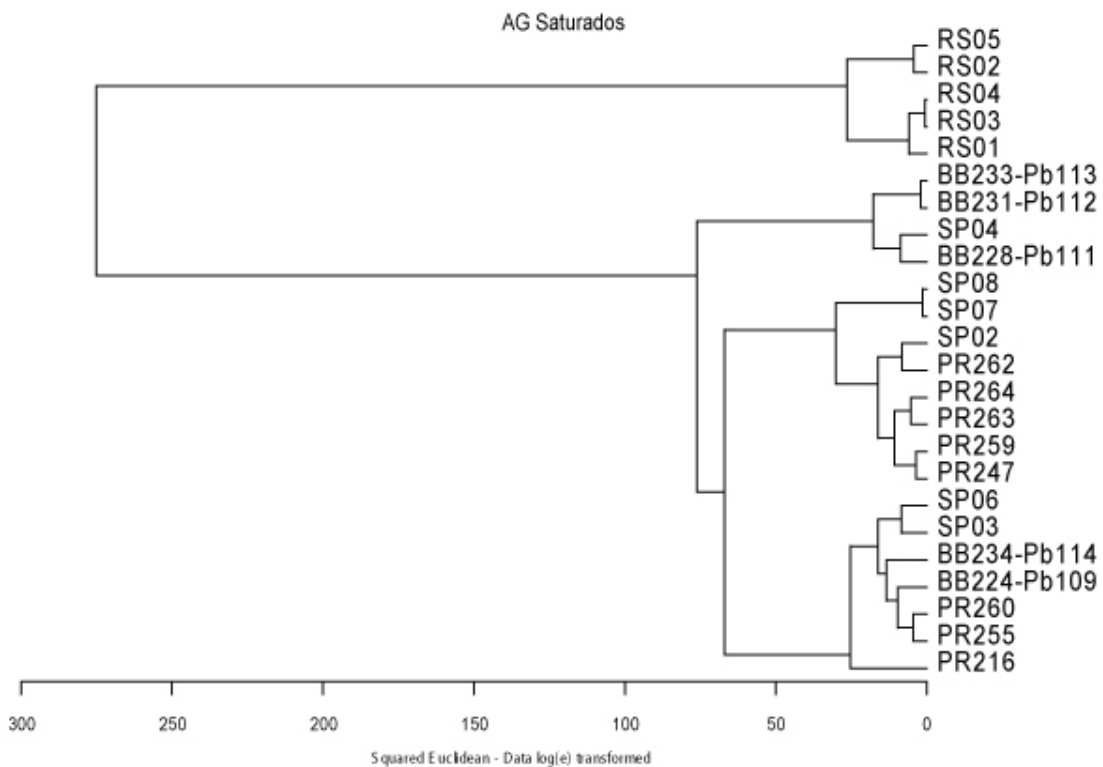


Figura 9. Cluster da composição de ácidos graxos da camada de gordura da franciscana (*P. blainvillei*) para os animais do RS, PR, SP e RJ (animais com código BB[no.]-Pb[no.]) utilizando o padrão FAME MIX®.

Para os padrões PUFA-2 e PUFA-3, a matriz foi composta por 40 variáveis e 15 unidades amostrais (figura 10). Não foi observada uma distinção na composição dos ácidos graxos na camada de gordura ao longo da distribuição da espécie no Brasil. Nesta análise foram analisados os animais do RS (n = 5), do PR (n = 6) e do RJ (n = 4).

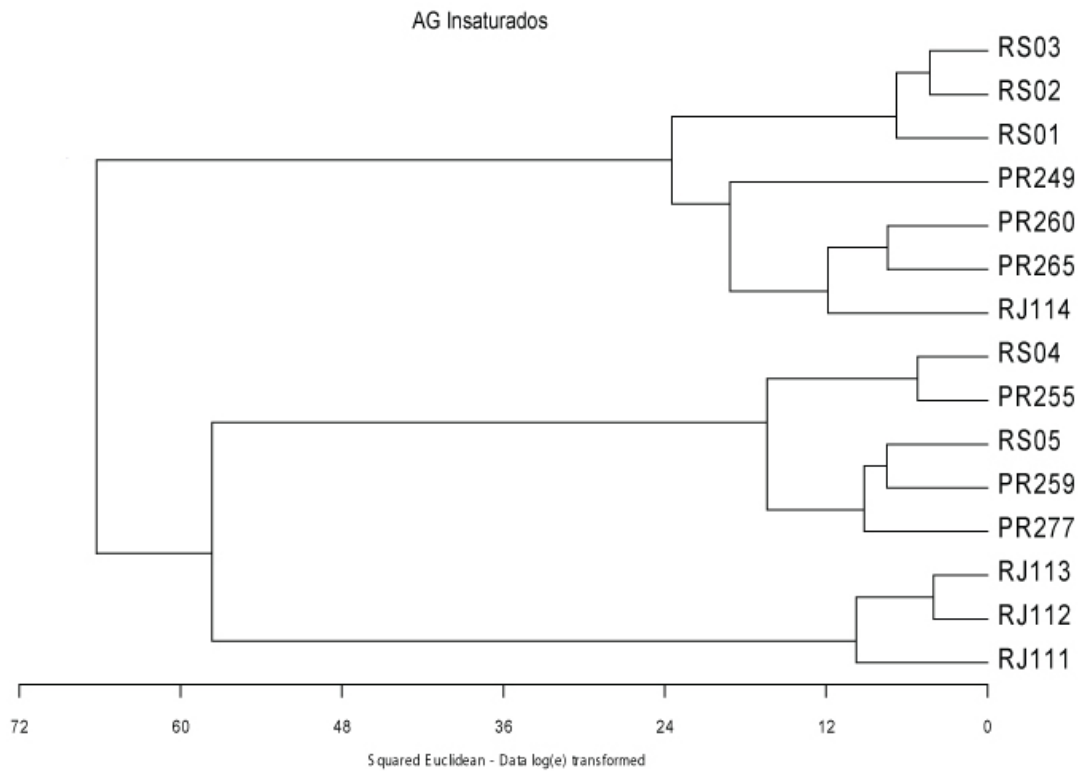


Figura 10. Cluster da composição de ácidos graxos da camada de gordura da franciscana (*P. blainvillei*) para os animais do RS, PR, SP e RJ utilizando os padrões PUFA-2 (*Animal Source*) e PUFA-3 (*Menhaden Oil*).

A comparação da dieta das franciscanas utilizando a ausência/presença das espécies de peixes, cefalópodes e crustáceos (figura 11) demonstrou que os itens alimentares da dieta dos animais do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná são mais próximas entre si do que os dos animais do Rio Grande do Sul.

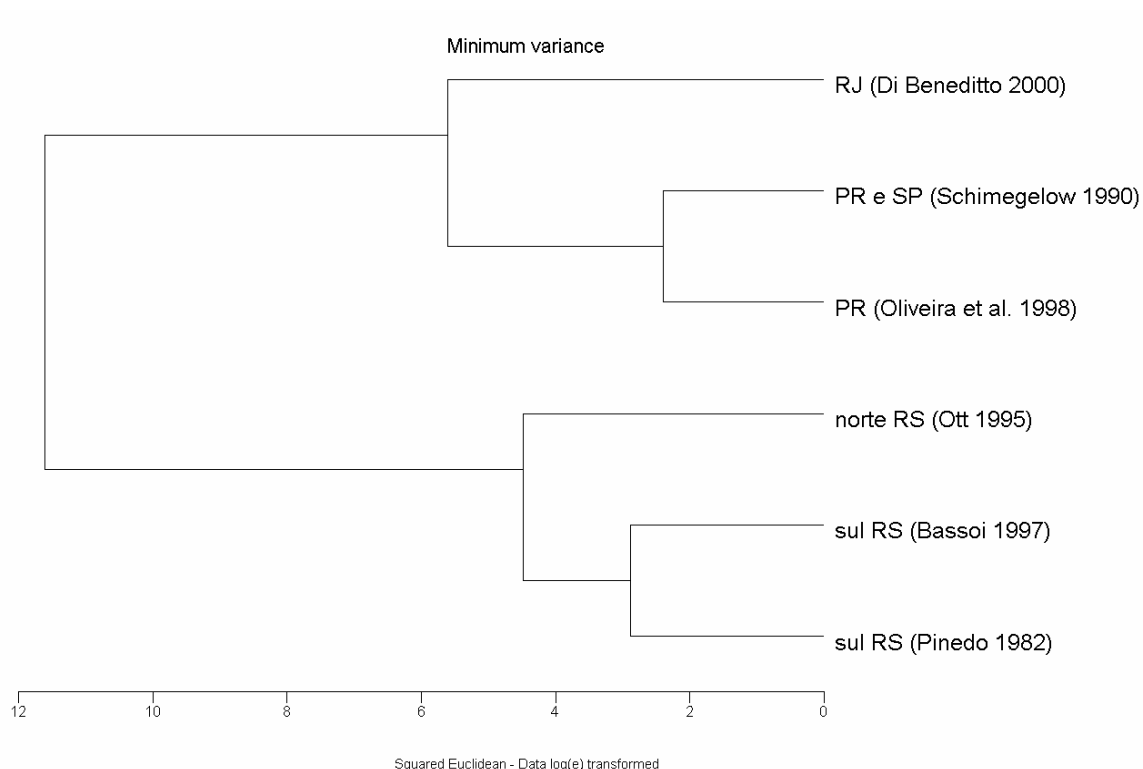


Figura 11. Cluster realizado com as espécies de peixes, cefalópodes e crustáceos presentes na dieta da franciscana (*P. blainvillei*) ao longo da distribuição na costa brasileira.

### 1.3.6. Discussão

Existem duas grandes categorias de ácidos graxos. A primeira, inclui os ácidos graxos que podem ser sintetizados pelos animais, como os saturados e seus isômeros, como 16:0 e 18:0, que podem indicar uma influência da dieta. A segunda categoria é formada pelos PUFAs, obtidos exclusivamente pela dieta, como os polinsaturados ômega-3 e -6 (Ackman e Eaton 1966, Iverson et al. 1997). A presença destes ácidos graxos na camada de gordura de mamíferos marinhos é influenciada diretamente pela alimentação. Os ácidos graxos mais



abundantes encontrados na franciscana foram o 14:0 e o 15:0 para os animais do RS, PR e RJ, o 17:1 para os animais do RS e o 22:6n-3 para os animais do RJ. A composição dos ácidos graxos na camada de gordura da franciscana (*P. blainvillei*) encontrada no presente trabalho é semelhante à descrita para outras espécies de cetáceos previamente estudadas, como o *harbour porpoise* (*Phocoena phocoena*) (Koopman 1998), a baleia minke (*Balaenoptera acutorostrata*) (Olsen e Grahl-Nielsen 2003), a franciscana (Araújo 2005), a orca (*Orcinus orca*) (Herman et al. 2005) e o boto (*Tursiops truncatus*) (Walton et al. 2007).

O ácido eicosapentaenóico (20:5n-3), precursor das prostaglandinas da série 3 (PG3), tromboxanos (TX) e dos leucotrienos da série 5 (LT), é originário do ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3), da família dos  $\omega$ -3, também encontrado em *P. blainvillei*. A presença de concentrações maiores de ácidos graxos saturados em comparação a polinsaturados também pode ser observada em outros trabalhos, porém é comum a presença de uma concentração maior de monoinsaturados em relação à saturados em mamíferos marinhos (Käkelä e Hyvärinen 1998, Koopman 1998, Olsen e Grahl-Nielsen 2003, Araújo 2005, Herman et al. 2005, Walton et al. 2007).

Variações da composição de ácidos graxos em mamíferos marinhos permitem a identificação de animais de diferentes regiões, como demonstrado para pinípedes. Käkelä et al. (1993 e 1995) e Käkelä e Hyvärinen (1998) encontraram diferenças nas assinaturas de ácidos graxos em subespécies da foca anelada (*Phoca hispida*) que habitam diferentes ambientes como o marinho e de água doce. Beck et al. (2005) observaram que variações entre grupos podem ocorrer na foca anelada em decorrência da distribuição da espécie. Iverson et al. (2006) demonstrou que as assinaturas de ácidos graxos permitem a identificação precisa das espécies de pinípedes que habitam o Ártico, como as *bearded seals* (*Erignatus barbatus*), a *harp seal* (*Pagophilus groenlandicus*), *hooded seals* (*Cystophora cristata*) e morsas (*Odobenus*

*rosmarus*), fato corroborado pelas características de forrageamento espécie-específicas citadas por Bowen e Siniff (1999). Thiemann et al. (2007) demonstraram que as diferenças encontradas na composição dos ácidos graxos da foca anelada (*P. hispída*) possuem diferenças significativas quando comparadas demograficamente, sendo que um dos fatores que pode estar influenciando esta diferença é a distância entre os grupos. A diferença encontrada através do cluster utilizando a alimentação da franciscana associada à diferença da composição conforme a distribuição do animal provavelmente é o fator determinante para o padrão observado para as franciscanas do Rio Grande do Sul em comparação com o restante do litoral brasileiro. Este mesmo fator parece ser o responsável pelas diferenças encontradas por Olsen e Grahl-Nielsen (2003) para as baleias minke (*B. acutorostrata*) do Mar do Norte e do Mar da Noruega.

Apenas os animais do Rio Grande do Sul demonstraram diferença em relação a outras populações já conhecidas genética e morfometricamente como as dos animais do Paraná e São Paulo e do Rio de Janeiro (Pinedo 1991, Secchi et al. 2003, Lázaro et al. 2004). Apesar disso, a diferença na composição de ácidos graxos da camada de gordura dos animais do Rio Grande do Sul em comparação com o restante do Brasil parece ser uma importante ferramenta para estudos sobre a ecologia alimentar da espécie. O cluster realizado com o padrão Fame Mix (figura 8) possui um resultado semelhante ao apresentado pelo cluster realizado com a dieta da espécie ao longo da distribuição da espécie no Brasil, demonstrando que os itens alimentares dos animais do RS são diferentes daqueles apresentados para RJ, PR e SP, mais semelhantes entre si (figura 10). A utilização de ácidos graxos na identificação de ecotipos e seus diferentes hábitos alimentares para animais residentes, transeuntes e oceânicos foram observados para a orca (*O. orca*) por Herman et al. (2005), demonstrando que esta metodologia realmente pode fornecer dados importantes sobre os hábitos alimentares e utilização de habitat.

O Rio Grande do Sul é a região da convergência entre a corrente das Malvinas, mais fria, vinda do Sul, e a corrente do Brasil, mais quente, que banha o litoral brasileiro. No inverno, a corrente das Malvinas é predominante, deixando o litoral do Rio Grande do Sul mais frio. Já no verão, a corrente do Brasil empurra a corrente das Malvinas mais para o sul, permitindo que o litoral do Rio Grande do Sul seja banhado por suas águas mais quentes. A presença de duas correntes distintas faz com que ocorra uma diversidade maior de espécies de peixes (Haimovici et al. 1996). Este fato pode explicar a assinatura de ácidos graxos diferenciada da população do Rio Grande do Sul. Como apenas foi avaliada a presença e ausência das presas da franciscana devido ao número amostral de estômagos analisados, não foi possível avaliar variações temporais desta composição. Bassoi e Secchi (1999), através da análise do conteúdo estomacal de animais capturados acidentalmente por barcos de pesca de Rio Grande entre janeiro de 1994 e janeiro de 1997, demonstraram que os itens alimentares da franciscana sofreram uma alteração significativa ao longo de quase 20 anos, quando comparado o conteúdo estomacal de animais capturados entre 1976 e 1980 para a mesma região (Pinedo 1982). A franciscana é conhecidamente uma espécie de hábitos alimentares oportunista. Espécies de peixes com intensa exploração comercial, como *Macrodon ancylodon* e *Micropogonias furnieiri*, apresentaram uma redução de estoque devido à pesca e uma menor frequência de ocorrência no conteúdo estomacal da franciscana entre a década de 70 e 90. A frequência do teleósteo *Trichiurus lepturus* no estômago de *P. blainvillei* cresceu de 5% para 40% no mesmo período, sendo importante observar que esta espécie não possui valor comercial, ou seja, não teve seus estoques reduzidos e tornou-se um dos principais itens alimentares da espécie. Em contrapartida, *Cynoscion guatucupa*, que representa 47% da biomassa total de peixes ósseos para a região, foi o mais importante item alimentar da franciscana nos estudos de Pinedo (1982) e Bassoi e Secchi (1999).

A variação de temperatura também pode estar influenciando a composição de ácidos graxos e a concentração dos lipídios totais na camada de gordura da franciscana. A concentração de lipídios totais do tecido adiposo de 26 animais do Rio Grande do Sul foi comparada com 21 animais do Paraná e 5 de São Paulo (figura 12) por Caon (2002). Os animais do Rio Grande do Sul apresentaram uma concentração média de  $229,46 \pm 32,13$  mg/g (n= 26), enquanto os animais do estado do Paraná apresentaram média de  $145,10 \pm 11,70$  mg/g (n= 21), e os de São Paulo média de  $112,05 \pm 25,72$  mg/g (n= 5). A diferença encontrada entre os animais do Rio Grande do Sul e Paraná foi significativa ( $P < 0,05$ ). Animais provenientes de São Paulo, apesar de possuírem uma concentração de lipídios totais menor que os do Paraná, não apresentaram diferença provavelmente devido ao baixo número amostral (Caon 2002).

É conhecido que a camada de gordura possui uma diferenciação na função das regiões externa (mais próximo da pele), intermediária e interna (mais próximo do músculo) (Koopman et al. 1996, Olsen e Grahl-Nielsen 2003 e Araújo 2005). Käkälä e Hyvärinen (1996) comentam que na camada de gordura, como meio de diminuir a perda de calor para o meio externo, os mamíferos marinhos realizam a desaturação dos ácidos graxos saturados, como a realizada pela enzima delta 9 desaturase, que acrescenta uma ligação dupla no ácido palmítico (16:0) transformando-o em ácido palmitoléico (16:1), encontrado em concentrações próximas para ambas as amostras. Ácidos graxos mono e poliinsaturados possuem um ponto de fusão mais baixo, permitindo a fluidez da membrana e reduzindo o potencial de perda de calor pela superfície corporal (Mayes 1990). Para as franciscanas coletadas neste estudo, a porcentagem de ácidos graxos saturados foi de 28.23 a 33.46% da composição total, porém os animais de SP apresentaram uma concentração de 3.28%. O ácido oléico (18:1n-9) é um ácido graxo típico de dieta proveniente da cadeia alimentar marinha, sendo o precursor do ácido alfa-linolênico (18:3n-3) através da enzima delta 15 desaturase. Após a ingestão, o ácido alfa-

linolénico será um dos substratos para formação de prostaglandinas do tipo 3 e dos leucotrienos da série 5 em mamíferos (Calder 1998).

A presença de ácidos graxos insaturados no estrato externo da camada de gordura proporcionaria uma função de proteção ao frio devido ao seu baixo ponto de fusão, que garante a fluidez da membrana e reduz a perda de calor na superfície corporal pela manutenção da sua liquidez (Mayes 1990, Pond 1998). Como nem todas as amostras utilizadas neste experimento possuíam a musculatura adjacente para a coleta da gordura, optou-se por utilizar apenas a camada mais externa, adjacente à pele das franciscanas. Ainda não foi possível observar diferenças entre machos e fêmeas e suas respectivas classes reprodutivas, uma vez que o número amostral foi pequeno para esta análise. Porém, o fato dos animais provenientes do RS, que incluem machos e fêmeas de diferentes comprimentos totais, terem apresentado um agrupamento significativo no dendograma sugere que em termos populacionais estas diferenças não sejam importantes.

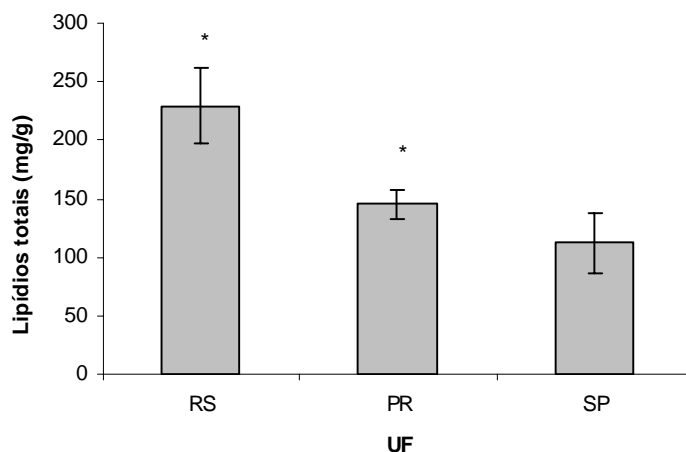


Figura 12. Concentração de lipídios totais da camada de gordura de franciscanas (*P. blainvillei*) entre os estados brasileiros do Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e São Paulo (SP). \*= diferença significativa entre o RS e PR ( $P < 0,05$ ).

As quantidades de ácido palmítico (16:0) entre os animais do RS e RJ ( $P= 0,048$ ), e de ácido heptadecenóico 17:1 entre os animais do RS e SP ( $P<0,001$ ), foram os únicos que apresentaram diferença entre as populações estudadas. Os resultados obtidos para os padrões Fame Mix não foram os mesmos encontrados para os padrões PUFA-2 e PUFA-3. É conhecido que a cromatografia gasosa que utiliza hexano para a análise não é tão eficiente quanto aquela que utiliza os derivados dos ésteres de nitrogênio dos ácidos graxos associado à cromatografia gasosa (Wetzel e Reynolds 2004). Este método permitiu a identificação de 45 ácidos graxos na camada de gordura da baleia *bowhead* (*Balaena mysticetus*) com menor variação dos resultados em comparação com os 19 ácidos graxos identificados utilizando o método tradicional através de cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (FID). Lamentavelmente o acesso a este tipo de equipamento não foi possível resultando provavelmente na não identificação de alguns ácidos graxos. Ainda assim, a utilização dos tempos de retenção como parâmetros para os ácidos graxos não identificados demonstrou-se satisfatória quando realizada com as premissas descritas aqui em comparação com as porcentagens encontradas para outros cetáceos, resultando em um maior rigor na obtenção dos resultados quando a identificação não foi possível.

Os dados aqui apresentados demonstram que os ácidos graxos não são um bom parâmetro para a identificação de estoques populacionais como proposto por Olsen e Grahl-Nielsen (2003). Para um melhor entendimento dos resultados obtidos, é aconselhada a utilização de mais de um método para avaliar as diferenças populacionais ou regionais em animais na natureza. Por isso, além da identificação dos ácidos graxos, é recomendada a comparação dos resultados com os isótopos de carbono e nitrogênio, com o objetivo de avaliar o nível trófico e as regiões de alimentação (para descrição destas técnicas, ver o item Isótopos estáveis, capítulo 2), bem como a quantificação de metais pesados, como sugerido por Herman

et al. (2005). Além disso, é importante a obtenção de outros padrões para ácidos graxos polinsaturados para auxiliar a identificação de um maior número de ácidos graxos, substituindo a utilização dos tempos de retenção. Além disso, a inclusão dos animais da distribuição argentina e uruguaia na análise também é um importante meio de avaliação dos resultados obtidos, uma vez que estes animais pertencem à mesma população dos animais do Rio Grande do Sul.

1.4. Experimento 2: Composição de ácidos graxos presentes na camada de gordura da baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) no litoral brasileiro e na Antártica.

**Glauco Caon**

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC),  
Departamento de Fisiologia, ICBS/UFRGS, Porto Alegre, RS.

**Eduardo R. Secchi**

2- Laboratório de Mamíferos Marinhos, Museu Oceanográfico "Prof. Eliézer C. Rios", Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Cx. P. 379, RS 96200-970 Brazil.

**Salvatore Siciliano**

3- Grupo de Estudos de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos (GEMM), Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ, Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Rio de Janeiro - RJ

**Luiz C. Kucharski**

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC),  
Departamento de Fisiologia, ICBS/UFRGS, Porto Alegre, RS.



### 1.4.1. Resumo

As baleias jubartes (*M. novaeangliae*) são baleias migratórias que no hemisfério sul se alimentam em águas Antárticas e sub-Antárticas, se reproduzindo ao longo da costa dos continentes africano, sul-americano, australiano e asiático. A espécie está distribuída em sete estoques ao redor do mundo, e suas rotas migratórias na costa brasileira começaram a ser elucidadas através de telemetria por satélite. Com o objetivo de obter mais dados sobre os animais que freqüentam a costa da América do Sul, a assinatura de ácidos graxos foi utilizada como metodologia para a observação de possíveis variações da sua composição em animais coletados na Antártica (n= 6) e litoral do RJ (n= 4). Foram identificados 7 ácidos graxos utilizando os padrões PUFA-2 e PUFA-3, sendo eles o 14:0, 16:0, 16:1n7, 16:2n4, 18:0, 18:1n9 e 18:3n3. Apenas o ácido graxo 16:0 apresentou diferença significativa. O dendograma permitiu a observação de dois grupos bem distintos formados pelos animais da Antártida e do RJ, sugerindo que a sua alimentação ocorra provavelmente em locais diferentes ou sobre espécies diferentes. Estes dados corroboram a afirmação de que os animais coletados no lado do Pacífico da Antártida não são os mesmos que freqüentam as águas brasileiras nos períodos de reprodução. Uma vez que foram comparadas amostras coletadas por biópsias com animais provenientes de encalhes, estas conclusões devem ser interpretadas com cautela apesar de que a expectativa de uma distribuição aleatória no dendograma devido à decomposição do tecido dos animais encalhados não foi confirmada. Assim, para a confirmação dos resultados obtidos, é necessária a comparação com biópsias realizadas no litoral brasileiro.

Palavras-chave: baleia jubarte, *Megaptera novaeangliae*, ácidos graxos, estoques populacionais, Brasil.

## 1.4.2. Introdução

### 1.4.2.1. A baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) (Borowski, 1781)

A baleia jubarte, *Megaptera novaeangliae* (figura 13), é uma espécie que ocorre em todos mares do mundo tendo um marcado ciclo de vida através das migrações. Estes animais atingem aproximadamente 18 metros de comprimento, sendo que as fêmeas são ligeiramente maiores que os machos. Possuem coloração escura com manchas ventrais brancas. As nadadeiras peitorais são caracteristicamente longas, denominando o gênero desta espécie (*mega*= grande, *ptera*= asa). A nadadeira caudal possui as bordas recortadas apresentando na região ventral padrões individuais de coloração, permitindo o reconhecimento individual através da fotoidentificação (Bastida et al. 2007). Esta espécie possui calosidades na cabeça, sendo que as calosidades ventrais podem apresentar cirripédios (cracas) aderidos. O borribo desta espécie é alto e largo, sendo uma das principais características de identificação à distância da espécie em seu habitat natural (Hetzl e Lodi 1993, Carwardine 1995, Bastida et al. 2007).



Figura 13. Detalhe dorsal da cabeça e das nadadeiras peitoral e dorsal da baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) no Estreito de Gerlache, Península Antártica (fotos: Glauco Caon<sup>©</sup>).

Durante o verão estes animais freqüentam altas latitudes em busca de alimento, enquanto nos meses de inverno a espécie procura as águas quentes das baixas latitudes para a cópula e nascimento dos filhotes. No hemisfério sul esta espécie se alimenta na Antártica principalmente do krill (*Euphasia superba*) durante o verão, freqüentando as águas dos continentes sul-americano, australiano e africano durante o inverno (Dawbin 1956, Chittleborough 1965, Mackintosh 1965).

A migração e a fidelidade a áreas bem definidas de alimentação e reprodução facilitaram que países baleeiros as encontrassem em grandes concentrações para o abate. Dados a respeito da caça desta baleia mostram que atualmente existem aproximadamente 12.000 exemplares no hemisfério sul, ou seja, apenas 3% da população original (Gambell 1973). A caça teve seu auge no início do século passado. Estes animais eram fonte abundante de carne, produtos derivados de ossos e cerdas bucais e óleo, que servia para iluminação pública e como cimento na construção civil. Na Antártica, entre 1904/05 e 1913/14, foram capturados 19.986 jubartes, enquanto as capturas de outras espécies eram de 9.030 animais. A caça continuou durante as décadas seguintes, mesmo com a diminuição dos estoques, culminando no banimento desta prática em 1963 no hemisfério sul (Mackintosh, 1965). Winn e Reichley (1985) estimaram a população mundial de baleias jubarte em 6.000 animais, sendo aproximadamente 900 animais no estoque presente no Brasil. No total, aproximadamente 200.000 baleias jubartes foram capturadas na Antártica e áreas de reprodução depois de 1900 (Findlay 2001).

Os animais restantes estariam agregados em sete estoques ao redor da Antártica, todos insuficientemente caracterizados (Payne e Katona 1986, IWC 1998). O estoque correspondente aos animais que utilizam as águas brasileiras durante o inverno para a procriação é o estoque 'A'. Apesar de estudos prévios indicarem a Península Antártica (Área de Manejo I segundo a

IWC) e Ilhas Geórgias do Sul (Área de Manejo II) como as áreas de alimentação do estoque 'A' (Slijper 1962, 1965, IWC 1998), não existem evidências fortes o suficiente que indiquem este fato. Ao contrário, estudos utilizando análise molecular, coloração e fotoidentificação sugerem que as baleias presentes na Península Antártica estão relacionadas com os estoques presentes no Pacífico Sul Oriental (estoque 'G'), enquanto os animais que migram para o Brasil estão mais relacionados com os estoques presentes na África e Oceania (Rosenbaum et al. 1995, 2000, Engel et al. 1999, Olavarria et al. 2000, Dalla-Rosa et al. 2001). Dados recentes indicam que a espécie iniciou uma lenta e gradativa recuperação de seus estoques. Estudos no Banco de Abrolhos indicam que um expressivo número de jubartes concentra-se nestas águas entre julho e janeiro para procriar e criar os filhotes (Dawbin 1966, Siciliano e Lodi 1989, Siciliano 1997). Zerbini et al. (2004) estimaram 628 animais para a região nordeste do Brasil, desde Aracajú (SE) até Natal (RN). Atualmente a identificação dos estoques que utilizam as áreas da Península Antártica e da costa brasileira como áreas de alimentação e reprodução tem sido realizadas através do levantamento de dados referente à fotoidentificação e genética destes animais, importantes para a conservação da espécie (Dalla-Rosa et al. 2001).

Mais recentemente Zerbini et al. (2004), através de telemetria por satélite, demonstrou que os animais do Brasil provavelmente se alimentem nas Ilhas da Convergência Antártica, indicando que os animais não frequentam a mesma área de alimentação dos animais estudados por Dalla-Rosa et al (2001). Assim, as metodologias para identificação dos estoques utilizadas por Olsen e Grahl-Nielsen (2003) podem auxiliar na identificação das rotas migratórias nestes animais.

### 1.4.3. Objetivo

Utilizar os ácidos graxos da camada de gordura para identificar os estoques populacionais da baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) na Península Antártica e na costa brasileira.

#### 1.4.3.1. Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os ácidos graxos presentes na camada de gordura da baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) presentes em águas Antárticas e no litoral brasileiro;
- Usar estes dados sobre ácidos graxos como marcadores populacionais comparando os resultados com outras técnicas já empregadas para este fim;
- Observar se existe diferença ou semelhança na composição dos ácidos graxos nos animais amostrados em áreas de alimentação (Antártida) e reprodução (litoral brasileiro) a fim de obter dados sobre as suas rotas migratórias.

### 1.4.4. Método

#### 1.4.4.1. Coleta do tecido adiposo

Para este estudo, a coleta do tecido adiposo da baleia jubarte (*M. novaeangliae*) foi realizada durante as Operações Antárticas XXII (2003/2004) e XXIII (2004/2005) pelo projeto ‘Caracterização dos estoques de baleia jubarte, *Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781), e estimativas de abundância relativa de cetáceos nos oceanos Atlântico Sul Ocidental e Antártico’, vinculado ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). As coletas foram

realizadas no Estreito de Gerlache (figura 14), a bordo do Navio de Apoio Oceanográfico Ary Rongel. Esta região é um conhecido local de concentração de baleias jubarte nos meses de verão.

Assim que os animais eram avistados, uma equipe de pesquisadores realizou a aproximação com bote inflável Zodiac<sup>®</sup>. Para a coleta de pele e tecido adiposo foi utilizado uma balestra de 150 lbs e flecha adaptada para a coleta de amostras de mamíferos marinhos (figura 15). A fotoidentificação dos animais foi realizada usando máquina fotográfica N90 com lentes 70-300mm Nikor AF/4.5-5.6 permitindo a identificação individual de cada animal coletado, impedindo a repetição da coleta em um mesmo animal.

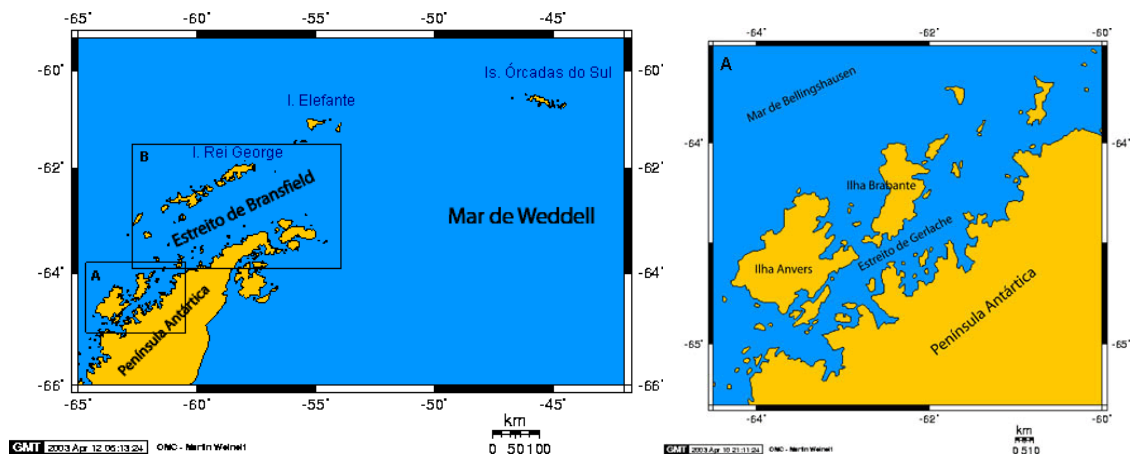


Figura 14. Mapas da localização das biópsias de baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*) realizadas no Estreito de Gerlache, oeste da Península Antártica.



Figura 15. Detalhe da balestra e ponteira utilizadas na coleta de biópsias do tecido adiposo e pele de cetáceos (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>).

Após coleta, o tecido adiposo e da pele presente no interior das ponteiros foram separados em laboratório a bordo do Navio de Apoio Oceanográfico (NapOc) Ary Rongel. As amostras de gordura foram identificadas, embaladas em papel alumínio e congeladas em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . A sexagem dos animais foi realizada pelo Laboratório de Mamíferos e Tartarugas Marinhas (MORG/FURG) segundo Shaw et al. (2003). Os introns dos genes *Zfx* e *Zfy* foram amplificados e a variação do tamanho dos íntrons destes genes resultou no aparecimento de uma banda Y característica dos machos. Fêmeas apresentaram apenas uma banda correspondente ao íntron de X, enquanto machos apresentaram duas correspondendo aos íntrons de X e Y.

No Brasil as amostras foram coletadas no litoral do Rio de Janeiro pelo Prof. Dr. Salvatore Siciliano, do Grupo de Estudos de Mamíferos Marinhos da Região dos Lagos (GEMM-Lagos), Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Rio de Janeiro, RJ. Foram coletados animais já mortos encalhados em praias em diferentes estados de decomposição. O tecido adiposo foi coletado, identificado e

armazenado em freezer -20° C para posterior análise. Da camada de gordura coletada foi retirado uma subamostra de aproximadamente 100 mg para análise, sempre do segmento menos oxidado e mais interior da amostra original.

As amostras da Antártica e do litoral brasileiro (tabela 5) foram submetidas à extração de lipídios totais por clorofórmio-metanol (2:1) segundo Folch et al. (1957). Uma amostra de aproximadamente 0,5 gramas foi cortado em pedaços menores e incluído em 2,0 ml de clorofórmio metanol. Após processamento em Potter o líquido resultante formado pelos lipídios totais e o tecido foram centrifugados com água destilada em tubos falcon. Foram formadas duas fases, sendo a superior formada pela água e o metanol e a segunda pela gordura com o clorofórmio. Após a repetição da centrifugação com água destilada para retirada do metanol, a fase superior foi descartada resultando apenas a fase inferior formada pela gordura e clorofórmio. O clorofórmio foi então retirado através de evaporação com nitrogênio.

A metodologia utilizada para identificar os ácidos graxos está descrito no item 1.3.4.3 do experimento 1.

#### 1.4.4.2. Análise estatística

A análise estatística foi realizada conforme descrito no item 1.3.4.4 do experimento 1. A matriz foi realizada utilizando 44 tempos de retenção e ácidos graxos identificados no tecido adiposo das baleias jubartes estudadas (n=10), sendo 04 animais do RJ e 06 animais provenientes do Estreito de Gerlache, Antártida.



Tabela 5. Informações das baleias jubartes (*Megaptera novaeangliae*) coletadas na Antártica e litoral brasileiro utilizadas neste estudo.

Código do animal	Local de coleta	Forma de Coleta	CT (m)	Sexo
OAXXII #4	Estreito de Gerlache	biópsia	n.i.	F
OAXXII #5	Estreito de Gerlache	biópsia	n.i.	F
OAXXIII #2	Estreito de Gerlache	biópsia	n.i.	n.i.
OAXXIII #3	Estreito de Gerlache	biópsia	n.i.	n.i.
OAXXIII #4	Estreito de Gerlache	biópsia	n.i.	n.i.
OAXXIII #5	Estreito de Gerlache	biópsia	n.i.	n.i.
GEMM 036	Praia do Foguete, Cabo Frio (RJ). 03/10/02	encalhe	4,63	M (neonato)
GEMM 055	Praia de Jurubatiba, Macaé (RJ). 26/5/04	encalhe	~15,0	n.i.
GEMM 110	Praia do Pontal, Arraial do Cabo (RJ) 09/9/2006	encalhe	16,0	n.i.
GEMM 113	Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Quissamã (RJ) 13/10/2006	encalhe	13,0	M

M= macho; F= fêmea; CT= comprimento total; n.i.= não identificado.

#### 1.4.5. Resultados

Foram analisadas 10 baleias jubarte, sendo 06 animais provenientes da Península Antártica e 04 do litoral do RJ. Foram identificados apenas 7 ácidos graxos (36.84%) dos 19 presentes nos padrões PUFA-2 e PUFA-3, sendo eles o 14:0, 16:0, 16:1n7, 16:2n4, 18:0, 18:1n9 e 18:3n3. As médias das concentrações encontradas estão representadas na figura 16 e seus respectivos desvios padrões e número amostral na tabela 6. Os ácidos graxos 16:2n-4 e

18:0 foram identificados apenas nos animais do Rio de Janeiro, enquanto os ácidos graxos 18:1n-9 e 18:3n-3, apenas nos animais da Antártica. Apenas o ácido graxo 16:0 apresentou diferença significativa entre os animais da Antártica e do litoral do RJ (tabela 6).

O dendograma realizado com os ácidos graxos identificados e os tempos de retenção obtidos através dos padrões PUFA-2 e PUFA-3 (figura 17), demonstrou uma forte separação na composição dos ácidos graxos da camada de gordura dos animais da Antártida e do litoral do Rio de Janeiro.

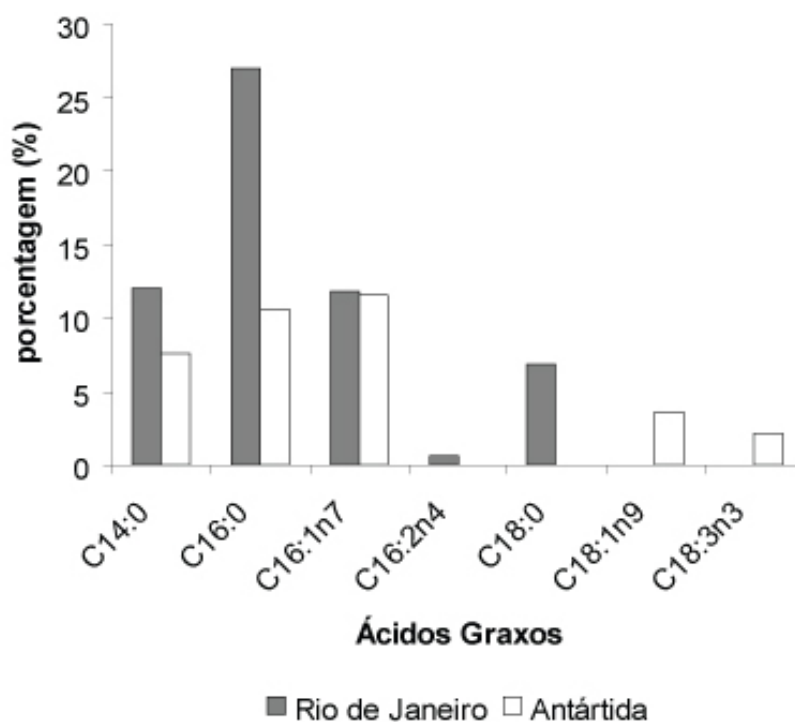


Figura 16. Porcentagem da composição dos ácidos graxos encontrados na Antártida e no litoral do Rio de Janeiro.

Tabela 6. Porcentagens dos ácidos graxos identificados nos animais coletados na Antártida e no Rio de Janeiro.

Ácidos Graxos	Rio de Janeiro*	Antártida*	P
14:0	12,02 ± 6,24 (4)	7,58 ± 3,66 (6)	0,189
16:0	27,02 ± 13,32 (4)	10,58 ± 4,81 (6)	0,022**
16:1n-7	11,79 ± 15,33 (3)	11,51 ± 6,83 (6)	0,796
16:2n-4	0,62 ± 0,38 (4)	n.d.	-
18:0	6,84 ± 5,04 (4)	n.d.	-
18:1n-9	n.d.	3,58 ± 1,59 (3)	-
18:3n-3	n.d.	2,14 ± 0,24 (3)	-

\*os dados são representados como média ± desvio padrão; número amostral entre parênteses;

\*\*diferença significativa (P<0,05);

n.d.= não detectados.

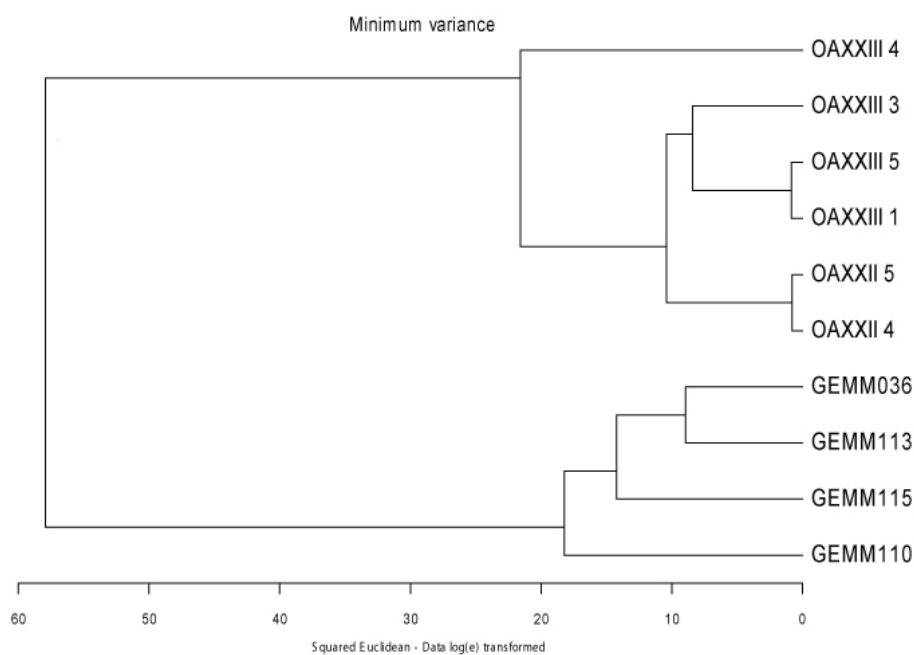


Figura 17. Dendrograma da composição de ácidos graxos e tempos de retenção do cromatograma da camada de gordura das baleias jubartes (*M. novaeangliae*) coletadas no Estreito de Gerlache, Antártica, (OAXXII e OAXXIII) e no litoral do Rio de Janeiro (GEMM).

#### 1.4.6. Discussão

Foi possível a identificação de apenas 7 ácidos graxos na camada de gordura da baleia jubarte (*Megaptera novaeangliae*), totalizando 36,84 % dos 19 ácidos graxos presentes nos padrões PUFA -2 e PUFA-3. Os ácidos graxos encontrados neste trabalho são semelhantes àqueles encontrados em outros estudos, como na baleia minke (*Balaneoptera acutorostrata*) (Olsen e Grahl-Nielsen 2003). Apenas o ácido oléico (18:1n-9), que aqui representou apenas 3,58% da composição dos ácidos graxos, enquanto na baleia minke este ácido graxo é responsável por aproximadamente 25% da composição. Os ácidos graxos identificados também foram semelhantes àqueles encontrados para odontocetáceos como a *Phocoena phocoena* (Koopman et al. 1996), o boto (*T. truncatus*) (Samuel e Worthy 2004, Walton et al. 2007) e as orcas (*O. orca*) (Herman et al. 2005).

Os dados desse trabalho sugerem que os animais coletados na Antártica e no litoral do Rio de Janeiro possuem diferentes assinaturas de ácidos graxos na composição lipídica da camada de gordura, formando dois grupos distintos (figura 16). Uma vez que os ácidos graxos presentes na camada de gordura são obtidos a partir dos lipídios presentes nos alimentos ingeridos, provavelmente estes animais estão se alimentando de espécies diferentes ou em diferentes regiões. A diferença no regime das correntes marinhas e no fluxo de nutrientes e alimentos na cadeia trófica para cada região provavelmente explique esta variação na composição (Ackman 1980, Ackman e Eaton 1966, Käkälä e Hyvärinen 1996). Esta diferença pode ser acentuada pela presença dos ácidos graxos 16:2n-4 e o ácido esteárico (18:0) nos animais do Rio de Janeiro, ausentes nos animais provenientes da Antártica, bem como a presença dos ácidos graxos 18:1n-9 e 18:3n-3 na amostra da Antártida, não observados nos animais do Rio de Janeiro. É importante lembrar que o ácido palmítico (16:0) apresentou

diferença significativa ( $P= 0,022$ ) na comparação entre ambos os grupos. Esta diferença na concentração do ácido palmítico, menor nos animais da Antártica e maior nos animais do RJ, podem ser resultado da função de manutenção da temperatura que os ácidos graxos realizam na camada de gordura. Käkälä e Hyvärinen (1996) comentam que na camada externa da camada de gordura, como meio de diminuir a perda de calor para o meio externo, os mamíferos marinhos realizam a desaturação dos ácidos graxos saturados, como a realizada pela enzima delta 9 desaturase que acrescenta uma ligação dupla no ácido palmítico (16:0) transformando-o em ácido palmitoléico (16:1), encontrado em concentrações próximas para ambas as amostras. Ácidos graxos mono e polinsaturados possuem um ponto de fusão mais baixo, permitindo a fluidez da membrana e reduzindo o potencial de perda de calor pela superfície corporal (Mayes 1990). O ácido oléico (18:1n-9) é um ácido graxo típico de dieta proveniente de zooplâncton, sendo o precursor do ácido alfa-linoléico (18:2n-6) através da enzima delta 15 desaturase. Após a ingestão, o ácido alfa-linoléico será um dos substratos para formação de prostaglandinas em mamíferos (Calder 1998).

Como observado no experimento anterior, a utilização da composição dos ácidos graxos em franciscanas (*P. balinvillei*) não pode ser considerada resultado de diferenças populacionais, mas sim da influência da alimentação das três populações descritas para a espécie. Em baleias migratórias, como a baleia jubarte, é conhecido que estes animais possuem fidelidade às regiões de alimentação e reprodução (Dalla-Rosa et al. 2001, Thiele et al. 2004, Zerbini et al. 2004), permitindo assim que o padrão desta composição seja explicada exclusivamente pela alimentação e não por diferenças populacionais, como afirmam Olsen e Grahl-Nielsen (2003). Zerbini et al. (2004) utilizaram a telemetria por satélite para acompanhar as rotas migratórias das baleias jubartes analisadas no litoral do Espírito Santo. As antenas de telemetria foram colocadas em 11 animais (7 fêmeas e 4 machos), sendo que

dois indivíduos foram rastreados permitindo a observação da alimentação em águas oceânicas próximas das Ilhas Geórgia do Sul e Sandwich do Sul (58° S, 26° W) após uma migração que durou de 40 a 60 dias. Estes são os primeiros dados conclusivos a respeito do destino dos animais presentes nas áreas de reprodução no litoral brasileiro, uma vez que estudos anteriores não conseguiram obter dados suficientes para identificar as rotas migratórias dos estoques presentes no Brasil (Moore et al. 1999, Rosenbaum et al. 2000, Dalla-Rosa et al. 2001, Stevick et al. 2003). A diferença encontrada neste experimento reforça os dados encontrados por Zerbini et al. (2004), sugerindo que a composição dos ácidos graxos pode determinar qual área de alimentação este animal está utilizando. Käkälä et al. (1993 e 1995) e Käkälä e Hyvärinen (1998) encontraram diferenças nas assinaturas de ácidos graxos em subespécies da foca anelada (*Phoca hispida*) que habitam diferentes ambientes como o marinho e de água doce. Beck et al. (2005) observaram que variações entre grupos podem ocorrer na foca anelada em decorrência da distribuição da espécie. Thiemann et al. (2007) demonstraram que as diferenças encontradas na composição dos ácidos graxos da foca anelada possuem diferenças significativas quando comparados demograficamente, sendo que um dos fatores que pode estar influenciando esta diferença é a distância entre os grupos. Este fato parece influenciar as diferenças encontradas por Olsen e Grahl-Nielsen (2003) para as baleias minke (*B. acutorostrata*) do Mar do Norte e do Mar da Noruega, assim como as diferenças observadas nas baleias jubarte da Antártida e Rio de Janeiro.

A coleta das biópsias na Antártida pode apresentar uma pequena variação com relação à região do corpo do animal coletado, uma vez que o tiro para coleta da amostra é realizado na região dorsal posterior dos animais, sendo que tanto a embarcação quanto os animais estão em movimento. Estes fatores podem trazer uma variação do local de coleta da biópsia no corpo do animal. Porém, para *Tursiops truncatus*, esta variação no local de coleta não foi significativa

para a composição dos ácidos graxos, como demonstrado por Samuel e Worthy (2004). Além disso, a coleta de animais encalhados na praia não é a mais indicada para este tipo de trabalho, pois a degradação dos tecidos pela oxidação e ação dos raios do sol durante o processo de decomposição podem alterar as informações obtidas para ácidos graxos. Porém, devido ao caráter aleatório desta decomposição, seria esperada uma distribuição também aleatória para os animais do RJ no dendograma realizado (figura 16). Isso pode ser uma indicação de que, apesar destas condições não ideais, o tecido ainda pode manter a composição próxima da original em virtude da dificuldade na decomposição dos lipídios presentes na camada de gordura em razão do seu volume.

A composição dos ácidos graxos da camada de gordura parece não variar de maneira importante em termos populacionais entre os diferentes estágios de crescimento, como os animais adultos e neonatos observados para os animais coletados no Rio de Janeiro. Especificamente o animal GEMM036 é um macho neonato e está agrupado com o restante dos animais coletados, demonstrando que a composição de ácidos graxos é mais semelhante entre estes animais. É conhecido que a composição dos ácidos graxos no leite de mysticetos são o reflexo da alimentação da mãe, sendo rico em ácidos graxos polinsaturados devido à sua dieta rica em zooplâncton, base da cadeia trófica (Ackman e Eaton 1966, Lauer e Backer 1969, Ackman 1980).

Como citado anteriormente, a cromatografia gasosa que utiliza hexano para a análise não é tão eficiente quanto aquela que utiliza os derivados dos ésteres de nitrogênio dos ácidos graxos associado à cromatografia gasosa (Wetzel e Reynolds 2004). Este método permitiu a identificação de 45 ácidos graxos na camada de gordura da baleia *bowhead* (*Balaena mysticetus*) em comparação com o método tradicional utilizado por aqui, através de cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (FID). Lamentavelmente o acesso

a este tipo de equipamento não foi possível resultando provavelmente na não identificação de alguns ácidos graxos, uma vez que é descrito que a análise com os derivados dos ésteres de nitrogênio permite uma melhor identificação destes ácidos com menor variação dos resultados.

Apesar dos resultados sugerirem a diferença entre a composição dos ácidos graxos, o que permite a diferenciação dos animais presentes no Estreito de Gerlache e dos animais do Rio de Janeiro, futuramente será realizada a comparação dos dados deste experimento com biópsias realizadas no litoral brasileiro a fim de permitir uma melhor caracterização da composição de lipídios na camada de gordura entre as diferentes regiões do litoral brasileiro e os animais antárticos, bem como a identificação de outros ácidos graxos. A análise dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, que complementam os dados obtidos com os ácidos graxos na identificação da região de alimentação e do nível trófico das espécies estudadas, também serão realizadas (Herman et al. 2005).





## Capítulo 2. Utilização dos ácidos graxos da camada de gordura na identificação da dieta em cetáceos

### 2.1. Introdução

Diferentes metodologias são utilizadas atualmente para identificar a ecologia alimentar em mamíferos marinhos como a observação direta (Caon e Ott 2000), a análise do conteúdo estomacal (Basso 1997) e a assinatura de ácidos graxos (Hooker et al. 2001, Herman et al. 2005, Walton et al. 2007). Estes dados são importantes para uma melhor compreensão a respeito da distribuição, utilização do habitat, sazonalidade e ecologia destes animais (Iverson 1995). Além disso, perceber as variações da dieta e condição corporal apresentadas por estes animais ao longo de seu ciclo de vida e as variações do aporte energético conforme o crescimento, distribuição, sexo e abundância de presas, são de grande importância para o entendimento de vários aspectos do ciclo de vida dos cetáceos (Iverson 1997).

A qualidade das informações obtidas por estas metodologias, no entanto, esbarram em suas limitações técnicas, apresentando uma variação na qualidade e utilização dos resultados

obtidos. A seguir, serão descritas as principais metodologias utilizadas para este fim em mamíferos marinhos.

### 2.1.1. Metodologias utilizadas para identificação da ecologia alimentar

#### 2.1.1.1. Observação direta

Em várias espécies de mamíferos marinhos é possível observar diretamente na natureza os peixes, cefalópodes e crustáceos predados por cetáceos, desde a procura pela presa, sua captura e ingestão. Caon e Ott (2000), por exemplo, observaram os grupos de *Tursiops truncatus* presentes no Arquipélago de São Pedro e São Paulo (00°55'N, 029°20'W) se alimentando em duas oportunidades de peixes-voadores (Família Exocoetidae) e peixes-agulha (Família Hemiramphidae). Estas populações oceânicas dificilmente encalham em praias ou podem ser encontrados mortos para a coleta do estômago e as observações ocasionais são úteis para identificar a dieta nestas situações.

A observação direta da dieta em mamíferos marinhos é difícil, uma vez que muitas espécies habitam áreas remotas na maior parte do tempo, sendo o acesso à essas áreas igualmente dificultadas. Espécies como a cachalote (*Physeter macrocephalus*) e os da família Ziphiidae (baleias de bico) se alimentam exclusivamente de cefalópodes a grandes profundidades impedindo esta observação (Bastida et al. 2007). Assim, usualmente os estudos sobre alimentação utilizam metodologias indiretas para este fim.

#### 2.1.1.2. Conteúdo estomacal

Várias espécies de cetáceos encalham mortos nas praias de todo o mundo. Este fato permite uma oportunidade única para o entendimento da biologia destas espécies, incluindo a ecologia alimentar através da coleta dos estômagos e intestinos. Eventualmente é possível

coletar do estômago diretamente os itens alimentares ainda inteiros ou não completamente digeridos. Porém, usualmente apenas algumas estruturas mais resistentes permanecem no estômago ainda não digeridas. Estas estruturas presentes em peixes, crustáceos e cefalópodes, são formados por substâncias que não são digeridas facilmente, como as estruturas queratinosas, ossos ou cristalinos. Por isso, a maneira mais comum de identificar a alimentação em cetáceos é a análise do conteúdo estomacal ou do intestino. Em espécies piscívoras os otólitos (uma das partes de carbonato de cálcio do *sacullus* do ouvido interno envolvido com a percepção da aceleração e da gravidade localizado na cabeça dos peixes [figura 18]), principalmente o otólito *sagittae*, permitem identificar não só a espécie predada, como também o seu comprimento e peso através de equações de regressão (Pinedo 1982, Ott 1996, Bassoi 1997, Oliveira et al. 1998, Schmiegelow 1990, Di Benedetto 2000).

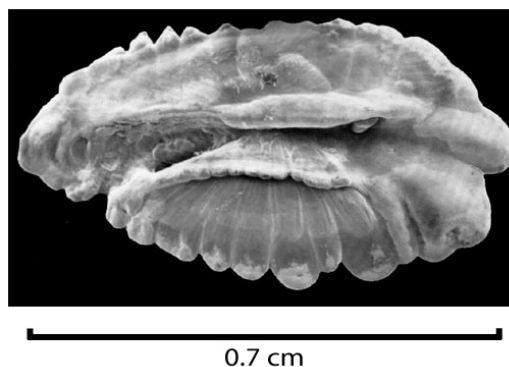


Figura 18. Exemplo de otólito de peixe. (foto: cortesia da *Australian Antarctic Division* © *Commonwealth of Australia* 2006).

Cefalópodes possuem um bico córneo queratinoso na região da boca que auxilia na maceração do seu alimento. Quando predados, estas estruturas se mantêm por longos períodos no estômago de cetáceos. Como os otólitos, o formato e o tamanho dos bicos permitem a identificação da espécie devido à íntima relação existente entre o tamanho do bico e do otólito

com a massa e o comprimento da presa (Santos e Haimovici 2001). Outros invertebrados, como crustáceos, ainda podem deixar restos do exoesqueleto ou de conchas. Estas informações são importantes pois vários dos estudos realizados atualmente visam obter informações a respeito da biomassa e ingestão de energia associados com o consumo das presas (Berta e Sumich 1999).

Esta técnica, apesar de muito empregada, possui limitações importantes. Os otólitos, por exemplo, só estarão presentes no estômago se os animais consumirem a cabeça dos peixes. A informação obtida pelas partes resistentes à digestão refletem apenas as espécies predadas em um curto período de tempo. Alguns itens, como os bicos de lula, podem ficar indefinidamente no estômago dos animais devido ao seu formato. Além disso, alguns dos otólitos e bicos de lula podem ser oriundos da alimentação dos peixes predados pelos mamíferos marinhos superestimando os itens encontrados no conteúdo estomacal (Dellinger e Trillmich 1988, Pierce et al. 1993).

O tempo de permanência no estômago também é importante em virtude do desgaste sofrido pelos ácidos responsáveis pela digestão, impedindo a utilização das informações ali contidas e subestimando a ingestão de presas. Alguns dos otólitos como o do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) é digerido rapidamente e dificilmente são encontrados no estômago de seus predadores (Boyle et al. 1990).

#### 2.1.1.3. Isótopos estáveis

A utilização de isótopos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) presente em vários tecidos animais podem ser úteis na identificação da dieta em mamíferos marinhos. A meia-vida destes isótopos no músculo, por exemplo, é de aproximadamente 27 dias (Tieszen et al.

1983), não dependendo de partes identificáveis de peixes como na análise do conteúdo estomacal.

O  $\delta^{15}\text{N}$  é um bom indicador do nível trófico do predador, uma vez que a composição natural encontrada nos tecidos é de 3 a 4% maior que o encontrado em sua dieta. Conforme este animal ocupa um lugar mais no topo da cadeia alimentar, maior será esta porcentagem. Em contrapartida, o  $\delta^{13}\text{C}$  não pode ser usado para este fim, porém sua concentração possui variação geográfica permitindo indicar os locais de alimentação (Wada et al. 1987, Fry 1988, Schell et al. 1989).

Para o estudo do forrageamento em mamíferos marinhos geralmente é utilizado o músculo, mas também a pele e a gordura podem ser usados para este fim. Apesar de permitir o acesso a dados sobre nível trófico e variação geográfica, esta metodologia não permite identificar ou quantificar as presas destes animais sendo recomendada a utilização de mais de uma metodologia para melhor compreender os resultados obtidos (Herman et al. 2005).

#### 2.1.1.4. Ácidos graxos

Os ácidos graxos são incorporados na camada de gordura através da ingestão dos alimentos sem quebra durante a digestão. A composição dos ácidos graxos, ou assinaturas de ácidos graxos como definido por Iverson et al. (1995), depende diretamente do alimento consumido. Nos organismos marinhos é comum a presença de uma grande variedade de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (Ackman e Eaton 1966, Ackman 1980). A comparação da composição destes ácidos na camada de gordura com a composição das presas demonstraram-se satisfatórias na identificação dos itens alimentares ou de variações da dieta (Iverson et al. 1995, 1997 e 2001, Hooker et al. 2001).

Existem duas abordagens distintas para esta metodologia. Na primeira, ácidos graxos raros podem ser usados como traçadores para certas espécies de presa. Por exemplo, a dieta do peixe-lua (*Mola mola*) sobre cnidários baseada na presença do ácido 6-trans- hexadecanóico (16:1n6t) foi verificada por Hooper et al. (1973). Porém a grande maioria dos trabalhos caracterizam tanto a composição de ácidos graxos do predador quanto da presa, comparando-os através de estatística multivariada (PCA, CCA, cluster). Estes trabalhos geralmente são qualitativos (Iverson et al. 2001, 2002, Budge et al. 2002), porém estudos trazem nova luz para a utilização desta metodologia também quantitativamente (Budge e Iverson 2003, Iverson 2004). Como os ácidos graxos encontrados na camada de gordura representam o alimento ingerido desde logo após a digestão até alguns meses, esta metodologia permite avaliar a dieta em períodos maiores do que aqueles obtidos através do conteúdo estomacal, que são o retrato de apenas um curto período de tempo (Iverson 1997).

Esta metodologia permite ainda a identificação da dieta de animais pelágicos, que dificilmente encaham em praias dificultando o acesso aos dados sobre sua ecologia alimentar. Assim, populações oceânicas, como por exemplo *T. truncatus* no Arquipélago de São Pedro e São Paulo (Caon e Ott 2000 e 2001), podem ter sua dieta analisada através de biópsias do tecido adiposo em conjunto com a coleta das possíveis presas da espécie nesta região.

## 2.2. Experimento 3: Identificação da composição dos ácidos graxos presentes na camada de gordura do boto (*Tursiops truncatus*) na Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, e sua relação com a dieta.

**Glauco Caon**

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC),  
Departamento de Fisiologia, ICBS/UFRGS, Porto Alegre, RS.

**Pedro Fruet**

Laboratório de Mamíferos Marinhos, Museu Oceanográfico "Prof. Eliézer C. Rios", Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

**Munir Mehse**

Laboratório de Mamíferos Marinhos, Museu Oceanográfico "Prof. Eliézer C. Rios", Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

**Luiz C. Kucharski**

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC),  
Departamento de Fisiologia, ICBS/UFRGS, Porto Alegre, RS.

### 2.2.1. Resumo

Atualmente diferentes metodologias são utilizadas para identificar a ecologia alimentar de mamíferos marinhos. A utilização das assinaturas de ácidos graxos para comparação entre predador e presa vem trazendo importantes resultados para este fim. A dieta de *T. truncatus* foi analisada comparando a assinatura de ácidos graxos da camada de gordura de animais encontrados encalhados com os ácidos graxos encontrados em espécies de peixes presente em sua dieta. Peixes de 6 diferentes espécies *Macrodon ancylodon* (n= 1), *Micropogonias furnieri* (n= 4), *Mugil brasiliensis* (n= 3), *Odontesthes argentinensis* (n= 1), *Paralonchurus brasiliensis* (n= 2) e *Trichiurus lepturus* (n= 1) foram analisados, sendo todos observados anteriormente em trabalhos sobre a dieta de *Tursiops* no litoral sul do Rio Grande do Sul. Os peixes analisados apresentaram diferentes comprimentos totais e foram comparadas com amostras da camada interna (n= 9) e externa (n= 10) de 10 botos. A gordura dos peixes foi extraída das vísceras, pele e músculo dos peixes para comparação com a assinatura de ácidos graxos presentes na camada de gordura dos botos. Para esta comparação foram utilizados métodos estatísticos multivariados (dendograma e PCA). Foram identificados os ácidos graxos 14:0, 15:0, 15:1, 16:0, 16:1, 16:1n7, 16:2n4, 16:3n4, 17:0, 17:1, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, 18:1n9t, 18:1n9c, 18:2n6, 18:3n4, 18:3n3, 18:4n3, 20:0, 20:1n9, 20:4n6, 20:4n3, 20:5n3, 22:0 e 24:1. Não foram encontradas diferenças significativas na composição da camada interna e externa dos botos. Porém os ácidos graxos 14:0, 16:1n7, 16:2n4, 18:1n9 e 18:2n6 apresentaram diferença entre os peixes e as camadas de gordura. O PCA e o dendograma demonstraram a formação de dois grupos incluindo os botos e os itens alimentares, corroborando os dados encontrados em estudos anteriores. A única exceção foi o peixe-espada, *Trichiurus lepturus*, que ficou isolado dos dois grupos de botos e itens alimentares no PCA. Isso se deve provavelmente ao fato do comprimento do animal analisado ser de 76,50 cm, enquanto os botos se alimentam de animais que variam de 16 a 20 cm desta espécie. Os dados aqui apresentados reforçam que esta metodologia permite acessar a dieta através da camada de gordura em *T. truncatus* utilizando as assinaturas de ácidos graxos.

Palavras-chave: golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, dieta, ácidos graxos, camada de gordura, Brasil.



## 2.2.2. Introdução

### 2.2.2.1. O golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus* (Montagu 1821)

O golfinho-nariz-de-garrafa é um odontocetáceo da família Delphinidae que atinge aproximadamente 3,5 metros de comprimento (figura 19). Possui coloração acinzentada, mais claro no ventre e escuro no dorso possuindo variações regionais. O rostro curto e largo dá origem ao nome popular ‘golfinho-nariz-de-garrafa’, comumente utilizado pelos países de língua inglesa. No sul do Brasil a espécie possui ainda a denominação de ‘boto’ ou ‘caldeirão’. Existem populações costeiras ao longo de todos os continentes e ao redor da maioria das ilhas e atóis oceânicos. É comumente observado em águas próximas à costa ao longo do litoral brasileiro (Bastida et al. 2007). Eventualmente grupos são observados durante expedições científicas em águas oceânicas. Em algumas regiões esta espécie entra em baías, estuários e regiões de jusante de rios a procura de alimento. No Rio Grande do Sul estes animais são constantemente observados nas barras dos rios Mampituba, Tramandaí e da Lagoa dos Patos (Rio Grande) (Simões-Lopes 1991, Tabajara 1992, Hoffman 1995).

A espécie possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os oceanos tropicais e temperados do planeta. Exceto por sua ocorrência ao redor da Inglaterra e norte da Europa, esta espécie não ocorre em latitudes menores que 45° em nenhum dos hemisférios (Jefferson et al. 1993). Ocupa uma larga variedade de habitats e é provavelmente a espécie de cetáceo mais adaptada a diferentes condições ambientais, disponibilidade de alimento e ao cativeiro. Existem populações pelágicas, inclusive residentes, localizadas distante da costa, como no Arquipélago de São Pedro e São Paulo (00°56’N, 029°22’W)(Caon e Ott 2000, 2001). A presença de *T. truncatus* em águas oceânicas no Brasil foi registrada também por

Dalla Rosa (1998) e Zerbini et al. (1998), entre 23° e 27°S, por Sampaio e Reis (1998) em 12°57'S e por Skaf e Secchi (1994) no Atol das Rocas (3°45'S).



Figura 19. Golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*)(Arquipélago de São Pedro e São Paulo, 0°56'N, ©Glauco Caon 2005).

Esta espécie é certamente a mais conhecida de todos os cetáceos, resultado de diversos estudos desenvolvidos em cativeiro e na natureza, e tem sido utilizada para diversos estudos de comportamento e fisiologia tornando-se o principal modelo para o conhecimento dos mamíferos aquáticos (Asper et al. 1988, DeMaster e Drevenak 1988). Devido ao seu hábito quase exclusivamente costeiro, muitas vezes presente em baías e estuários, o seu estudo na natureza é relativamente fácil, comparando-o as outras espécies de mamíferos aquáticos.

Para o Brasil praticamente nada se sabe sobre as diferenças populacionais de *T. truncatus*. Barreto (2000) analisou 81 crânios de *T. truncatus*, do Brasil (n=66), Uruguai (n=6) e Argentina (n=9) para a verificação de variações morfológicas visando a definição de estoques. Para isto, realizou morfometria tradicional e análise de DNA mitocondrial, além de verificação de cicatrizes do nematódeo *Crassicauda* sp. para determinação de estoques

costeiros e oceânicos. Foi encontrada como variação latitudinal a presença de duas formas, uma com distribuição ao norte do estado de Santa Catarina, com crânios menores, e outra forma ocorrente ao sul daquele estado, com comprimentos do crânio maiores. A costa catarinense seria uma possível área de encontro das duas formas, com animais possuindo tamanhos de crânios menores que a forma norte e outros, maiores que a forma sul.

Diversos estudos morfológicos e fisiológicos reforçam a hipótese da existência de dois ecotipos, um costeiro e outro oceânico (Hersh e Duffield 1990, Ross 1977, Van Waerebeek et al. 1990, Walker 1981, Herman et al. 2005). A espécie não realiza migrações, mas deslocamentos para áreas de alimentação que inclui as barras dos rios, principalmente para os animais do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. No Rio Grande do Sul é possível observar estes animais nas barras do Rio Mampituba (Torres), Rio Tramandaí (Tramandaí), Lagoa dos Patos (Rio Grande). Os animais utilizam estes locais como áreas de alimentação, predando a tainha (*Mugil* sp.), a corvina-branca (*Micropogonias furnieri*), o peixe-espada (*Trichiurus lepturus*), a maria-luíza (*Paralonchurus brasiliensis*), entre outros (Mehsen et al. 2005). A presença de *T. truncatus* nestas regiões possibilita o acompanhamento dos animais por fotoidentificação, já sendo relatada a presença de um mesmo animal em diferentes barras de rio (Simões-Lopes 1991). O número total de indivíduos no Rio grande do Sul não é conhecido, mas estima-se que sejam aproximadamente 88 animais na Lagoa dos Patos (Dalla-Rosa et al. 2000), 10 no Rio Tramandaí (Hoffman 1997). Apesar destas informações a respeito do número de indivíduos em populações isoladas (Simões-Lopes 1995, Hoffman 1997, Dalla Rosa 1999), no litoral brasileiro o tamanho e *status* populacional da espécie são desconhecidos. Curiosamente o golfinho-nariz-de-garrafa é a espécie com provavelmente o maior número de publicações mundialmente. Apesar da ampla distribuição da espécie, essas

populações locais, com número relativamente baixo de indivíduos e alto grau de residência, são particularmente suscetíveis ao impacto de ações antrópicas.

É considerada como ‘dados insuficientes’ nas listas da IUCN (2006) para categorias de conservação, mesma classificação adotada pelo Plano de Ação para os Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA 2001), que define como prioridades de estudo para a espécie o conhecimento de seus parâmetros biológicos, incluindo biologia reprodutiva, curva de crescimento, hábitos alimentares, níveis de contaminantes, estudos fisiológicos e ecologia populacional.

### 2.2.3. Objetivo

Identificar os ácidos graxos do golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, utilizando a camada de gordura de animais provenientes de encalhe.

#### 2.2.3.1. Objetivos específicos

- Identificar qualitativamente os ácidos graxos da camada de gordura do golfinho-nariz-de-garrafa e das presas identificadas na dieta destes animais;
- Comparar os resultados obtidos com outras metodologias tradicionais utilizadas para identificar a dieta da espécie.

### 2.2.4. Método

#### 2.2.4.1. Coleta das amostras

O tecido adiposo dos botos utilizados neste experimento foi coletado utilizando animais encalhados mortos na praia (tabela 6). Os animais encalhados foram coletados através

de monitoramento sistemático do litoral sul do Rio Grande do Sul pelo Laboratório de Mamíferos Marinhos, Museu ‘Prof. Eliézer C. Rios’ da Fundação Universidade de Rio Grande, com veículo adaptado para a praia. O comprimento total dos animais encontrados foi medido com fita métrica, sexados sempre que possível, e uma amostra da camada de gordura foi coletada desde a pele até a musculatura adjacente, independentemente do estado de conservação dos animais. Esta amostra foi identificada com o número de campo, embalada em papel alumínio e armazenada em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Além disso, os estômagos foram coletados para trabalho de identificação das presas preferenciais do boto através do conteúdo estomacal, trabalho publicado por Mehseu et al. (2005) e utilizado para comparação com os resultados aqui obtidos.

Tabela 7. Indivíduos de *T. truncatus* coletados encalhados no litoral do Rio Grande do Sul utilizados neste trabalho.

<b>Código</b>	<b>No. de Campo (<i>T. truncatus</i>)</b>	<b>Tipo de Tecido</b>	<b>Data de Coleta</b>	<b>CT (cm)</b>	<b>Sexo</b>
<b>TT1</b>	LMM-P#1	camada externa	16/03/06	n.i.	F
<b>TT2</b>	LMM-P#1	camada interna			
<b>TT3</b>	LMM-P#2	camada externa	n.i.	312,0	n.i.
<b>TT4</b>	LMM-P#2	camada interna			
<b>TT5</b>	LMM-P#3	camada externa	27/01/05	258,0	n.i.
<b>TT6</b>	LMM-P#4	camada interna	11/01/02	280,0	M
<b>TT7</b>	LMM-P#4	camada externa			
<b>TT8</b>	LMM-P#5	camada externa	05/05/06	146,0	M
<b>TT9</b>	LMM-P#5	camada interna			
<b>TT10</b>	LMM-P#6	camada externa	24/11/02	n.i.	F
<b>TT11</b>	LMM-P#6	camada interna			
<b>TT12</b>	LMM-P#7	camada externa	16/08/02	n.i.	n.i.
<b>TT13</b>	LMM-P#7	camada interna			
<b>TT14</b>	LMM-P#8	camada externa	21/08/02	n.i.	n.i.
<b>TT15</b>	LMM-P#8	camada interna			
<b>TT16</b>	LMM-P#9	camada externa	16/10/05	280,0	F
<b>TT17</b>	LMM-P#9	camada interna			
<b>TT18</b>	LMM-P#10	camada externa	03/03/05	n.i.	n.i.
<b>TT19</b>	LMM-P#10	camada interna			

M= machos; F= fêmeas; CT= comprimento total; n.i.= não identificado.

Os espécimens que compõem os principais itens alimentares da dieta de *T. truncatus* foram cedidos e identificados pelo Laboratório de Ictiologia da FURG, ou comprados diretamente dos pescadores nos comprimentos próximos daqueles encontrados no estômago por Mehsen et al. (2005). Os dados dos peixes analisados podem ser encontrados na tabela 7. As vísceras inteiras e uma fração da musculatura e pele foram utilizadas na extração dos ácidos graxos pois nestas regiões está armazenada a reserva lipídica. Após pesados e identificados, estes tecidos coletados foram embalados em papel alumínio e congelados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 8. Espécies de peixes que compõem a alimentação de *T. truncatus* analisados neste trabalho.

Amostra	Espécie	Nome Comum	CT (cm)
<b>P24</b>	<i>Macrondon ancylodon</i>	pescadinha	26,4
<b>P4</b>	<i>Micropogonias furnieri</i>	corvina	15,0
<b>P9</b>	<i>Micropogonias furnieri</i>	corvina	20,0
<b>P10</b>	<i>Micropogonias furnieri</i>	corvina	25,0
<b>P15</b>	<i>Micropogonias furnieri</i>	corvina	21,0
<b>P3</b>	<i>Mugil brasiliensis</i>	tainha	16,7
<b>P7</b>	<i>Mugil brasiliensis</i>	tainha	21,8
<b>P8</b>	<i>Mugil brasiliensis</i>	tainha	21,7
<b>P5</b>	<i>Odontesthes argentinensis</i>	peixe-rei	15,8
<b>P6</b>	<i>Paralonchurus brasiliensis</i>	maria-luíza	12,5
<b>P17</b>	<i>Paralonchurus brasiliensis</i>	maria-luíza	14,8
<b>P14</b>	<i>Trichiurus lepturus</i>	peixe espada	76,5

CT= comprimento total.

Os lipídios totais das amostras de encalhe dos botos, bem como dos peixes, foram extraídos através de clorofórmio-metanol (2:1) segundo Folch et al. (1957) como descrito no item 1.3.4.2. do experimento 1.

Sempre que possível a camada de gordura dos animais encalhados foi separada em duas para a análise. A primeira, mais externa e adjacente à pele, está normalmente relacionada

com a manutenção da temperatura corporal pelo isolamento que produz, evitando a perda de calor para o meio externo. A segunda, mais interna, próxima da musculatura, é citada na literatura como tendo uma característica de ser uma fonte de lipídios utilizados para obtenção de energia pelo metabolismo (Hamilton et al. 2004). Esta diferença de funções pode causar diferenças também na composição de ácidos graxos e, por isso, é importante a comparação das camadas externa e interna separadamente. Após a extração dos lipídios totais, 10 µl da gordura obtida foram metiladas com triflureto de boro (BF<sub>3</sub>) como descrito no item 1.3.4.3. do experimento 1.

A análise estatística foi realizada através de cluster conforme descrito no item 1.3.4.4. do experimento 1. A matriz de cálculo foi realizada com os 47 tempos de retenção e ácidos graxos identificados nas amostras da camada de gordura do boto (n= 19) e peixes (n=12). Além do dendograma, foi utilizado o teste-t de Student, ANOVA de uma via e a análise de componentes principais (PCA).

## 2.2.5. Resultados

Foram identificados os ácidos graxos 14:0, 15:0, 15:1, 16:0, 16:1, 16:1n7, 16:2n4, 16:3n4, 17:0, 17:1, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, 18:1n9t, 18:1n9c, 18:2n6, 18:3n4, 18:3n3, 18:4n3, 20:0, 20:1n9, 20:4n6, 20:4n3, 20:5n3, 22:0 e 24:1 nas camadas interna e externa do boto (*T. truncatus*) (figura 20). O ácido graxo com maior concentração nas camadas interna e externa foi o 16:1n-7, seguido do 18:0 e do 17:1. As porcentagens encontradas podem ser observadas na tabela 9 com suas respectivas médias, desvios padrão e número amostral. Apenas o ácido palmitoléico (16:1) apresentou diferença significativa entre as camadas interna e externa (P=

0,049). Ácidos graxos monoinsaturados apresentaram a maior concentração na camada interna e externa, com os saturados possuindo a segunda maior concentração.

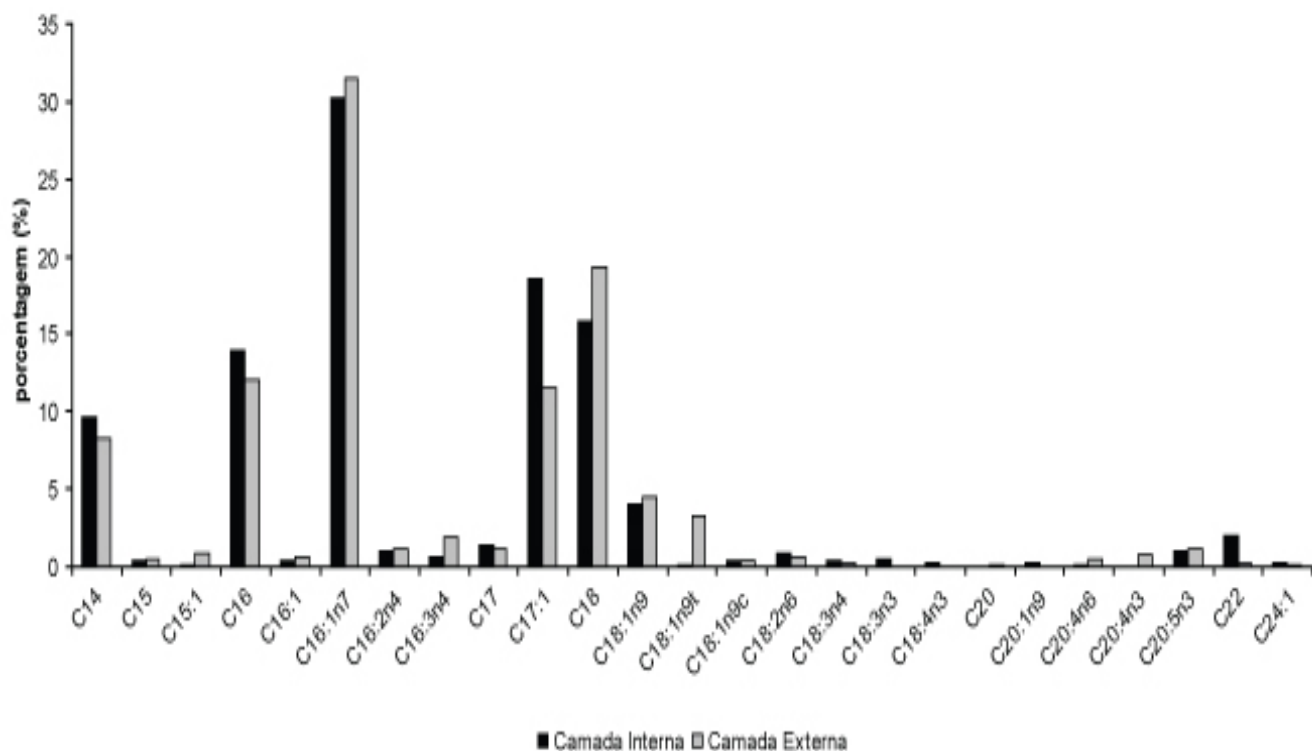


Figura 20. Porcentagem dos ácidos graxos identificados na camada interna e externa do boto (*T. truncatus*).

Tabela 9. Porcentagem dos ácidos graxos identificados nas camadas interna e externa de gordura do boto (*T. truncatus*).

AG	Camada Interna*	Camada Externa*	P
14:0	9,63 ± 2,38 (6)	8,25 ± 1,68 (7)	0,247
15:0	0,35 ± 0,19 (4)	0,47 ± 0,15 (4)	0,360
15:1	0,15 ± 0,01 (2)	0,86 ± 1,01 (2)	0,425
16:0	13,90 ± 4,91 (6)	12,09 ± 4,59 (7)	0,507
16:1	0,33 ± 0,22 (2)	0,63 ± 0,13 (6)	0,049**
16:1n-7	28,24 ± 9,07 (3)	27,46 ± 8,75 (3)	0,920
16:2n-4	0,95 ± 0,39 (4)	1,09 ± 0,80 (3)	0,768
16:3n-4	0,60 (1)	1,89 (1)	-
17:0	1,34 ± 0,54 (3)	1,10 ± 0,33 (6)	0,426



17:1	17,54 ± 12,16 (5)	10,55 ± 2,88 (6)	0,202
18:0	14,75 ± 5,48 (4)	18,30 ± 1,94 (6)	0,174
18:1n-9	4,02 ± 0,53 (4)	4,45 ± 0,81 (3)	0,430
18:1n-9c	0,39 ± 0,10 (6)	0,43 ± 0,22 (7)	0,691
18:1n-9t	0,14 ± 0,02 (2)	3,25 ± 4,51 (2)	0,432
18:1n-7	n.d.	4,22 (1)	-
18:2n-6	0,90 ± 0,39 (3)	0,59 ± 0,11 (4)	0,181
18:3n-4	0,32 ± 0,08 (2)	0,28 (1)	-
18:3n-3	0,44 ± 0,03 (2)	n.d.	-
18:4n-3	0,22 (1)	n.d.	-
20:0	n.d.	0,14 ± 0,07 (2)	-
20:1n-9	0,19 (1)	n.d.	-
20:4n-6 (AA)	0,18 (1)	0,53 (1)	-
20:4n-3	n.d.	0,91 (1)	-
20:5n-3 (EPA)	1,01 ± 1,19 (4)	1,09 ± 0,51 (6)	0,885
22:0	2,04 ± 3,17 (4)	0,24 (1)	-
24:1	0,29 (1)	0,12 ± 0,09 (2)	-
Σsaturados	43,01	41,59	
Σmonoinsaturados	51,29	51,97	
ΣPUFAs	4,62	6,38	
Σn-3	1,67	2,00	
Σn-6	1,08	1,12	
n-6/n-3	0,65	0,56	
AA/EPA	0,18	0,49	

\*os dados são representados como média ± desvio padrão; número amostral entre parênteses;

\*\* diferença significativa (P<0.05);

n.d.= não detectado.

Os ácidos graxos dos peixes estão representados na tabela 10. Foi observada a presença de ácidos saturados em maior concentração que monoinsaturados, e de monoinsaturados em comparação aos polinsaturados. Em contrapartida, quando as camadas interna e externa da camada de gordura dos botos foi comparada com os ácidos graxos identificados nos peixes (tabela 11), os ácidos graxos 14:0, 16:0 e 16:1n-7 apresentaram diferença entre os peixes e as camadas interna e externa, enquanto apenas o ácido 18:0 apresentou diferença quando comparado com a camada externa. Os ácidos 18:1n-7 e 18:1n-9 não apresentaram diferença significativa ao comparar os ácidos graxos presentes na camada externa.

Tabela 10. Ácidos graxos presentes nos peixes presentes na dieta de *T. truncatus* para o litoral sul do Rio Grande do Sul.

AG	Peixe-espada ( <i>Trichiurus lepturus</i> )	Pescadinha ( <i>Macrodon ancylodon</i> )	Corvina ( <i>Micropogonias furnieri</i> )	Tainha ( <i>Mugil brasiliensis</i> )	Maria-Luiza ( <i>Paralonchurus brasiliensis</i> )	Peixe-rei ( <i>Odontesthes argentinensis</i> )
14:0	1,02 (1)	n.d.	2,84 ± 0,33 (3)	3,89 ± 1,01 (3)	3,29 (1)	2,26 (1)
16:0	10,23 (1)	23,66 (1)	32,46 ± 10,55 (4)	39,50 ± 11,32 (3)	25,49 ± 4,95 (2)	15,99 (1)
16:1n-7	6,69 (1)	3,54 (1)	2,91 (1)	n.d.	3,30 (1)	n.d.
16:2n-4	n.d.	n.d.	0,70 ± 0,30 (4)	0,83 ± 0,18 (3)	0,90 ± 0,45 (2)	0,30 (1)
18:0	5,29 (1)	7,61 (1)	13,39 ± 4,84 (4)	17,65 ± 9,02 (3)	6,07 ± 3,51 (2)	4,65 (1)
18:1n-7	n.d.	1,98 (1)	n.d.	2,36 (1)	2,30 (1)	n.d.
18:1n-9	n.d.	12,11 (1)	2,86 ± 1,06 (4)	4,58 ± 1,37 (3)	6,07 ± 3,51 (2)	n.d.
18:2n-6	n.d.	n.d.	0,71 ± 0,44 (2)	0,74 ± 0,12 (3)	1,46 (1)	0,30 (1)
18:3n-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,29 (1)	n.d.
20:1n-9	n.d.	n.d.	0,06 (1)	n.d.	0,44 (1)	n.d.
20:4n-6 (AA)	n.d.	0,70 (1)	n.d.	n.d.	1,08 (1)	n.d.
20:4n-3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,47 (1)	n.d.
20:5n-3 (EPA)	n.d.	0,70 (1)	0,16 (1)	n.d.	0,26 (1)	n.d.
Σ saturados	16,54	31,27	48,69	61,04	34,85	22,9
Σ monoinsaturados	6,69	17,63	5,77	6,94	5,6	n.d.
Σ polinsaturados	n.d.	1,40	1,57	1,57	8,46	0,60
Σ n-3	n.d.	0,70	0,16	n.d.	2,73	n.d.
Σ n-6	n.d.	0,70	0,71	0,74	2,56	0,30
n-6/n-3	n.d.	1,00	4,44	n.d.	0,94	n.d.
AA/EPA	n.d.	1,00	n.d.	n.d.	4,15	n.d.

\*os dados são representados como média ± desvio padrão; número amostral entre parênteses;

n.d.= não detectados.

Tabela 11. Variação de significância estatística (P) através do teste-t de Student entre as porcentagens dos ácidos graxos identificados nos peixes e os ácidos graxos identificados na camada de gordura interna e externa dos botos (*T. truncatus*).

Ácidos graxos	Peixes x camada interna	Peixes x Camada Externa
14:0	<0.001	<0.001
16:0	0.012	0.003
16:1n-7	0.002	0.001
16:2n-4	0.481	0.812
18:0	0.407	0.028

18:1n-7	0.535	0.742
18:1n-9	0.642	0.399

A razão entre o ácido aracdônico (AA) e o ácido eicosapentanóico (EPA) e dos ácidos n-6 e n-3 (n6/n-3) podem ser utilizados para estabelecer uma correspondência entre as razões na camada de gordura de golfinhos associadas aos seus respectivos itens alimentares. Em *T. truncatus*, a razão AA/EPA variou entre 0.21 na camada interna e 0.49 na camada externa, enquanto nos peixes esta razão foi de 1.00 a 4.15. Em decorrência da não identificação destes ácidos graxos em todas as presas aqui estudadas, apenas duas espécies de peixe puderam ser avaliadas, a pescadinha (*Macrodon ancylodon*) e a maria-luíza (*Paralonchurus brasiliensis*). A razão n6/n-3 foi de 0.76 na camada interna e de 1.11 na camada externa, enquanto nos peixes a pescadinha (*Macrodon ancylodon*) apresentou 1.00, a corvina (*Micropogonias furnieri*) apresentou 4.44, e a Maria-Luíza (*Paralonchurus brasiliensis*) apresentou uma razão de 0.94.

O dendograma (figura 21) apresentou dois agrupamentos distintos, um formado pelas amostras TT16 e TT17, que são respectivamente a camada externa e interna do boto LMM-P#9, e os peixes P14 (*Trichiurus lepturus*), P15 (*Micropogonias furnieri*), P17 (*Paralonchurus brasiliensis*) e P24 (*Macrodon ancylodon*), enquanto outro grupo foi formado pelos outros botos e peixes analisados. Este grupo possui ainda dois subgrupos, um formado apenas pelos botos, e outro formado pelos peixes, demonstrando algum grau de diferenciação entre a assinatura de ácidos graxos destas amostras. Apenas a amostra TT15, da camada interna do animal LMM-P#8, foi incluída no grupo formado pelos peixes, demonstrando uma composição mais próxima à destes animais.

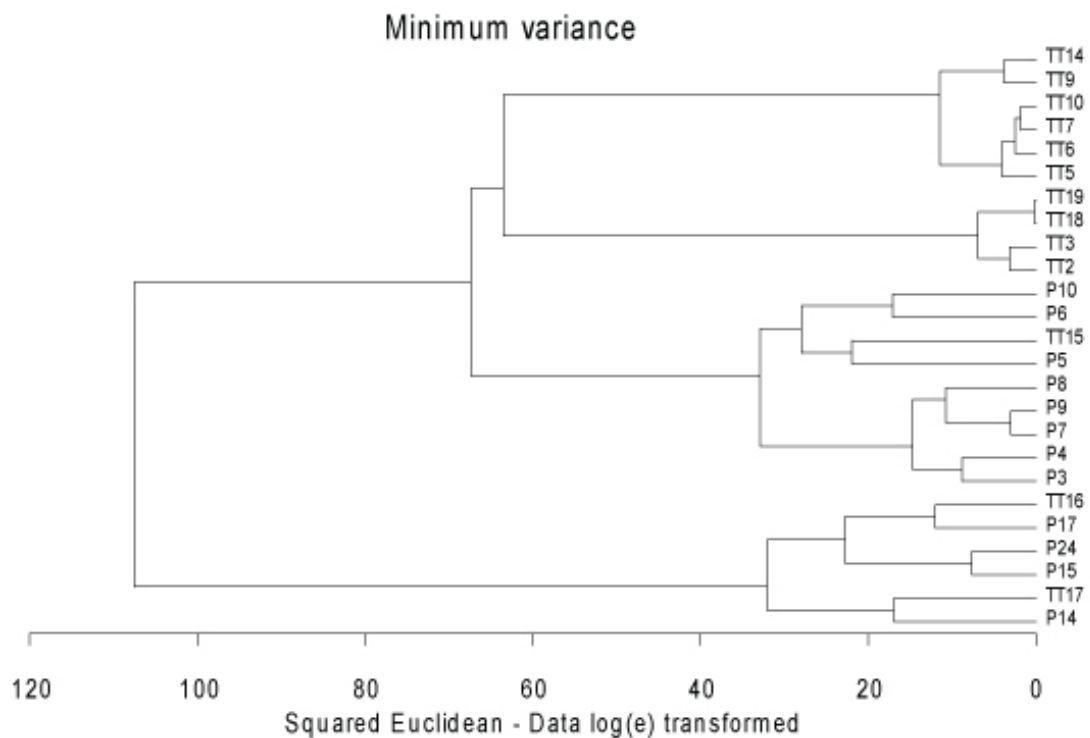


Figura 21. Dendrograma da composição dos ácidos graxos presentes na camada de gordura dos botos (TT) identificados na tabela 7 e das vísceras, músculo e pele dos peixes (P) identificados na tabela 8.

O PCA demonstrou três grupos distintos (figura 22). Um formado pelo peixe P14 (*Trichiurus lepturus*), mais isolado, outro formado pelas amostras TT16 e TT17, respectivamente a camada externa e interna do boto LMM-P#9 e os peixes P15 (*Micropogonias furnieri*), P17 (*Paralichthys brasiliensis*) e P24 (*Macrodon ancylodon*), e um terceiro aproximando todas as outras amostras dos botos e peixes analisados.

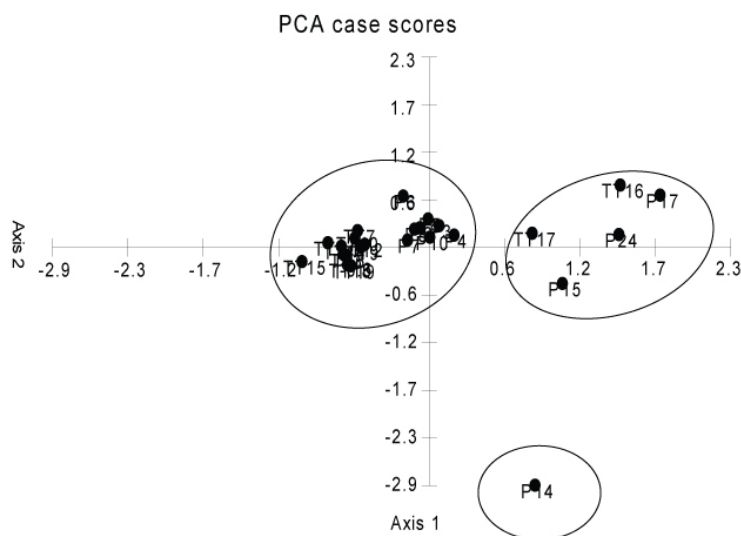


Figura 22. Análise de componentes principais (PCA) realizado utilizando a composição dos ácidos graxos presentes na camada de gordura dos botos (TT) e das vísceras, músculo e pele dos peixes (P). O primeiro eixo (Axis 1) representa 45.82% da distribuição dos pontos e o segundo (Axis 2) representa 10.69%, totalizando 56.51% da dispersão dos pontos.

## 2.2.6. Discussão

Apesar da menor quantidade de ácidos graxos identificados neste experimento ( $n=26$ ), os mesmos foram semelhantes àqueles encontrados por Walton et al. (2007) para os botos (*T. truncatus*) biopsiados nos Açores ( $n=47$ ). O ácido behênico 22:0 foi identificado apenas nos animais do Rio Grande do Sul, em comparação com os animais dos Açores, porém nos animais analisados por Walton et al. (2007) os ácidos graxos 14:0, 16:0, 18:1n-9 e 20:1n-9 possuem maiores concentrações que os animais do RS. Os ácidos graxos 16:1n7, 16:2n-4 e 17:1 são encontrados em maiores concentrações nos animais do RS em comparação aos

animais dos Açores. Walton et al. (2005) também não encontrou diferenças temporais entre as coletas ou entre os sexos, sendo apenas encontrada uma diferença na composição dos ácidos graxos entre os animais coletados na ilha central e oeste. Porém, análises relacionadas à composição das camadas interna e externa não foram realizadas por Walton et al. (2007). Samuel e Worthy (2004) observaram que nos estratos interno, intermediário e externo não existe diferença da composição dos ácidos graxos, apesar de Smith e Worthy (2006) terem encontrado variações entre as concentrações de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados, e na razão entre os n-6/n-3. Estes dados são típicos de trabalhos com mamíferos marinhos que possuem uma concentração maior de polinsaturados no estrato interno e maiores concentrações de monoinsaturados em camadas externas, resultado de adaptações ao isolamento térmico às baixas temperaturas (Pond 1998).

O ácido aracdônico (AA, 20:4n-6) é o precursor de prostaglandinas 2 (PG2), tromboxanos, leucotrienos da série 4, lipoxinas, ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETE) e ácidos hidroxiperoxieicosatetraenóicos (HPETE). O ácido linoléico (18:2n-6) é o substrato para as  $\Delta$  desaturases e elongases para a formação de AA, e também está presente na camada de gordura de *P. blainvillei*. Do mesmo modo, o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3), precursor das prostaglandinas da série 3 (PG3), tromboxanos e leucotrienos da série 5, está presente na camada de gordura da franciscana, assim como o 18:3n-3, 18:4n-3 e 20:4n-3, resultados dos passos metabólicos para a síntese de EPA (experimento 1 desta tese).

A composição dos ácidos graxos presentes na camada de gordura dos botos analisados neste trabalho também foram semelhantes a outras espécies de odontocetáceos como a franciscana (experimento 1 deste trabalho, Araújo 2005), o *harbour porpoise* (Koopman et al. 1996), e orcas (*O. orca*) (Herman et al. 2005). As concentrações dos ácidos graxos apresentaram uma maior porcentagem na camada interna em comparação com a camada

externa para os ácidos 14:0, 16:0, 16:1n-7, 17:0, 17:1, 18:2n-6, 18:3n-4, 22:0 e 24:1. Já os ácidos graxos 15:0, 15:1, 16:1, 16:2n-4, 16:3n-4, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-9c, 18:1n-9t, 18:1n-7, 20:0, 20:1n-9, 20:4n-6, 20:4:n-3 apresentaram uma maior concentração na camada externa em comparação à interna. Na comparação com as espécies de peixes predadas com as camadas interna e externa de *T. truncatus*, os ácidos graxos 14:0, 16:0 e 16:1n-7 apresentaram diferença significativa na concentração para ambas camadas, enquanto o ácido graxo 18:0 apresentou diferença apenas para a camada externa do boto. Estas diferenças podem indicar a biosíntese destes ácidos ao invés da incorporação do mesmo através da dieta (Iverson 1997).

As razões AA/EPA e n-6/n-3 não foram próximas entre as camadas interna e externa de *T. truncatus* e os itens alimentares. Kälkelä e Hyvärnien (1998) encontraram razões entre AA/EPA e n-6/n-3 muito próximas entre os itens alimentares e o fígado da foca anelada (*Phoca hispida* ssp.), concluindo que sua relação é direta com a dieta. A mesma relação não foi encontrada por nós. É importante salientar que os ácidos graxos observados na camada de gordura são provenientes da síntese realizada no fígado. Portanto, esta mesma comparação deve ser realizada no fígado dos botos, o que pode elucidar possíveis relações entre as razões apresentadas por Kälkelä e Hyvärnien (1998). Além disso, apenas uma fração dos itens alimentares puderam ser analisados não sendo incluídos os cefalópodes, por exemplo, além da técnica por nós utilizada para identificação dos ácidos graxos. Como já discutido anteriormente, é conhecido que a cromatografia gasosa que utiliza hexano para a análise não é tão eficiente quanto aquela que utiliza os derivados dos ésteres de nitrogênio dos ácidos graxos associado à cromatografia gasosa (Wetzel e Reynolds III 2004). Este método permite a identificação de mais ácidos graxos em comparação com o método tradicional utilizado por aqui, através de cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (FID). Porém, as

razões encontradas para *Tursiops* (0.18-0.49) na camada de gordura é próxima daquela encontrada por Kälkelä e Hyvärnien (1998), que variou de 0.06 a 0.55.

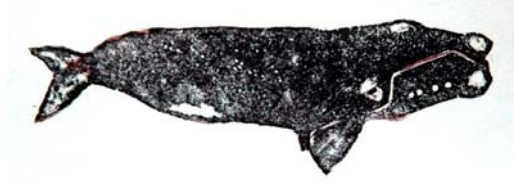
O dendograma apresentou a formação de 3 grupos distintos, sendo o primeiro formado exclusivamente pelas amostras de *Tursiops*, um segundo grupo representado quase exclusivamente pelos peixes com a exceção da amostra da camada interna de gordura TT15, e um terceiro grupo formado pelas amostras da camada de gordura interna e externa do animal LMM-P#9 e as amostras de peixes P15 (*Micropogonias furnieri*), P17 (*Paralanchurus brasiliensis*), P24 (*Macrodon ancylodon*) e P14 (*Trichiurus lepturus*). A formação destes grupos sugere que todas estas espécies façam parte da dieta de *Tursiops*. Mehse et al. (2005) encontrou apenas a presença de *Trichiurus lepturus* no estômago do boto LMM-P#9. Este fato não necessariamente implica na exclusividade da alimentação sobre esta espécie de peixe, uma vez que os ácidos graxos encontrados na camada de gordura representam a dieta desde poucas horas até alguns meses (Iverson 1993, Iverson et al. 1995, 1997, 2001). O primeiro e segundo grupos são mais próximos entre si, denotando algum grau de semelhança entre a composição dos ácidos graxos presentes na camada de gordura e nos peixes, podendo representar a predação sobre os mesmos.

A análise de componentes principais demonstrou que a formação dos três grupos podem representar as preferências alimentares dos animais analisados. O grupo formado pelas amostras TT16 e TT17, representando as camadas interna e externa do mesmo indivíduo LMM-P#9, demonstrou ser mais próximo dos peixes P#24 (*Macrodon ancylodon*, com 24,0 cm), P#15, *Micropogonias furnieri* (CT= 21,0cm) e P#17, *Paralanchurus brasiliensis* (14,8 cm). Os dados sugerem que o animal LMM-P#9 tenha se alimentado destas três espécies. Estes comprimentos totais não diferem dos outros indivíduos da mesma espécie analisadas neste experimento, com exceção da pescadinha, *Macrodon ancylodon*, onde apenas um



indivíduo foi analisado. O grupo formado pelos outros *Tursiops* e peixes analisados, sugerem que os itens alimentares dos outros botos sejam mais diversificados, envolvendo os outros peixes analisados. A exceção seria o peixe P#14, *Trichiurus lepturus*, com 76.5 cm de comprimento total (CT). Segundo Mehsen et al. (2005), os comprimentos do peixe espada consumidos pelos botos da Lagoa dos Patos varia entre 12,0 e 16,0 cm de comprimento total. Este fato pode explicar o distanciamento deste exemplar dos botos e peixes analisados, e a indicação que um animal deste comprimento não esteja incluído na dieta de *Tursiops* do litoral sul do RS. Uma vez que todos os peixes aqui analisados são encontrados na dieta de *Tursiops*, o agrupamento destas amostras corrobora que a análise das presas e da camada de gordura através da estatística multivariada como PCA são uma ferramenta viável para a identificação dos itens alimentares nestes animais.

O fato da coleta da camada de gordura ser proveniente de encalhes apresentando diferentes níveis de decomposição, bem como a inclusão de animais de ambos os sexos na análise, não parece ser um fator de diferença na composição dos ácidos graxos, uma vez que a maioria dos animais apresentou um agrupamento espacial na distribuição no PCA. Caso houvesse influência destas duas variáveis seria esperada uma distribuição aleatória sem formação de grupos. A inclusão nesta análise de dados provenientes de biópsia, bem como a inclusão de outros itens alimentares da espécie como cefalópodes (*Loligo sanpaulensis*) presente na dieta de *Tursiops* (Mehsen et al. 2005) e peixes com diferentes comprimentos são importantes para futuros estudos utilizando esta metodologia. Os resultados aqui apresentados permitem concluir que esta técnica é satisfatória para o conhecimento a respeito da ecologia alimentar no boto (*T. truncatus*) para os animais do Rio Grande do Sul.



## Capítulo 3. Gliceroneogênese em cetáceos

### 3.1. Introdução

#### 3.1.1. A via gliceroneogênica

Triglicerídios são a principal reserva de gordura no tecido adiposo. A sua síntese neste tecido é um importante meio de manutenção energética em vertebrados. O triglicerídio é formado por uma molécula de glicerol 3-fosfato ligada à três ácidos graxos (Boyer 2005). Os ácidos graxos são absorvidos diretamente dos alimentos ingeridos sem quebra durante a digestão, enquanto a glicose, maior precursor de glicerol 3-fosfato, é absorvida por animais alimentados com dieta contendo carboidratos (Ganong 2003). Os ácidos graxos são uma importante fonte de energia sendo estocados na forma de triglicerídios no tecido adiposo e fígado. Em períodos de jejum e conseqüente diminuição da glicemia, a baixa concentração de insulina desencadeia a lipólise, ou seja, a quebra do triglicerídio em ácidos graxos que são utilizados para obtenção de energia através do ciclo do ácido cítrico e o glicerol que é liberado e utilizado através da gliceroneogênese realizando a manutenção da glicemia. Portanto, o ciclo triglicerídio/ácido graxo necessita não só de ácidos graxos como também de uma fonte de glicerol 3-fosfato para a síntese de triglicerídios (Forest e Beale 2003, Forest et al. 2003).

Porém, é possível observar uma alta taxa de re-síntese de triglicerídios em mamíferos submetidos a uma dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos (Reshef et al. 2003). Nesta situação a oferta de glicose é baixa ou nula não havendo disponibilidade deste substrato para a formação do glicerol 3-fosfato. Durante o jejum, quando a lipólise no tecido adiposo é estimulada, a presença de glicose para a síntese de glicerol 3-fosfato é baixa e uma fonte alternativa de substrato para esta síntese é necessária. O glicerol liberado na lipólise tampouco pode ser reutilizado no tecido adiposo, uma vez que a expressão da glicerol quinase neste tecido é muito baixa. Ainda assim, foi observado através de técnicas de marcação utilizando compostos radioativos que 60% do total de ácidos graxos formados durante a lipólise são re-esterificados no tecido adiposo durante o jejum em humanos (Jensen et al. 2001, Kalhan et al. 2001). Se nem glicose nem glicerol estão disponíveis para a conversão em glicerol 3-fosfato para re-esterificação de ácidos graxos em triglicerídios no tecido adiposo durante o jejum, a partir de que substrato este composto é formado?

Em 1967, Ballard et al. e Reshef et al. descreveram a síntese de glicerol 3-fosfato no tecido adiposo de mamíferos através de uma versão abreviada da gliconeogênese. Esta via, denominada gliceroneogênese por Gorin et al. (1969), é a síntese *de novo* de glicose-glicerol a partir de precursores que não a glicose nem o glicerol (figura 23). A constatação da existência desta via foi possível através de trabalhos com epidídimos de rato incubados *in vitro* onde a quantidade de glicerol formado era diferente da concentração de ácidos graxos liberados no tecido adiposo durante a lipólise no jejum (Ballard et al. 1967, Reshef et al. 1967). A conclusão foi que, mesmo em jejum, os ácidos graxos que deveriam estar disponíveis para a obtenção de energia haviam sido re-esterificados em triglicerídios no tecido adiposo.

Intermediários como piruvato ou alanina são convertidos em glicerol 3-fosfato envolvendo enzimas como a piruvato carboxilase, alanina e aspartato aminotransferases e a

forma citosólica da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK-C), enzimas normalmente associadas com a gliconeogênese hepática e renal. Este processo, chamado de “ciclo fútil” por Hanson e Reshef (2003), resulta na preservação dos ácidos graxos que não foram utilizados para obtenção de energia pelo fígado e músculos através de ATP, requerido para a re-síntese do triglicerídio (Beale et al. 2002).

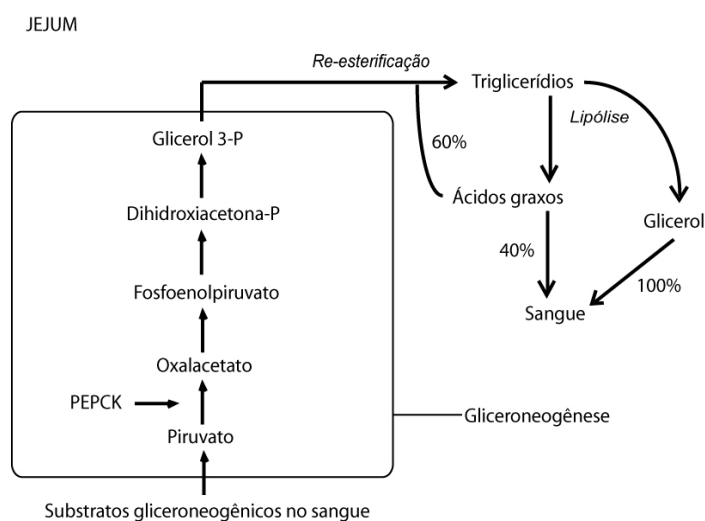


Figura 23. Representação da via gliceroneogênica no tecido adiposo (adaptado de Beale et al. 2002).

Esta afirmação está baseada em alguns fundamentos conhecidos para a atividade metabólica neste tecido. Primeiro, o tecido adiposo branco não oxida os ácidos graxos para obtenção de energia em quantidade significativa; segundo, a atividade da glicerol quinase, responsável pela transformação do glicerol em glicerol 3-fosfato (que é o composto que permite a re-esterificação dos ácidos graxos) é praticamente nula neste tecido; terceiro, os lipídios neste tecido são compostos de triglicerídios e não de mono- e diglicerídios. Além disso, é conhecido que o tecido adiposo branco não contém glicogênio suficiente para suprir a

necessidade de glicose requerida para esta re-esterificação (Beale et al. 2002, Hanson e Reshef 2003).

Logo após a descoberta desta via vários trabalhos foram publicados reforçando a sua existência, porém sua importância no ciclo triglicerídio/ácido graxo não foi considerada devido à dificuldade de comprovar *in vivo* sua relevância. Estudos recentes, porém, concluem que em mamíferos a maior fonte de glicerol 3-fosfato no tecido adiposo branco em mamíferos submetidos à uma dieta rica em proteína e em jejum é a via gliceroneogênica, estando diretamente relacionada com os mecanismos de obesidade e diabetes Tipo 2 em humanos, por exemplo (Forest e Beale 2003). Esta via parece exercer um papel importante também no fígado (Kalhan et al. 2001).

A descoberta da piruvato carboxilase e do fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK-C) no citosol do tecido adiposo branco em 1967 por Ballard et al. e a descoberta da relação entre a formação de glicose e glicerídios através de piruvato por Reshef et al. no mesmo ano permitiram a identificação das bases enzimáticas para esta via já nos primeiros estudos realizados.

Apesar de virtualmente todos os livros textos de bioquímica conterem os conceitos de ácido graxos e sua regulação no ciclo ácido graxo/triglicerídio, apenas livros-texto mais recentes incluem a gliceroneogênese e sua regulação (e.g. Boyer 2005). Mesmo com o crescente número de estudos recentes sobre a gliceroneogênese e conseqüente aumento sobre o entendimento da via e sua regulação, nada se sabe sobre a importância biológica da via gliceroneogênica com relação aos animais em seu ambiente natural.

### 3.1.1.1. O papel da PEPCK-C na gliceroneogênese e a sua regulação

A importância da fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica (PEPCK-C) como enzima chave na gliceroneogênese ficou clara desde os primeiros trabalhos sobre esta via. A partir do momento em que foi possível entender os fatores específicos da transcrição do gene da PEPCK-C, os mecanismos responsáveis pelo controle desta enzima foram delineados (Hanson e Reshef 1997, Savon et al. 1997, Hanson e Reshef 2003).

A transcrição da PEPCK-C no tecido adiposo requer vários fatores de transcrição, entre eles o *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPAR $\gamma$ ) que são receptores nucleares relacionados com o metabolismo e diferenciação celular responsáveis pelo aumento na sensibilização do tecido pela insulina e o fator de transcrição CCAAT *enhancer binding protein* (C/EBP $\alpha$ ) (Hanson e Reshef 2003). A transcrição da PEPCK-C no tecido adiposo é induzida pelo AMPc e inibida pela insulina e glicocorticóides. No fígado a regulação difere, pois a transcrição é estimulada pelo AMPc e glicocorticóides e inibida pela insulina. Isso significa dizer que os glicocorticóides são a chave para a regulação da gliceroneogênese em ambos os tecidos (figura 24) (Beale et al. 2002, Hanson e Reshef 2003, Reshef et al. 2003).

A PEPCK-C catalisa a gliceroneogênese tanto no fígado quanto no tecido adiposo. A gliceroneogênese afeta o metabolismo de lipídios de maneira oposta nos dois tecidos e é provável que existam diferentes níveis de regulação da expressão desta enzima. No tecido adiposo ela limita a liberação de ácidos graxos, enquanto no fígado estimula a liberação de ácidos graxos na forma de triglicerídios (Beale et al. 2002).

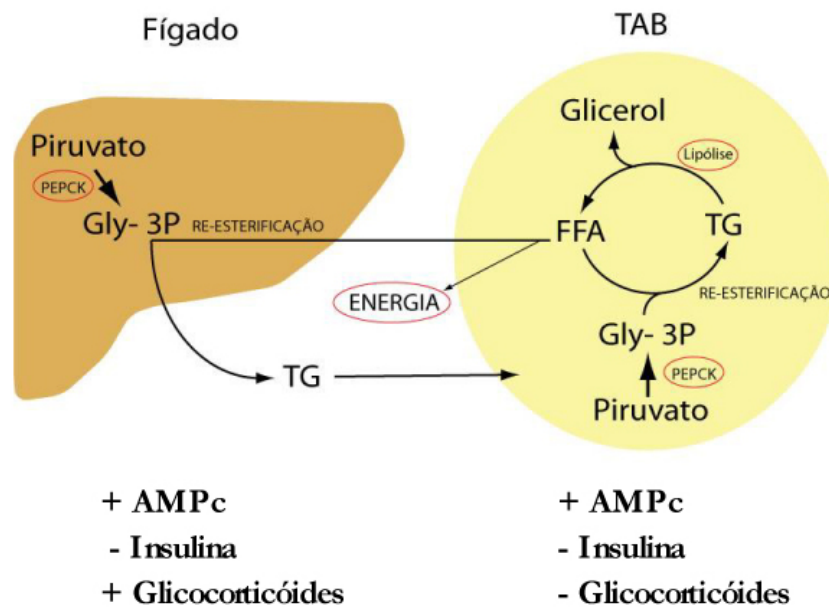


Figura 24. Esquema da regulação da gliceroneogênese no fígado e no tecido adiposo branco (TAB). O sinal '+' indica os fatores que estimulam a transcrição da PEPCK, enquanto o sinal '-' indica aqueles que a inibem em cada tecido (adaptado de Forest et al. 2003).

Para entender como ocorre o controle da PEPCK-C na gliceroneogênese é importante rever os fatores que controlam a sua transcrição. Tanto a gliceroneogênese quanto a gliconeogênese estão mais ativas durante o jejum e a expressão do gene da PEPCK-C é induzido pelos hormônios catabólicos glucagon e adrenalina, ambos ativadores de AMPc e inibidores da insulina. Os glicocorticóides também afetam a transcrição do gene de uma maneira diferente, induzindo a transcrição da PEPCK-C no fígado e rim e inibindo no tecido adiposo. Por isso, Hanson e Reshef (2003) sugerem que a regulação recíproca do gene da PEPCK-C por glicocorticóides nestes tecidos permite um mecanismo em que ao mesmo tempo reprime a transcrição do gene da PEPCK-C no tecido adiposo e o estimula no fígado e rim.

São propostas duas funções metabólicas para a PEPCK-C. A primeira é *anaplerótica*, uma vez que a PEPCK-C catalisa a síntese de oxalacetato pela fosfoenolpiruvato (PEP) e fornece intermediários que alimentam as funções biosintéticas do ciclo do ácido cítrico. Contudo, os tecidos que realizam a biosíntese energética contém grande número de mitocôndrias que possuem a enzima piruvato carboxilase em alta atividade para esta função. Então, a PEPCK-C teria também um papel *cataplerótico* (Hanson e Reshef 2003).

A atividade da PEPCK-C é encontrada em um grande número de tecidos incluindo fígado, córtex renal, tecido adiposo branco e marrom, intestino delgado, pulmão, músculo, cérebro, epidídimo e glândulas mamárias durante a lactação (Beale et al. 2002, Hanson e Reshef 2003, Reshef et al. 2003). Trabalhos utilizando anticorpos para a PEPCK-C demonstraram a presença desta enzima nas células  $\beta$  do pâncreas e língua. Apesar disso, o papel metabólico da PEPCK-C neste caso ainda é pouco conhecida (Zimmer e Magnuson 1990).

### 3.1.1.2. Porque estudar a gliceroneogênese em cetáceos?

Como foi dito anteriormente, não existem trabalhos relacionados à gliceroneogênese em animais na natureza e a sua importância biológica. Todavia, algumas espécies animais apresentam uma situação intrigante com relação à manutenção de seus estoques energéticos em períodos de jejum prolongados. Mysticetáceos (baleias que possuem cerdas bucais ao invés de dentes) de uma maneira geral se alimentam de zooplâncton no hemisfério sul, principalmente do krill (*Euphasia superba*) durante os meses de verão. O krill é a base da cadeia alimentar em águas antárticas, sendo inclusive determinante para o sucesso reprodutivo de algumas espécies de aves e focas (Croxall et al. 1999). Este crustáceo cresce e se desenvolve durante o ano na Antártica, se multiplicando durante o verão quando o sol



reaparece e aquece os oceanos desta região, formando-se nuvens de krill que são a principal alimentação das grandes baleias em águas polares do sul (Bannister et al. 1999, Quentin et al. 2003,). O krill é composto por aproximadamente 80% de proteína do seu peso seco (tabela 12). Após três meses nas áreas de alimentação localizadas em altas latitudes, as baleias partem para as áreas de reprodução localizadas nas baixas latitudes para procriar e ter seus filhotes. Nestes nove meses em que as baleias se deslocam até estas áreas, procriam, e retornam às áreas de alimentação, o animal permanece em jejum (Berta e Sumich 1999). Como um animal que possui uma dieta rica em proteínas consegue manter a glicemia durante um período tão prolongado? Se estes animais dependem exclusivamente da camada de gordura para obter a energia durante a migração, pode existir alguma via metabólica que auxilie na conservação dos ácidos graxos no tecido adiposo otimizando a utilização da energia neste tecido?

Tabela 12. Composição do krill descongelado e seco.

Composição do Krill (peso seco)*	
	Porcentagem máxima (%)
Carboidratos	3.5
Gordura	7
Proteína	75 - 81

*\*fonte: www.kingkrill.com*

A resposta pode estar na gliceroneogênese, uma vez que cetáceos possuem uma dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, além de apresentarem períodos de jejum prolongados no caso de misticetáceos migradores, premissas para a ativação da via. Odontocetáceos (cetáceos que possuem dentes), como os golfinhos, não apresentam um jejum prolongado como o que encontramos em misticetáceos, mas podem igualmente apresentar a

gliceroneogênese no tecido adiposo como forma de manutenção dos estoques lipídicos até que estes animais encontrem novas fontes de alimentos.

A fim de observar a presença da via gliceroneogênica nestes animais e comparar animais migratórios com não-migratórios, foram utilizados como objetos de estudo neste experimento a baleia-franca-do-sul (*Eubalaena australis*) e o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*).

## 3.2. Experimento 4: Identificação da via gliceroneogênica em baleias-franca-do-sul (*Eubalaena australis*) e no boto (*Tursiops truncatus*): a via da migração?

**Glauco Caon**

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), Departamento de Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

**Mônica Danielsky**

Instituto Baleia Franca (IBF), Rua Manuel Álvaro de Araújo, 200, Garopaba, SC & Universidade Federal de Juiz de Fora, Bairro Cidade Universitária, Juiz de Fora, MG.

**Pedro Fruet**

Laboratório de Tartarugas e Mamíferos Marinhos, Departamento de Oceanografia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG & Laboratório de Mamíferos Marinhos, Museu Oceanográfico “Prof. E.C. Rios” – FURG, Rio Grande-RS, Brasil

**Luiz C. Kucharski**

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), Departamento de Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

### 3.2.1. Resumo

A gliceroneogênese é a síntese *de novo* de glicerol-3-fosfato a partir de precursores que não a glicose nem o glicerol. Esta via ocorre no tecido adiposo e fígado utilizando preferencialmente piruvato como substrato. Como premissa desta via é necessário que o animal esteja submetido à uma dieta rica em proteínas e em jejum. Cetáceos estão naturalmente submetidos à uma dieta rica em proteínas e as espécies migratórias sofrem um jejum ou praticamente não se alimentam por aproximadamente nove meses no deslocamento entre as áreas de alimentação e reprodução. Apesar do crescente número de trabalhos a respeito desta via, nada se sabe a respeito da importância biológica da gliceroneogênese para os animais em seu habitat natural. Para estudar esta via foram biopsiados um par fêmea/filhote (IBF#1 e IBF#2) de baleia franca (*E. australis*) na praia do Siriú, Santa Catarina, bem como 3 golfinhos-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*) (LMM-P#24, LMM-P#25, LMM-P#26) na Lagoa dos Patos em Rio Grande. Foi realizada a incubação com piruvato marcado e extração de RNA. A incubação do tecido adiposo da baleia franca foi realizada em duplicatas. Foi observada uma incorporação média de  $83.79 \pm 29.39$  cpm/g de tecido (n= 2) no tecido adiposo da fêmea, enquanto no filhote não houve captação do piruvato. Apenas o boto P#26 apresentou uma captação de 414.95 cpm/g de tecido. O RNA foi preparado com sucesso a partir do qual foi obtida a expressão do gene 28S, demonstrando a viabilidade do trabalho. Devido à ausência da glicerol fosfatase e a baixa concentração de glicogênio no tecido adiposo, a incorporação deste piruvato só pode ser explicada pela gliceroneogênese. Esta via tem como característica a otimização da utilização da energia, fazendo com que 60% dos ácidos graxos sejam re-esterificados durante a lipólise. Assim, a via gliceroneogênica parece auxiliar o controle da utilização das reservas lipídicas, sendo importante na conservação destas reservas durante a migração.

Palavras-chave: baleia-franca-do-sul, *Eubalaena australis*, golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus*, gliceroneogênese, Brasil.

## 3.2.2. Introdução

### 3.2.2.1. A baleia-franca-do-sul, *Eubalaena australis* (Desmoulins 1822)

A baleia-franca-do-sul (figura 25) pertence à subordem Mysticeti. A espécie faz parte da família Balaenidae, gênero *Eubalaena* que possui duas espécies reconhecidas: a baleia-franca-do-sul (*E. australis*), com distribuição no hemisfério sul, e a baleia-franca-do-norte (*E. glacialis*), distribuída no hemisfério norte. É aceita ainda a existência de uma terceira espécie, *E. japonica*, no Pacífico Norte, devido à indícios fornecidos pela análise de DNA mitocondrial (Gaines et al. 2005).

A baleia-franca-do-sul possui coloração escura, sem nadadeira dorsal, comumente possuindo manchas brancas na região ventral. O borrifo em formato de ‘V’ e a presença de espessamentos da epiderme chamados de calosidades cobertos de colônias de crustáceos anfípodos (*Cyamus* sp.) na cabeça, boca e próximo ao orifício respiratório, são características da espécie (Payne 1986, Bastida et al. 2007) (figura 3.3). Não possuem pregas ventrais, característica dos balaenopterídeos. As fêmeas são maiores que os machos, possuindo aproximadamente 18 metros e pesando até 56 toneladas (Cumplings 1985).

A espécie é migratória, se alimentando do krill (*Euphasia* sp.) nos três meses de verão próximo aos pólos, mais especificamente nas ilhas da Convergência Antártica e ilhas Geórgias do Sul e se reproduzindo no inverno nas baixas latitudes próximo ao continente (Cumplings 1985, Best et al. 1993). Durante os nove meses que separam as épocas de alimentação não existem evidências que comprovem que a baleia franca, assim como as outras espécies migratórias, se alimentem durante este período. Assim, dependem exclusivamente da camada de gordura para se deslocar até as áreas de reprodução, procriar e retornar aos pólos para se alimentar novamente (Lockyer 1987).

Estas rotas migratórias podem ser identificadas uma vez que o padrão formado pelo número e distribuição de calosidades permite a identificação individual através da fotoidentificação dos animais, tanto nas áreas de reprodução quanto nas áreas de alimentação (Payne 1986, Best et al. 1993). Assim, trabalhos com relação à estimativa de abundância, fidelidade às regiões de alimentação e reprodução, bem como a distribuição e uso de habitats dos indivíduos são possíveis através da fotoidentificação (Bannister et al. 1999, Van Waerebeek et al. 1992), marcadores moleculares (Ott 2002) e isótopos estáveis (Best e Schell 1996).



Figura 25. Vista da região dorsal da cabeça da baleia franca (©Glauco Caon).

São conhecidos quatro estoques reprodutivos principais da baleia franca no hemisfério sul localizados na África do Sul, região sub-antártica da Nova Zelândia, Austrália e América do Sul (IWC 1986, Klinowska 1991). A Península Valdés, na Patagônia Argentina, é o local

de maior concentração reprodutiva da América do Sul, com uma pequena população presente no sul do Brasil (IWC 2001). No Brasil, principalmente no litoral sul de Santa Catarina, as baleias utilizam as enseadas e baías presentes na região para o acasalamento e dar à luz aos filhotes principalmente nos meses de maio à dezembro, com maior frequência de animais entre julho e outubro (Simões-Lopes et al. 1992, Groch 2005). As causas da preferência por águas calmas não são conhecidas, mas parece haver uma preferência por águas rasas de fundo plano, além do que a proximidade da costa evita a presença de predadores como orcas e tubarões (Cummings 1985). Em Santa Catarina encontram-se diversos pares mãe e filhote que permanecem nas águas abrigadas das enseadas durante vários dias. Estes animais possuem uma fidelidade às áreas de reprodução e alimentação (Best 1990, Payne et al. 1990), sendo realizadas 31 reavistagens de baleias francas em Santa Catarina entre 1987 e 2003 (Groch 2005).

Durante décadas as baleias francas foram caçadas para exploração comercial. Das aproximadamente 90.000 baleias estimadas da população original calcula-se que atualmente restem entre 7.000 e 8.000 animais (IWC 2001). No Brasil a caça à baleia foi proibida somente em 1986. Mesmo assim, acredita-se que o número de indivíduos da baleia franca do sul venha se recuperando anualmente em uma taxa de 29,8% ao ano entre 1997 a 2003, sendo estimados 555 animais entre o sul da ilha de Santa Catarina (27°53'S, 48°34'W) e o Cabo de Santa Marta, Laguna (28°36'S, 48°48'W)(Groch 2005, Groch et al. 2005).

Esta espécie consta na Lista Oficial de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (IBAMA 1989) e do Apêndice I da CITES. É incluída pela IUCN (2006) na categoria 'baixo risco, dependente de conservação' e 'vulnerável' pelo Plano de Ação para os Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA 2003).

A presença destes animais em baías protegidas de Santa Catarina e o comportamento calmo e discreto das francas, inclusive se aproximando das embarcações, favorece a realização de diversos trabalhos relacionados à espécie, incluindo estudos de metabolismo e fisiologia.

#### 3.2.2.2. O golfinho-nariz-de-garrafa, *Tursiops truncatus* (Montagu 1821)

As informações sobre esta espécie estão descritas no item 2.2.2.1. do experimento 3.

### 3.2.3. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo identificar a presença da atividade gliceroneogênica no tecido adiposo da baleia-franca-do-sul (*Eubalaena australis*) e do golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*).

#### 3.2.3.1. Objetivos específicos

- Observar a formação de glicerol- $C^{14}$  a partir da captação de piruvato marcado no tecido adiposo da baleia franca e do golfinho-nariz-de-garrafa;
- comparar a formação de glicerol- $C^{14}$  entre fêmeas (animais em jejum alimentados com proteína) e filhotes (animais se alimentando principalmente de gordura);
- Testar a integridade das amostras coletadas para realização de técnicas de biologia molecular.



## 3.2.4. Método

### 3.2.4.1. Biópsias

As biópsias foram realizadas utilizando uma balestra de 150 lbs e flecha especialmente adaptada para coleta de tecidos em cetáceos (Brown et al. 1991) com aparador de poliestireno e ponteira metálica específica para pequenos e grandes cetáceos, dependendo da espécie estudada (figura 14 [item 1.4.4.1. do experimento 2]). No momento da coleta uma ficha de reação à biópsia foi preenchida registrando a reação dos animais individualmente (Anexo I). Esse procedimento segue recomendações internacionais que demonstram não haver reações negativas por parte dos animais amostrados, recomendando fortemente a utilização desta metodologia para a coleta de tecido (Brown et al. 1991, Hoezel 1991, Weinrich et al. 1991).

Antes da coleta foi realizada a fotoidentificação dos animais (Defran et al. 1990) com o objetivo de evitar a repetição da biópsia de um mesmo animal. A aproximação realizada com a embarcação seguiu a recomendação da IWC apresentada por Carlson (1996) para a regulamentação do turismo de baleia (*whalewatching*), nunca se aproximando dos animais diretamente de frente ou por trás, separar os grupos de animais, nem se aproximar à uma distância de 100 metros do animal com o motor ligado. Ao desligar os motores, se evitou mudanças bruscas na direção da embarcação e o barulho desnecessário, fazendo com que o animal permaneça no local e permita a aproximação do barco por não se importar com a presença do mesmo, quando era então realizada a biópsia. Para este trabalho foram coletados um par mãe e filhote (IBF#01 e IBF#02, figuras 26 e 27) de baleia franca (*E. australis*) em frente à Praia do Siriú (SC)(28°00'S, 47°35'W; figuras 28 e 29) no dia 26 de agosto de 2006 utilizando barco inflável de 9 metros de comprimento, fundo de fibra e dois motores de 90 HP (figura 30).

Os golfinhos-nariz-de-garrafa LMM-P#24, LMM-P#25 e LMM-P#26 foram coletados próximo aos molhes de Rio Grande (32°10'S, 52°05'W; figuras 27 e 31) no dia 27 de setembro de 2005 após a fotoidentificação (figura 32) utilizando como plataforma de coleta uma embarcação para travessia da Lagoa dos Patos. O tecido coletado dos animais LMM-P#24 e LMM-P#26 foram utilizados para experimentos de incubação com piruvato para verificar a formação de glicerol-<sup>14</sup>C (Item 3.2.4.2.), enquanto a amostra de tecido adiposo coletada do animal LMM-P#25 foi utilizada para a extração de RNA conforme descrito no Item 3.2.4.3.

Na ponta da flecha utilizada na coleta das biópsias das baleias francas foi possível observar parte do tecido adiposo coletado (figura 33), que foi retirado da ponteira o mais rápido possível e imerso em nitrogênio líquido ou Trizol (Gibco®) para conservação do RNA com auxílio de pinça e bisturi previamente esterilizados. O tempo necessário desde o momento da coleta até a imersão nos líquidos para conservação do tecido variou entre 1 e 3 minutos. O restante do tecido presente na ponteira foi submerso em solução fisiológica para mamíferos para que o tecido permanecesse vivo até a chegada ao laboratório. No laboratório o tecido adiposo coletado foi retirado da ponteira e separado da pele para ser incubado.



Figura 26. Foto do filhote de baleia franca IBF#01 na Praia da Ferrugem, litoral de Santa Catarina (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>).



Figura 27. Fotoidentificação da fêmea IBF#02 na Praia da Ferrugem, litoral de Santa Catarina (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>).

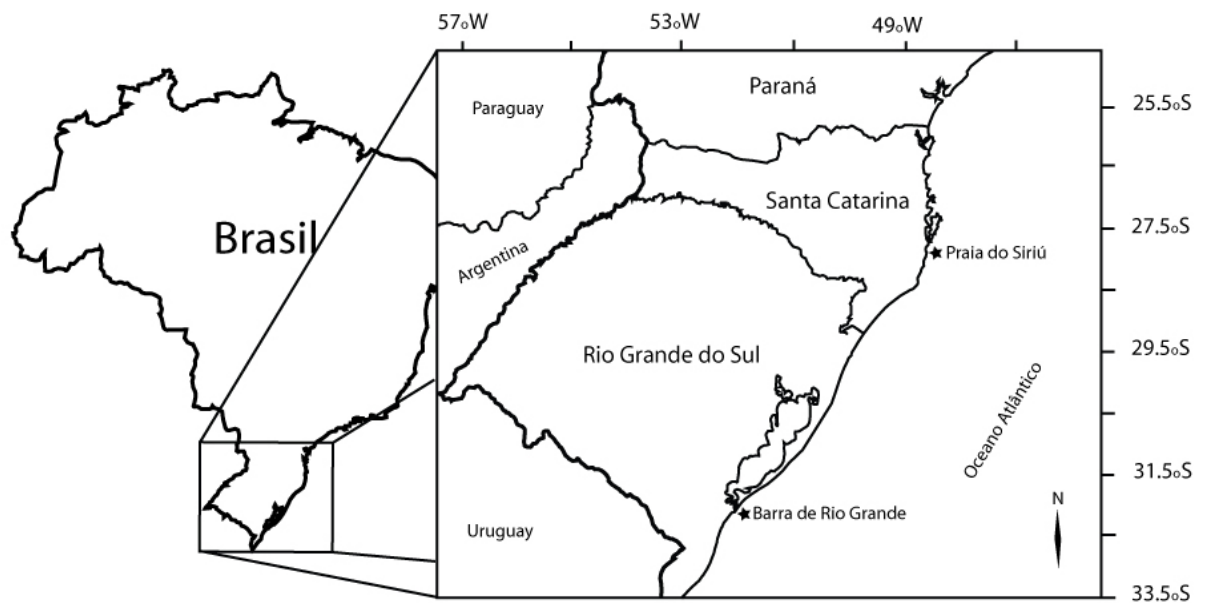


Figura 28. Mapa dos locais de coleta de tecido para os experimentos sobre gliceroneogênese.



Figura 29. Imagem de satélite da área de coleta do par mãe e filhote IBF#01 e IBF#02 em Santa Catarina (Fonte: Google Earth<sup>®</sup>).



Figura 30. Embarcação utilizada para coleta da baleia franca em Santa Catarina.

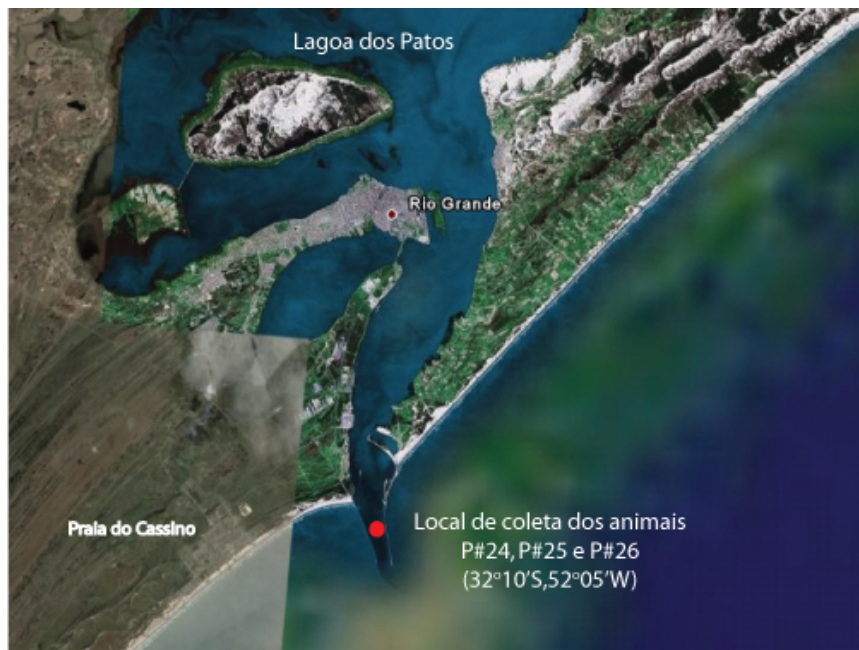


Figura 31. Imagem de satélite da área de coleta dos golfinhos-nariz-de-garrafa LMM-P#24, LMM-P#25 e LMM-P#26, na Barra da Lagoa dos Patos em Rio Grande, Rio Grande do Sul (Fonte: Google Earth®).



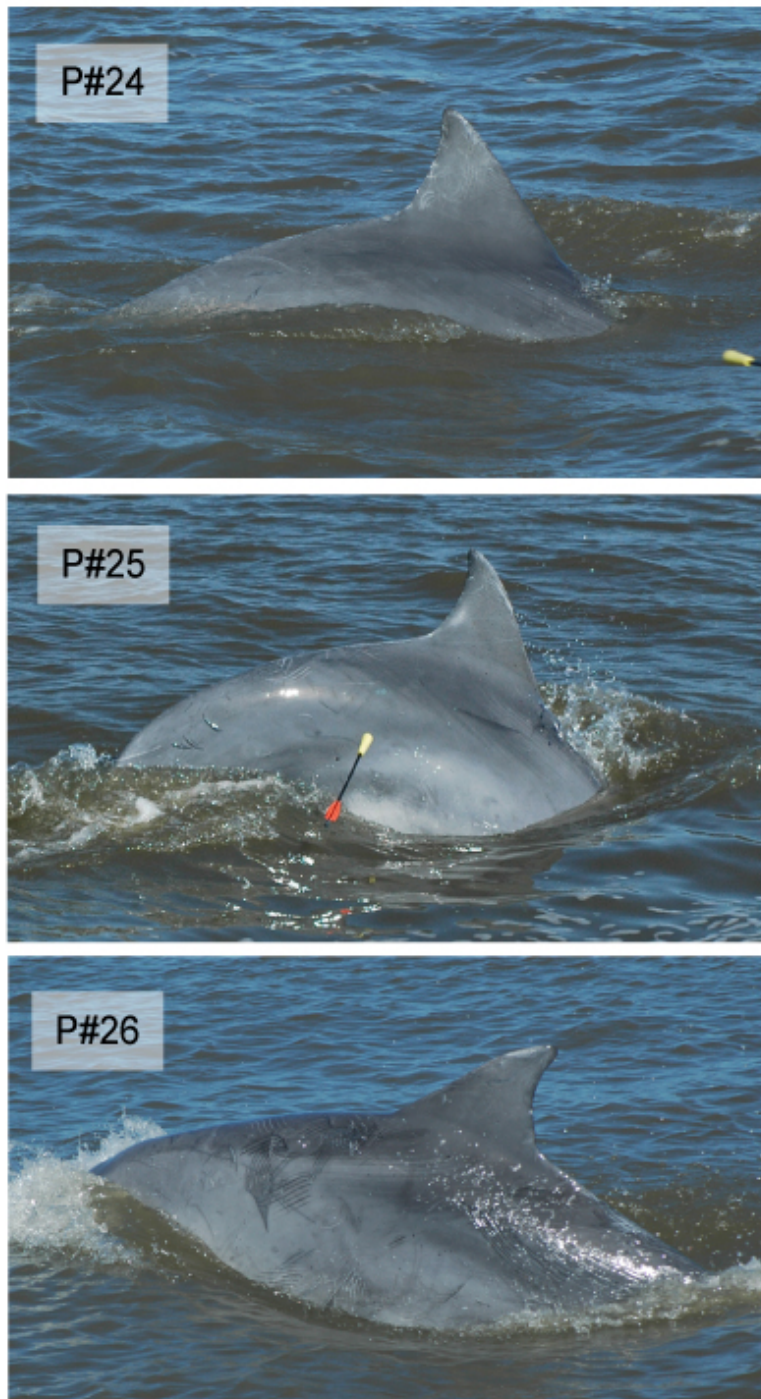


Figura 32. Fotoidentificação dos animais LMM-P#24, LMM-P#25 e LMM-P#26 na Barra da Lagoa dos Patos, Rio Grande, Rio Grande do Sul (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>).

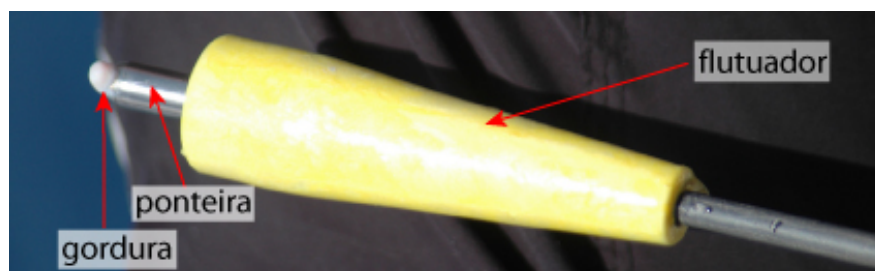


Figura 33. Detalhe do tecido adiposo na ponteira após a biópsia, utilizado para os experimentos com RNAm (foto: Glauco Caon<sup>©</sup>).

#### 3.2.4.2. Incubação do tecido adiposo

Raros são os estudos que descrevem as metodologias para realização de experimentos de metabolismo em mamíferos marinhos, como a incubação do tecido para estudo, por exemplo. Em sua maioria, são utilizados animais doentes ou quase mortos na beira da praia, o que pode resultar em alterações metabólicas que irão se refletir nos dados obtidos (Romano et al. 1999, Janech et al. 2002, Beinke et al. 2007). Dados sobre a temperatura corporal, tempo de incubação, quantidades do traçador utilizado, qual solução fisiológica usar, não são conhecidos. Assim, para realizar este experimento, adaptamos a metodologia conhecida para a incubação de tecidos de animais de laboratório na tentativa de obter os dados necessários para a comprovação da gliceroneogênese no tecido adiposo de cetáceos.

As biópsias realizadas para verificar a atividade da via gliceroneogênica nestes tecidos foram conservadas em solução fisiológica desde o momento da coleta até o laboratório, o que durou aproximadamente 30 minutos. Devido à quantidade de tecido coletado, foram feitas duplicatas das biópsias de baleia franca de aproximadamente 0,1g para cada indivíduo coletado. As amostras de *T. truncatus* foram analisadas inteiras, devido à quantidade obtida. As amostras de tecido adiposo foram retiradas da ponteira e separadas da pele. Foi realizado então o *slicing* do tecido adiposo com bisturi, e as fatias colocadas em meio de incubação

Krebs-Ringer-bicarbonato (composição: NaCl = 18 g/100ml, KCl = 0,92 g/100ml, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0,42 g/100ml, NaHCO<sub>3</sub> = 5,46 g/100ml, MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) = 0,764 g/100ml e Cl<sub>2</sub>Ca (2H<sub>2</sub>O) = 0,96 g/100ml) com 0,15 µCi de ácido pirúvico [1-C<sup>14</sup>] 13,5 mCi/nmol (NEN Du Pont), 5,0 mM de piruvato não marcado e aerados com carbogênio. Foi utilizado o piruvato-[1-C<sup>14</sup>] marcado no primeiro carbono porque este carbono é o que será utilizado para a formação do glicerol 3-fosfato (Boyer 2005), ou seja, ao quantificar a radiação dos lipídios extraídos do tecido estaremos quantificando a formação do glicerol 3-fosfato e seus subprodutos. A incubação teve duração de 1 hora a 35° C com agitação constante em banho metabólico tipo Dubnoff. Após este procedimento, os *slicings* foram separados do meio de incubação, secados em papel filtro, lavados com solução fisiológica para retirada do excesso de radioativo, e congelados em tubos para posterior análise. No laboratório os lipídios totais foram extraídos do tecido adiposo utilizando o método de Folch et al. (1957) e a formação de glicerol marcado foi quantificado utilizando contador beta, com o resultado sendo expresso em cpm/g de tecido.

#### 3.2.4.3. Extração de RNA

Realizar experimentos envolvendo RNAm em animais na natureza é extremamente complicado devido à dificuldade em encontrar infra-estrutura adequada para os procedimentos necessários. Além disso, a fragilidade do próprio RNAm devido à demora na coleta e conservação do tecido no momento da coleta até a realização dos experimentos de extração, amplificação e seqüenciamento do segmento desejado, são um difícil problema logístico nas atividades de campo. Especialmente para as enzimas envolvidas na gliceroneogênese, como a PEPCK. Existem metodologias já descritas na literatura para a realização da coleta de tecidos que usualmente são feitas a partir de animais encalhados vivos ou pela retirada de animais caçados pela indústria baleeira (Romano et al. 1999, Janech et al. 2002, Beinke et al. 2007).



Esta coleta em mamíferos marinhos, onde qualquer demora na retirada e acondicionamento do tecido pode inviabilizar todo o experimento. Por isso as metodologias utilizadas normalmente em laboratório foram adaptadas por nós e testadas em campo para verificar se é possível manter a integridade do RNAm presente no tecido adiposo coletado de mamíferos marinhos no campo sem a efetiva captura do animal.

Para isso, após a biópsia, o tecido adiposo em excesso que estava aparente na ponteira foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido ou imerso em Trizol (Gibco®) em tempos que variaram de 1 a 3 minutos ainda na embarcação. Após este procedimento, em laboratório, o tecido foi submetido à extração de RNA segundo Chomczynski e Sacchi (1987). O RNAm total foi transcrito reversamente através de kit para síntese de cDNA *SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA). Logo após, quantidades de cDNA foram submetidas a PCR. Uma fração de 1µl de cDNA foi utilizado como matriz para o PCR com volume final de 50 µl contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 pmol de cada primer, e 1 U *AmpliTag* DNA polimerase (Gibco). O PCR foi executado em um Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc.) e consistiu em 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 56° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 1 minuto.

Um par de oligonucleotídeos específicos desenhados a partir da seqüência do cDNA do gene 28S de *Drosophila* (AY319386) identificados como SENSO (5'GCGAAAAGAAAACAGTTCAGC3') e ANTI-SENSO (5'GAAGGACTTAAATCGTTAATTTCTCA3') foram utilizados. O tamanho do produto de PCR foi de 111 pares de base. A análise dos fragmentos de cDNA em gel de agarose foram

realizadas usando o ImageMaster<sup>®</sup> VDS (Pharmacia Biotech). Foi utilizado para comparação uma amostra de *Drosophila sp.* e o controle negativo foi realizado com água.

### 3.2.5. Resultados

#### 3.2.5.1. Incorporação do piruvato-[1-C<sup>14</sup>] pelo tecido adiposo

Os valores do glicerol-C<sup>14</sup> após a incubação do piruvato-[1-C<sup>14</sup>] no tecido adiposo estão apresentados na tabela 13. Na baleia franca, apenas a fêmea IBF#02 apresentou a formação de glicerol marcado (média= 83.79 cpm/g de tecido; DP= 29.39; n= 2) enquanto no tecido adiposo do filhote não foi observada formação de glicerol-C<sup>14</sup>. Em *T. truncatus* apenas o animal LMM-P#26 apresentou formação de glicerol marcado de 414.95 cpm/g de tecido.

Tabela 13. Valores de formação de glicerol marcado no tecido adiposo da baleia franca do sul (*E. australis*) e do golfinho-nariz-de-garrafa (*T. truncatus*).

<b>Código de campo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Peso do tecido (gramas)</b>	<b>Glicerol-C<sup>14</sup> formado*</b>
IBF#01 <sup>a</sup>	<i>E. australis</i> (filhote)	Praia do Siriú (SC)	0,1178	0
IBF#01 <sup>b</sup>	<i>E. australis</i> (filhote)	Praia do Siriú (SC)	0,1033	0
IBF#02 <sup>a</sup>	<i>E. australis</i> (fêmea adulta)	Praia do Siriú (SC)	0,1305	104,58
IBF#02 <sup>b</sup>	<i>E. australis</i> (fêmea adulta)	Praia do Siriú (SC)	0,1295	63,01
LMM-P#24	<i>T. truncatus</i>	Lagoa dos Patos (RS)	0,0754	0
LMM-P#26	<i>T. truncatus</i>	Lagoa dos Patos (RS)	0,0669	414,95

<sup>a</sup> = primeira duplicata; <sup>b</sup> = segunda duplicata;

\* cpm/g de tecido.

### 3.2.5.2. Teste de integridade da amostra coletada

A síntese do cDNA e a presença no gel de agarose de bandas do gene 28S com 111 pares de base (figura 34) após o PCR demonstram que o tecido está íntegro para os experimentos com RNA e que a metodologia utilizada para sua coleta está correta.

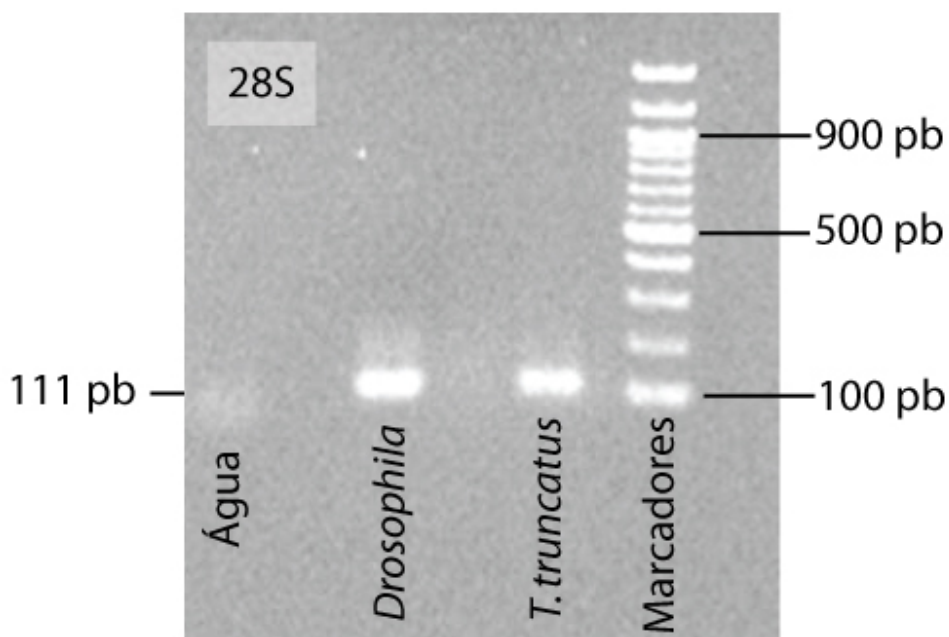


Figura 34. Gel de agarose demonstrando a integridade do tecido coletado do produto do PCR do 28S para o golfinho LMM-P#25 (*T. truncatus*), a mosca-da-fruta (*Drosophila sp.*), e o controle negativo com água.

### 3.2.6. Discussão

Os dados aqui apresentados demonstram a presença da via gliceroneogênica em cetáceos. A incorporação do piruvato marcado pelo tecido adiposo só pode ser explicada por esta via, uma vez que o tecido adiposo branco não oxida os ácidos graxos para obtenção de

energia em quantidade significativa, a atividade da glicerol quinase, responsável pela transformação do glicerol em glicerol 3-fosfato (que é o composto que permite a re-esterificação dos ácidos graxos) é praticamente nula neste tecido e o tecido adiposo branco não contém glicogênio suficiente para suprir a necessidade de glicose requerida para esta re-esterificação (Beale 2003, Hanson e Reshef 2003).

Obviamente a existência de uma via metabólica é resultado de um longo tempo de adaptações impostas pelo meio ambiente sobre uma população. No caso da gliceroneogênese, apesar dos inúmeros trabalhos publicados, todos são direcionados para as bases moleculares da mesma, ainda mais se tratando de uma via com importância médica por estar relacionada com a diabetes tipo II, por exemplo (Forest e Beale 2003). Não existe nenhum trabalho na literatura que aponte a importância desta via para os animais em seus ambientes naturais e a sua importância biológica para estas espécies.

Para as baleias migratórias é razoável admitir que, mesmo com a formação de uma espessa camada de gordura adquirida pela alimentação baseada no krill em áreas próximas à convergência subantártica, outros fatores auxiliem na otimização da utilização destas reservas. Os cuidados da fêmea com seu filhote são as atividades de maior demanda de energia em mamíferos. Por ser a única fonte de energia durante os aproximadamente nove meses da migração, a utilização das reservas presentes na camada de gordura é crucial para o sucesso da espécie desde a alimentação até a reprodução ou concepção dos filhotes, amamentação e retorno às áreas Sub-Antárticas. Em baleias cinzentas, por exemplo, a fêmea perde massa corporal na transferência de energia para o filhote durante a amamentação. Berta e Sumich (1999) descrevem que fêmeas de baleias cinzentas, *Eschrichtius robustus*, apresentam aproximadamente 25 toneladas de peso no momento do nascimento de seu filhote e, dez semanas após, no final da amamentação, este peso diminui para 21 toneladas. No mesmo

período o filhote, que no momento do nascimento pesa aproximadamente 900 kg, ao final da amamentação apresenta 2100 kg de peso. Ou seja, a fêmea tem uma perda de massa de aproximadamente 16%, enquanto o filhote ganha 233% de peso no mesmo período, garantindo o tamanho suficiente para os deslocamentos até as áreas de alimentação. Isso só é possível porque o leite das espécies de misticetáceos migradores possui uma grande concentração de lipídios proveniente da camada de gordura, com concentrações que podem variar de 20% até 40%, dependendo da época da lactação e da espécie estudada (Oftedal 1997). No presente estudo, a fêmea IBF#02, que está sob as condições necessárias para a ativação da via gliceroneogênica (alimentada com proteína e em jejum), possui média de  $83.79 \pm 29.39$  cpm/g ( $n= 2$ ), enquanto o seu filhote (IBF#01), que estava se alimentando de leite rico em gordura, não apresentou formação de glicerol marcado. Assim, é plausível sugerir que, para assegurar a manutenção das reservas energéticas na forma de gordura presentes no tecido adiposo, a gliceroneogênese auxilie como um mecanismo metabólico de conservação das reservas lipídicas. A via gliceroneogênica possui como característica manter até 60% das reservas lipídicas no tecido adiposo, não permitindo a utilização total destas reservas durante a lipólise (Beale et al. 2002, Hanson e Reshef 2003). Assim, mesmo com todo o gasto energético imposto pela migração e reprodução, os animais possuem meios metabólicos de otimizar a utilização da camada de gordura.

De uma maneira geral não existem trabalhos sobre metabolismo em cetáceos, principalmente grandes cetáceos como baleias. Assim, vários dados importantes para a realização dos mesmos também inexistem, dificultando a execução de projetos caros como os realizados com mamíferos marinhos sem dados básicos sobre temperatura corporal, quantidade de tecido necessária, a solução fisiológica que deve ser utilizada, entre outros. Estes dados são cruciais para a realização dos experimentos e caso não sejam adequados todo

o experimento pode ser perdido. A metodologia empregada neste estudo foi criada utilizando apenas informações sobre a experiência dos autores em trabalhos de campo e de fisiologia, sendo possível a realização de experimentos para determinar a utilização do piruvato-[1-C<sup>14</sup>] e na formação do glicerol marcado na amostra de tecido.

Em *T. truncatus* é comum a observação destes animais nas barras dos rios à procura de alimentos como a tainha (*Mugil* sp.) (Simões-Lopes 1995). Cada indivíduo possui um estado nutricional quando os encontramos na natureza. Assim, alguns animais vão estar em jejum e outros alimentados no momento da biópsia. Provavelmente os resultados encontrados para a formação de glicerol-C<sup>14</sup> nesta espécie estejam refletindo seu estado nutricional, uma vez que o animal P#24 não apresentou formação e o animal P#26 apresentou a maior formação entre todos os indivíduos analisados (414,95 cpm/g de tecido). A atividade da via gliceroneogênica foi descrita em mulheres grávidas alimentadas com proteínas e em 12 horas de jejum, demonstrando que em relativamente curtos períodos de tempo esta via está ativada (Kalhan et al. 2001). Ainda assim o mar possui zonas de maior produção e de menor produção, resultando em áreas com maior e menor quantidades de alimento. Apesar de um período de jejum bem menor que o apresentado por baleias migratórias, a gliceroneogênese pode estar auxiliando a manutenção das reservas lipídicas em golfinhos.

Em trabalhos de metabolismo, além da incubação como indicador da presença da via, também é necessária a observação da atividade e o sequenciamento das enzimas-chave. A integridade do tecido para estudos com RNA é imprescindível e por isso metodologias para verificar a conservação do tecido adiposo foram testadas. Tanto os métodos de congelamento em nitrogênio líquido quanto de imersão em Trizol (Gibco®) do tecido adiposo foram satisfatórios, como foi demonstrado pela presença de uma única banda para o gene 28S, utilizada para testes de integridade do RNA. Estas metodologias podem ser empregadas em

futuros trabalhos que envolvam a coleta de tecido em trabalhos de campo objetivando análises moleculares.

Apesar do pequeno número amostral, o objetivo de identificar a gliceroneogênese nestes animais foi obtido. Um novo estudo com maior número amostral e outras variáveis a serem comparadas, como o início e o final da temporada de migração, será analisado a partir da temporada 2007. Este trabalho demonstra principalmente a possibilidade de executar experimentos *in vitro* com amostras coletadas de animais de grande porte como cetáceos em seus ambientes naturais, não havendo a necessidade da captura dos mesmos ou que seja necessária a espera de um evento como o encalhe de um animal doente para conduzir experimentos desta natureza.

## 4. Referências Citadas

- Ackman RG. 1980. Fish lipids, part I. In *Advances in Fish Science and Technology*. Connel JJ (ed). Pp 86-103.
- Ackman RG, Eaton CA. 1966. Lipids of the fin whale (*Balaenoptera physalus*) from north Atlantic waters III. Occurrence of eicosenoic and docosenoic fatty acids in the zooplankton *Meganctiphanes norvegica* (M. Sars) and their effect on whale oil composition. *Can J Biochem.* 44:1561-1566.
- Ackman RG, Hingley JH, Eaton CA, Sipos JC, Mitchell ED. 1975. Blubber fat deposition in mysticete whales. *Can J Zool.* 53: 1332-1339.
- Aguilar A, Borrell A. 1990. Patterns of lipid contents and stratification in the blubber of fin whales (*Balaenoptera physalus*). *J Mammal.* 71:544-554.
- Aikawa J. 2004. Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a caquexia, o crescimento tumoral e o sistema imunitário em ratos F2. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 93pp.
- Amos W, Barrett J, Dover G. 1991. Breeding behaviour of pilot whales revealed by DNA fingerprinting. *Heredity* 67:49-55.
- Araújo DM. 2005. A camada de gordura das toninhas, *Pontoporia blainvillei* (Mammalia:Cetacea) no litoral sul do RS: variação na espessura da composição de ácidos graxos em resposta a fatores ambientais e fisiológicos. Dissertação de mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 120 pp.
- Asper ED, Cornell LH, Duffield DA, Dimeo-Ediger N. 1988. Marine Mammals in zoos, aquaria, and marine zoological parks in North America: 1983 census report. *International Zoo Yearbook* 27: 287-294.
- Avice JC. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, Londres.
- Baker CS, Palumbi SR, Lambertsen RH, Weinrich MT, Calambokidis J, O'Brien SJ. 1990. Influence of seasonal migration on geographic partitioning of mitochondrial DNA haplotypes in humpback whales. *Nature* 344: 238-240.



- Baker CS, Palumbi SR. 1994. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science*. 265:1538-1539.
- Ballard FJ, Hanson RW, Leveille GA. 1967. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and the Synthesis of Glyceride-Glycerol from Pyruvate in Adipose Tissue. *J Biol Chem*. 242: 2746–2750.
- Bannister JL, Pastene LA, Burnell SR. 1999. First record of movement of a southern right whale (*Eubalaena australis*) between warm water breeding grounds and the Antarctic Ocean, South of 60 degrees South. *Mar Mamm Sci*. 15(4):1337-1342.
- Barreto AS. 2000. Variação craniana e genética de *Tursiops truncatus* (Delphinidae, Cetacea) na costa atlântica da América do Sul. Tese de Doutorado. Rio Grande: Fundação Universidade de Rio Grande, 111p.
- Basso M. 1997. Avaliação da dieta alimentar da toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais e D'Orbigny, 1844), capturadas acidentalmente na pescaria costeira de emalhe no sul do Rio Grande do Sul. Dissertação de bacharelado. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande. 68 pp.
- Basso M, Secchi ER. 1999. Temporal variation in the diet of, franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae), as a consequence of fish stocks depletion off southern Brazil. In *Ecosystem Effects of Fishing*, p. 51. ICES/SCOR Symposium.
- Bastida R, Rodríguez D, Secchi ER, Silva V. 2007. Mamíferos acuáticos de Sudamérica y Antártida. Vazquez Mazzini Editores. Buenos Aires, Argentina. 366 pp.
- Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C. 2002. Glyceroneogenesis comes of age. *Faseb J*. 16:1695-1696.
- Beck CA, Iverson SJ, Bowen WD. 2005. Blubber fatty acids of gray seals reveal sex differences in the diet of a size-dimorphic marine carnivore. *Can J Zool*. 83:377-388.
- Beincke A, Siebert U, Müller G, Baumgärtner W. 2007. Increased blood interleukin-10 mRNA levels in diseased free-ranging harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Vet Immunol Immunopathology*. 115:100-106.
- Beland P. 1996. The beluga whales of the St. Lawrence River. *Sci Am*. 5:74-81.
- Berta A, Sumich JL. 1999. Reproductive structures, patterns and strategies. In *Marine Mammals Evolutionary Biology*. Academic Press, London, UK. Pg. 383.
- Best PB. 1990. Trends in the inshore right whale population off South Africa, 1969-1987. *Mar Mamm Sci*. 14(4):738-749.
- Best PB, Payne R, Rowntree V, Palazzo JT, Both MC. 1993. Long-range movements of South Atlantic right whales *Eubalaena australis*. *Mar Mamm Sci*. 9(3):227–234.
- Best PB, Schell DM. 1996. Stable isotopes in southern right whale (*Eubalaena australis*) baleen as indicators of seasonal movements, feeding and growth. *Mar Biol*. 124(4):483-494.

- Boyer R. 2005. Concepts in Biochemistry. (ed. Rodney F. Boyer). Wiley, 3o. edition. 736 pp.
- Boyle PR, Pierce GJ, Diack JSW. 1990. Sources of evidence for salmon in the diet of seals. *Fish Res.* 10:137-150.
- Bowen WD, Siniff DB. 1999. Distribution, population biology, and feeding ecology of marine mammals. In *Biology of marine mammals*. Reynolds III JE, Rommel AS eds. Smithsonian Institution Press. Washington, DC.
- Brown WM, George MJ, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceed Nat Acad Sci.* 76:1967-1971.
- Brown M, Kraus SD, Gaskin DE. 1991. Reaction of north Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) to skin sampling for genetic and pollutant analysis. pp. 81-89. *In: Hoelzel, A. R. (ed.), Genetic ecology of whales and dolphins*. Cambridge: International Whaling Commission, Special Issue 13, 311p.
- Brownell Jr. RL. 1989. Franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny 1844). In *Handbook of Marine Mammals* (eds Ridgway SH, Harrison RJ). Academic Press, London. 4:45-67.
- Budge SM, Iverson SJ. 2003. Quantitative analysis of fatty acid precursors in marine samples: direct conversion of wax ester alcohols and dimethylacetals to fatty acid methyl esters. *J Lipid Res.* 44: 1802-1807.
- Budge SM, Iverson SJ, Bowen WD, Ackman RG. 2002. Among- and within-species variation in fatty acid signatures of marine fish and invertebrates on the Scotian Shelf, Georges Bank and southern Gulf of St. Lawrence. *Can J Fish Aquat Sci.* 59: 886-898.
- Carwardine M. 1995. Whales, dolphins and porpoises. *Eyewitness Handbooks*. 1<sup>st</sup> American edition. Dorling Kindersley, New York.
- Caon G. 1998. Análise da condição corporal da franciscana, *Pontoporia blainvillei*, no litoral norte do Rio Grande do Sul. Dissertação de bacharelado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 21pp.
- Caon G. 2003. Composição da camada de gordura e do leite da toninha (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia, Cetacea) no litoral norte do Rio Grande do Sul. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 73pp.
- Caon G, Ott PH. 2000. Ocorrência e fotoidentificação do golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) em águas oceânicas brasileiras no Arquipélago de São Pedro e São Paulo. pp.20. *In: 9ª Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur e III Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Mamíferos Acuáticos (SOLAMAC)*. Buenos Aires, Argentina. Resúmenes.
- Caon G, Ott PH. 2001. Ocorrência e sazonalidade de cetáceos nas proximidades do Arquipélago de São Pedro e São Paulo. pp.37. *In: 1º Workshop Científico-Ambiental – Programa Arquipélago*.

- Secretaria da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar e Universidade Federal Rural de Pernambuco. Natal, RN. Resumos.
- Caon G, Secchi ER, Capp E, Kucharski L. 2007a. Milk composition of Franciscana Dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. J Mar Biol Assoc of UK. In press.
- Caon G, Fialho CB, Danilewicz D. 2007b. Body fat condition in franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Rio Grande do Sul, southern Brazil. J Mammal. In press.
- Carlson CA. 1996. A review of whalewatching guidelines and regulations around the world. Paper SC/48/O25 presented to IWC Scientific Committee, June 1996, Aberdeen. 59pp.
- Chittleborough RG. 1965. Dynamics of two populations of the humpback whale whale, *Megaptera novaeangliae* (Borowski). Aust J Mar Freshwater Res. 16(1):33-128.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162: 156–159.
- Clapham PJ, Palsboll PJ. 1997. Molecular analysis of paternity shows promiscuous mating in female humpback whales (*Megaptera novaeangliae*, Borowski). Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biology. 264:95-98.
- Cooney JJ, Doolittle MM, Grahal-Nielsen O, Haaland IM, Kirk PWJr. 1993. Comparision of fatty acids of marine fungi using multivariate statistical analysis. J Ind Microbiol. 12:373-378.
- Croxall J, Prince P, Reid K. 1999. Diet provisioning and productive responses of marine predators to differences in availability of Antarctic krill. Mar Ecol Prog Ser. 177:115-131.
- Cummings WC. 1985. Right Whales, *Eubalaena glacialis* (Muller 1776) and *Eubalaena australis* (Desmoulins 1822). In Handbook of Marine Mammals Volume 3: The Sirenians and Baleen Whales. Sam H Ridway and Sir Richard Harrison (eds). Pp. 275-304.
- Dalla Rosa L. 1999. Estimativa do tamanho da população de botos, *Tursiops truncatus*, do estuário da Lagoa dos Patos, RS, a partir da foto-identificação de indivíduos com marcas naturais e da aplicação de modelos de marcação-recaptura. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande.
- Dalla Rosa L, Kinas PG, Both R. 2000. Estimativa do tamanho da população de botos, *Tursiops truncatus*, do estuário da Lagoa dos Patos, RS, a partir da foto-identificação de indivíduos com marcas naturais e da aplicação de modelos de marcação-recaptura. pp.34. In: 9ª Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur e III Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Mamíferos Acuáticos (SOLAMAC). Buenos Aires, Argentina. Resumenes.

- Dalla-Rosa L, Secchi ER, Kinas PG, Santos COM, Martins MB, Zerbini NA, Bethlem CP. 2001. Photo-identification of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, off the Antarctic Peninsula: 1997/98 to 1999/00. Mem Queensl Mus. 47(2):555-561.
- Danilewicz D. 2003. Reproduction of female franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Rio Grande do Sul, southern Brazil. LAJAM. 2:67-78.
- Danilewicz D, Claver JA, Carrera ALP, Secchi ER, Fontoura NF. 2004. Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia : Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. Fish Bull. 102(4):581-592.
- Dawbin WH 1956. The migration of humpback whales which pas New Zealand. Trans R Soc. NZ 84(1):147-196.
- Defran RH, Schultz GM, Weller DW. 1990. A technique for fotografic identification and cataloging of dorsal fins of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Rep Int Whal Commn. 12:53-55.
- DeGuise S, Martineau D, Beland P, Fournier M. 1995. Possible mechanisms of action of environmental contaminants on St. Lawrence beluga whales (*Delphinapterus leucas*). Environ Health Perspect. 103:73-77.
- Dellinger T, Trillmich F. 1988. Estimating diet composition from scat analisys in otariid seals (Otariidae): Is it reliable? Can J Zool. 66:1865-1870.
- DeMaster DP, Drevenak JK. 1988. Survivorship patterns in three species of captive cetaceans. Mar Mam Sci. 4:297-311.
- Demonte T, Pilleri G. 1971. Relative mobility of the haemoglobin in the family Platanistidae. Inv Cetacea. 3:46-52.
- Demonte T, Pilleri G. 1977. Plasma protein fractions in the La Plata dolphin, *Pontoporia blainvillei*, captured off Los Cerros, Uruguay. Inv Cetacea. 8:231-232.
- Dizon AE, Southern SO, Perrin WF. 1991. Molecular analysis of mtDNA types in exploited populations of spinner dolphins (*Stenella longirostris*). Rep Int Whal Commn. Special Issue 13:183-202.
- Donovan GP. 1995. The International Whaling Commission and the Revised Manegement Procedure. Additional essays on whales and men. High North Aliance, N-8390. Noruega.
- Engel MH, Rosenbaum HC, Freitas AS, Pomilla C, Morete C. 1999. Genetic variation and population characteristics based on mtDNA and molecular sexing of humpback whales from Abrolhos Bank, Brazil. Abstracts of the 13t Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. Main, Hawaii.
- Findlay KP. 2001. A review of humpback whale catches by modern whaling operations in the Southern Hemisphere. Mem Queensl Mus. 47(2):411-420.

- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509.
- Forest C, Beale EG. 2003. New developments in nutrition and diabetes: glyceroneogenesis comes of age. *Biochimie.* 85:1195-1197.
- Forest C, Tordjman J, Glorian M, Duplus E, Chauvet G, Quette J, Beale EG, Antoine B. 2003. Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochemical Society Transactions.* 31(6):1125-1129.
- Fry B. 1988. Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnol Oceanogr.* 33:1182-1190.
- Gaines CA, Hare MP, Beck SE, Rosenbaum HC. 2005. Nuclear markers confirm taxonomic status and relationships among highly endangered and closely related right whales species. *Proc R Soc B.* 272(1562):533-542.
- Gambell R. 1973. How whales survive. In *Nature in the round*. N. Calder ed. Werdenfeld & Nicolson. London. Pp 193-202.
- Ganong WF. 2003. *Review of Medical Physiology*. 21<sup>st</sup> Edition. Appleton & Lange. 928 pg.
- Grahal-Nielsen O. 1997. Fatty acids profile as natural marks for stock identification. *Int Counc Explor Sea Commn Meet M:2, Annex 3.*
- Grahal-Nielsen O. 1999. Comment: Fatty acid signatures and classification trees: new tools for investigating the foraging ecology of seals. *Can J Fish Aquat Sci.* 56: 2219-2223.
- Grahal-Nielsen O. 2000. Discrimination between two reared stocks of cod (*Gadus morhua*) from the Faroe Islands by chemometry of the fatty acid composition in the heart tissue. *Mar Biol.* 136: 573-580.
- Grahal-Nielsen O, Barnung TN. 1985. Variations in the Fatty acid profile of marine animals caused by environmental and developmental changes. *Mar. Environ. Res.* 17: 218-221.
- Grahal-Nielsen O, Mjaavtten O. 1992. Discrimination of striped bass stocks: a new method based on chemometry of the fatty acid profile in heart tissue. *Trans. Am. Fish. Soc.* 121:307-314.
- Grahal-Nielsen O, Mjaavtten O, Tvedt E. 1993. Distinguishing between different populations of harp seal (*Phoca groenlandica*) by chemometry of the fatty acid profiles in the jaw bones. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50:1400-1404.
- Grahal-Nielsen, O.; Ulvund, K.A. 1990. Distinguishing populations of herring by chemometry of fatty acids. *Am. Fish. Soc. Symp.* 7: 566-571.
- Gorin E, Tal-Or Z, Shafrir E. 1969. Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats. *Eur J Biochem.* 8:370-375.

- Groch KR. 2005. Biologia Populacional e ecologia comportamental da baleia franca austral, *Eubalaena australis* (Desmoulins, 1822), CETACEA, MYSTICETI, no litoral sul do Brasil. PhD Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Groch KR, Palazzo JT, Flores PAC, Adler FR, Fabian ME. 2005. Recent rapid increases in the Brazilian right whale population. LAJAM. 4(1):41-47.
- Haimovici M, Martins AS, Vieira PC. 1996. Distribuição e abundância de peixes teleósteos demersais sobre a plataforma continental do sul do Brasil. Rev Bras Biol. 56:27-50.
- Hammond OS, Mizroch AS, Donovan GP. 1990. Report of the workshop on individual recognition and the estimation of cetacean population parameters. In: Hammond, P. S.; Mizroch, S. A.; Donovan, G. P. ed. Individual recognition of Cetaceans: use of photo-identification and other techniques to estimate population parameters. Cambridge, International Whaling Commission. Pp. 3-40.
- Hanks J. 1981. Characterization of population condition. Chapter 3. In: Dynamics of Large Mammal Populations. pp. 47-73. C.W. Fowler & T.D. Smith (eds.). John Wiley & Sons, New York.
- Hanson RW, Reshef L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. Annu Rev Biochem. 66:581-611.
- Hanson RW, Reshef L. 2003. Glyceroneogenesis revisited. Biochimie. 85:1119-1205.
- Herman DP, Burrows DG, Wade PR, Durban JW, Matkin CO, LeDuc RG, Barrett-Lennard LG, Krahn MM. 2005. Feeding ecology of eastern North Pacific killer whales from fatty acid, stable isotope, and organochlorine analyses of blubber biopsies. Mar Ecol Prog Ser. 302:275-291.
- Hersh SL, Duffield DA. 1990. Distinction between northwest Atlantic offshore and coastal bottlenose dolphins based on hemoglobin profile and morphometry. pp. 129-139. In: S. Leatherwood & R. R. Reeves (eds.), The Bottlenose Dolphin. San Diego: Academic Press, 635p.
- Hetzel B, Lodi L. 1993. Baleias, botos e golfinhos. Guia de identificação para o Brasil. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, Brasil.
- Hoelzel AR. 1991. Genetic Ecology of Whales and Dolphins. *Reports of the International Whaling Commission* (special issue 13). International Whaling Commission, Cambridge. [viii] + 311pp.
- Hoelzel AR, Dover GA. 1991. Mitochondrial d-loop DNA variation within and between populations of the minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Rep Int Whal Comm. Special issue. 13:171-183.
- Hoffmann LS. 1997. Padrões de associação, ocupação do habitat de superfície e aspectos ecológicos de *Tursiops truncatus* Montagu (1821) (Cetacea, Delphinidae) no Sul do Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Hofman RJ. 1995. The changing focus of marine mammal conservation. Trends Ecol Evol. 10(11):462-465.

- Hooker SK, Iverson SJ, Ostrom P, Smith SC. 2001. Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty-acid and stable-isotope analyses of biopsy samples. *Can J Zool.* 79: 1442-1454.
- Hooper SN, Paradis M, Ackman RG. 1973. Distribution of trans-6-hexadecenoic acid, 7-methyl-7-hexadecenoic acid and common fatty acids in lipids of the ocean sunfish *Mola mola*. *Lipids.* 8:509-516.
- IBAMA. 1989. Lista oficial das espécies ameaçadas da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Diário Oficial da União, 23/02/1989.
- IBAMA. 2001. Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de Ação – Versão 2. GTEMA/IBAMA. Brasília. 61 pg.
- IBAMA. 2003. Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. 19p.
- Iverson SJ. 1993. Milk secretion in marine mammals in relation to foraging: can milk fatty acids predict diet? *Symp Zool Soc Lond.* 66:263-291.
- Iverson SJ, Oftedal OT, Bowen WD, Boness DJ, Sampugna J. 1995. Prenatal and postnatal transfer of fatty acids from mother to pup in the hooded seal. *J Comp Physiol* 165:1-12.
- Iverson SJ, Arnould JPY, Boyd IL. 1997. Milk fatty acids signatures indicate both major and minor shifts in diet of lactating Antarctic fur seals. *Can J Zool.* 75:188-197.
- Iverson SJ, MacDonald J, Smith LK. 2001. Changes in diet of free-ranging black bears in years of contrasting food availability revealed through milk fatty acids. *Can J Zool.* 79: 2268-2279.
- Iverson SJ, Frost KJ, Lang S. 2002. Fat content and fatty acid composition of forage fish and invertebrates in Prince William Sound, Alaska: factors contributing to among and within species variability. *Mar Ecol Progress Ser* 241: 161-181.
- Iverson SJ, Field C, Bowen WD, Blanchard W. 2004. Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecol Monogr.* 74: 211-235.
- Iverson SJ, Stirling I, Lang LC. 2006. Spatial and temporal variation in the diets of polar bears across the Canadian Arctic: Indicators of changes in prey populations and environment. Top predators in marine ecosystems. Boyd IL, Wanless S, Camphuysen CJ, eds. Cambridge University Press, NY. Pp 98-117.
- IWC. 1986. Report of the workshop on the status of right whales. In *Right Whales: past and present status*. Brownell RL, Best PB and Prescott JH (eds). *Int Whal Comissn. (Special Issue 10):*1-33.
- IWC. 1998. Report of the Scientific Committee. *Rep Int Whal Commn.* 48:53-118.
- IWC. 2001. Report of the workshop on the comprehensive assessment of right whales: a world comparison. *J Cetacean Res Manage (Special Issue 2):*1-60.

- IUCN. 2006. 2006 IUCN Red List of threatened Species. Gland, Suiça. <http://www.iucnredlist.org/>.
- Janech MG, Chen R, Klein J, Novak MW, Mcfee W, Paul RV, Fitzgibbon WR, Ploth DW. Molecular and functional characterization of a urea transporter from the kidney of a short-finned pilot whale. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 282:R1490-R1500.
- Jefferson TA, Leatherwood S, Webber MA. 1993. FAO species identification guide – Marine Mammals of the world. Roma: FAO, 320p.
- Jensen MD, Ekberg K, Landau BR. 2001. Lipid metabolism during fasting. 2001. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 281:E789–E793.
- Käkelä R, Hyvärinen H. 1996. Site-specific fatty acid composition in adipose tissues of several northern aquatic and terrestrial mammals. *Comp Biochem Physiol B*. 115(4):501-514.
- Käkelä R, Hyvärinen H. 1998. Composition of polyunsaturated fatty acids in the liver of freshwater and marine ringed seals (*Phoca hispida* ssp.) differs largely due to the diet of seals. *Comp Biochem Physiol B*. 120:231-237.
- Käkelä R, Hyvärinen H, Vainiotol P. 1993. Fatty acid composition in liver and blubber of the Saimaa ringed seal (*Phoca hispida saimensis*) compared with that of ringed seal (*Phoca hispida botnica*) and grey seal (*Halicorus gripus*) from the Baltic. *Comp Biochem Physiol B*. 105:553-565.
- Käkelä R, Ackman RG, Hyvärinen H. 1995. Very long chain polyunsaturated fatty acids in the blubber of ringed seals (*Phoca hispida* sp.) from Lake Saimaa, Lake Ladoga, the Baltic Sea, and Spitsbergen. *Lipids*. 30:725-731.
- Kalhan SC, Mahajan S, Burkett E, Reshef L, Hanson RW. 2001. Glyceroneogenesis and the resource of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans. *J Biol Chem*. 278(18):12928-12931.
- Kamia T, Yamasaki F. 1974. Organ weights of *Pontoporia blainvillei* and *Platanista gangetica* (PLATANISTIDAE). *Sci Rep Whales Res Inst*. 26:265-270.
- Kannan K. 1997. Elevated accumulation of tributyltin and its breakdown products in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) found stranded along the US Atlantic and Gulf coasts. *Environ Sci Technol*. 31:296-301.
- Kasuya T, Brownell RL. 1979. Age determination, reproduction and growth of the franciscana *Pontoporia blainvillei*. *Sci Rep of Whal Res Ins*. 31:45-67.
- Klinowska M. 1991. Dolphins, porpoises and whales of the world. The IUCN Red Data Book. IUCN. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 429 pp.
- Koopman HT. 1998. Topographical distribution of the blubber of Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*). *J Mammal*. 79(1):260-270.



- Lauer BH, Backer BE. 1969. Whale milk I. Fin whale (*Balaenoptera physalus*) and beluga (*Delphinapterus leucas*) milk: gross composition and acid constitution. *Can J Zool.* 47:95-97.
- Lázaro M., Lessa EP, Hamilton H. 2004. Geographic genetic structure in the franciscana *Pontoporia blainvillei*: strict vicariance or isolation by distance? *Mar Mamm Sci.* 20(2):201-214.
- Leaper R, Cooke J, Trathan P, Reid K, Rowntree V, Payne R. 2006. Global climate drives southern right whale (*Eubalaena australis*) population dynamics. *Biol Lett.* 1-4.
- LeCren ED. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycles in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J Animal Ecol.* 20:201-219.
- Lockyer C. 1987. Evaluation of the role of fat reserves in relation to the ecology of North Atlantic fin and sei whales. In *Marine Mammal Energetics* (eds Huntley AC, Costa DP, Worthy GAJ, Castellini MA). Society for Marine Mammalogy, Special Publication No. 1. pp. 183-203.
- Lockyer CH. 1995. Aspects of the Morphology, Body Fat Condition and Biology of the Harbour Porpoise, *Phocoena phocoena*, in British Waters. In: *The Biology of the Phocoenids* (Eds. Bjørge, A. and Donovan, G. P.). Rep. Int. Whal. Commn. (Special Issue 16). p 199- 209.
- Mackintosh NA. 1965. *The stocks of whales.* Fishing News Book. Ltd. London. 232 pp.
- Mayes PA. 1990. *Lipídeos de significado fisiológico.* Harper: Bioquímica. Atheneu, São Paulo.
- Mehsen M, Secchi ER, Fruet PF, Di Tullio J. 2005. Temporal trends in the diet of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Rio Grande do Sul, Brazil. Paper SC/57/SM9 presented to IWC meeting . Ulsan, South Korea, May/June, 2005.
- Moore MJ, Berrow SD, Jensen BA, Carr P, Sears R, Rowntree VJ, Payne R, Hamilton PK. 1999. Relative abundance of large whales around South Georgia (1979–1998). *Mar Mamm Sci.* 15(4):1287–1302.
- Oftedal OT. 1997. Lactation in whales and dolphins: evidence of divergence between baleen- and toothed-species. *J Mammary Gland Biol* 2:205-230.
- Olavarria BC, Baker CS, Medrano GL, Aguayol LA, Caballero GS, Flórez-González L, Capella AJ, Rosenbaum HC, Garrigue C, Greaves J, Bannister JL, Jenner M, Jenner C. 2000. Stock identity of Antarctic Peninsula humpback whales inferred from mtDNA variation. Paper SC/52/1A15 presented to the IWC Scientific Committee, June 2000. Adelaide, Australia (unpublished).
- Olsen E, Grahl-Nielsen O. 2003. Blubber fatty acids of minke whales: stratification, population identification and relation to diet. *Mar Biol* 142:13–24.

- Omura H. 1984. History of grey whales in Japan. In *The Grey Whale, Eschrichtius robustus* (Lilljeborg 1861)(eds Jones ML, Swartz SL, Leatherwood S). Academic Press, Nova York. Pp.27-77.
- Ott PH. 2002. Diversidade genética e estrutura populacional de duas espécies de cetáceos do atlântico sul ocidental: *Pontoporia blainvillei* e *Eubalaena australis*. PhD Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Hamilton JL, Dillaman RM, McLellan WA, Pabst DA. 2004. Structural fiber reinforcement of keel blubber in harbor porpoise (*Phocoena phocoena*). *J Morphol.* 261(1):105-117.
- Palsboll PJ, Allen J, Berub P M, Clapham PJ, Feddersen TP, Hammond P, Jorgensen H, Katona S, Larsen AH, Larsen F, Lien J, Matt~la DK, Sigurlonsson J, Sears R, Sm~th T, Sponer R, Stevick P, Oien N. 1997. Genetic tagging of humpback \whales. *Nature Lond.* 388:767-769.
- Payne R. 1986. Long term behavioral studies of the southern right whales (*Eubalaena australis*). *Rep Int Whal Commn.* (Special Issue 10):161-168.
- Payne R, Rowntree VJ, Perkins JS. 1990. Population size, trends and reproductive parameters of right whales (*Eubalaena australis*) off Peninsula Valdes, Argentina. *Rep Int Whal Commn.* (Special issue 12):271-278.
- Perrin WF, Donovan GP, Barlow J. 1994. Gillnets and cetaceans. *Rep Int Whal Comm.* Special Issue 15. Cambridge, UK.
- Pierce GJ, Boyle PR, Watt J, Grisley M. 1993. Recent advances in diet analysis of marine mammals. *Symp Zool Soc London.* 66:241-261.
- Pinedo MC. 1982. Análise dos conteúdos estomacais de *Pontoporia blainvillei* (Gervais e D'Orbigny, 1844) e *Tursiops gephyreus* (Lahille, 1908) (Cetacea, Platanistidae e Delphinidae) na zona estuarial e costeira de Rio Grande, R.S., Brasil. Master's thesis, University of Rio Grande, Brazil.
- Pinedo MC. 1991. Development and variation of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. Thesis Philosophical Doctor in Biology) – University of California, Santa Cruz, USA, 1991. pp406.
- Pinedo MC, Polacheck T. 1999. Trends in franciscana (*Pontoporia blainvillei*) stranding rates in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *J Cetacean Res Manage.* 1(2):179-189.
- Praderi R, Pinedo MC, Crespo EA. 1989. Conservation and management of *Pontoporia blainvillei* in Uruguay, Brazil and Argentina. In *Biology and Conservation of the River Dolphins*. Edited by W.F. Perrin, R.L. Brownell, Jr., Zhou Kaya and Liu Jiankang. IUCN Occas. Paper No. 3: 52-56.
- Pond CM. 1998. *The fats of life*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Quentin LB, Ross RM, Frazer TK, Amsler MO, Wyatt-Evans C, Oakes AS. 2003. Growth of larval krill, *Euphasia superba*, in fall and winter west of the Antarctic Peninsula. *Mar Biol.* 143:833-843.
- Ramos RMA, Di Benedetto APM, Lima NRW. 2000. Growth parameteres of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia fluviatilis* (Cetacea) in northern Rio de Janeiro, Brazil. *Aquatic Mamm.* 26 (1):65-75.
- Ramos RMA, Di Benedetto APM, Siciliano S, Santos MCO, Zerbini AN, Bertozzi C, Vicente AFC, Zampirolli E, Alvarenga FS, Lima NRW. 2000. Morphology of the Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) off Southeastern Brazil: Sexual Dimorphism, Growth and Geographic Variation. *LAJAM.* 1(1):129-144, Special Issue 1.
- Read AJ. 1990. Estimation of body condition in harbor porpoises, *Phocoena phocoena*. *Can J Zool.* 68:1962-1966.
- Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW. 2003. Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *J Biol Chem.* 278(33):30413-30416.
- Reshef L, Niv J, Shapiro B. 1967. Effect of propionate on pyruvate metabolism in adipose tissue. *J Lipid Res.* 8:688–691.
- Rocha AM, Rosas FCW, Oliveira CA, Barnabé RC. 2000. Preliminary results on reproductive category determination of *Pontoporia blainvillei* by steroid hormone concentrations in bluber. In IV workshop para a Conservação da Pesquisa e Conservação da Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, no Atlântico Sul Ocidental.. 05-09 de Novembro, Porto Alegre.
- Rodríguez D, Rivero L, Bastida R. 2002. Feeding ecology of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in marine and estuarine waters of Argentina. *LAJAM.* 1:77-93.
- Romero TA, Ridgway SH, Felten D, Quaranta V. 1999. Molecular cloning and characterization of CD4 in an aquatic mammal, the white whale *Delphinapterus leucas*. *Immunogenetics.* 49:376-383.
- Rosas FCW, Lehti KK. 1996. Nutritional and mercury content of milk of the Amazon River Dolphin, *Inia geoffrensis*. *Comp Biochem Physiol A.* 115:117-119.
- Rosel PE, Dizon AE, Haygood MG. 1995. Variability of the mitochondrial control region in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on inter-oceanic and regional scales. *Can J Fish. Aquat Sci.* 52:1210-1219.
- Rosenbaum H, Clapham PJ, Allen J, Nicole-Jenner M, Flores-González L, Urbán RJ, Ladrón de Guevara P, Mori K, Yamaguchi M, Baker CS. 1995. Geographic variation in ventral fluke

- pigmentation of humpback whale, *Megaptera novaeangliae*, populations worldwide. Mar Ecol Prog Ser 12:1-7.
- Rosenbaum H, Best PB, Findlay KP, Engel MH, Pomilla C, Razafrindakoto Y, Morete ME, Vely M, Freitas AC, Baker CS, Jenner C, Nicole-Jenner M, Bannister J. 2000. Mitochondrial DNA variation among humpback whales from the wintering grounds in the South Atlantic and southwestern Indian Oceans. Paper SC/52/IA11 presented to the IWC Scientific Committee, June 2000. Adelaide, Australia (unpublished).
- Ross GJB, 1977. The taxonomy of bottlenosed dolphins *Tursiops* species in South African waters, with notes on their biology. Ann Cape Prov Mus (Nat Hist). 11:135-194.
- Rig M, Smith TG, Ritsland NA. 1988. Thermal significance of the topographical distribution of blubber in ringed seals (*Phoca hispida*). Can J Fish Aquat Sci. 45:985-992.
- Sampaio CLS, Reis MSS. 1998. Registro de cetáceos na costa nordestina. pp.187. In: 8ª Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul. Olinda, Brasil. Resumo.
- Samuel AM, Worthy GAJ. 2004. Variability in fatty acid composition of bottlenose dolphin blubber as a function of body site, season and reproductive state. Can J Zool. 82:1933-1942.
- Santos RA, Haimvici M. 2001. Cephalopods in the diet of marine mammals stranded or incidentally caught along southeastern and southern Brazil. Fish Ser. 52:99-112.
- Savon SP, Hakimi P, Crawford DR, Clamm DJ, Gurney AL, Hanson RW. 1997. The promoter regulatory regions of the genes for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the chicken and the rat have different species-specific roles in gluconeogenesis. Biochem Molec Roles of Nutrients. 276-285.
- Schell DM, Saupe SM, Haubenstock N. 1989. Bowhead whale (*Balaena mysticetus*) growth and feeding as estimated by del 13C techniques. Mar Biol. 103:433-443.
- Secchi ER, Zerbini AN, Bassoi M, Dalla Rosa L, Moller LM, Rocha-Campos CC. 1997. Mortality of franciscanas, *Pontoporia blainvillei*, in coastal gillnetting in southern Brazil. Rep Int Whal Commn. 47:653-658.
- Secchi ER, Wang JY, Murray BW, Rocha Campos CC, White BN. 1998. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. Can J Zool. 76(9): 1622 – 1627.
- Secchi ER, Ott PH, Danilewicz D. 2001. Report of the fourth workshop for the coordinated research and conservation on the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the western south Atlantic. LAJAM 1(1):11-20.

- Secchi ER, Ott PH, Danilewicz D. 2003. Effects of fishing by-catch and conservation status of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. In Marine mammals: fisheries, tourism and management issues (N. Gales, M. Hindell and R. Kirkwood, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia. Pp. 174-191.
- Siciliano S, Beneditto APM, Ramos RMA. 2001. A toninha *Pontoporia blainvillei* nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterização dos habitats e possíveis fatores de isolamento das populações. Boletim do Museu Nacional Nova Série Zoologia, Rio de Janeiro, 2001.
- Simões-Lopes PC. 1991. Interactions of coastal populations of *Tursiops truncatus*, (CETACEA, DELPHINIDAE) with the mullet artisanal fisheries in southern Brazil. Biotemas 4(2):83-94.
- Simões-Lopes PC. 1995. Ecologia comportamental do delfim *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), durante as interações com a pesca artesanal de tainhas (*Mugil spp.*) no sul do Brasil. PhD Thesis. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Simões-Lopes PC, Palazzo JT, Both MC, Ximenez A. 1992. Identificação, movimentos e aspectos biológicos da baleia franca austral (*Eubalaena australis*) na costa sul do Brasil. In Anales de la III Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de America del Sur, 25-30 Julio 1988, Montevideo, Uruguay. pp. 62-66
- Slijper EJ. 1962. Whales. Hutchinson & Co. London, 475 pp.
- Slijper EJ. 1965. A hundred years of modern whaling. Netherlands Commission for International Nature Protection. Amsterdam. 43pp.
- Smith PGR, Wayne RK. 1996. Molecular genetics approaches in conservation. Smith PGR, Wayne RK (eds). Oxford, Oxford University Press.
- Skaf MK, Secchi ER. 1994. Avistagens de cetáceos na travessia do Atlântico: Santos-Tenerife. pp.72. In: Anais da VI Reunião de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul. Florianópolis, Brasil.
- Stevick PT, Allen J, Bérubé M, Clapham PJ. 2003. Segregation of migration by feeding ground origin in North Atlantic humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). J Zool. 259:231–237.
- Sutherland WJ. 2000. The Conservation Handbook – Research, management and policy. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK.
- Tabajara L. 1992. Aspectos da relação pescador-boto-tainha no estuário do Rio Tramandaí-RS. In Os botos do Rio Tramandaí. Pref. Munic. Tramandai. p. 17-49.
- Thiele D, Chester ET, Moore SE, Sirovic A, Hildebrand JA, Friedlaender AS. 2004. Seasonal Variability in whale encounters in the Western Antarctic Peninsula. Deep-Sea Research II. 51:2311–2325.

- Thiemann GW, Stirling I. 2007. Variability in the blubber fatty acid composition of ringed seals (*Phoca hispida*) across the Canadian Arctic. *Mar Mammal Sci.* 23(2):241-261.
- Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. 1983. Fraction and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for del  $^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oceanologica.* 57:32-37.
- Ulvund KA, Grahal-Nielsen O. 1988. Fatty acid composition in eggs of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can J Fish Aquat Sci.* 45:898-901.
- Van Waerebeek K, Reyes JC, Read AJ, McKinnon JS. 1990. Preliminary observations of bottlenose dolphins from the Pacific coast of South America. In: S. Leatherwood & R. R. Reeves (eds.), *The Bottlenose Dolphin*. San Diego: Academic Press, 635p.
- Van Waerebeek K, Reyes J, Aranda C. 1992. Southern right whales (*Eubalaena australis*) off Southern Peru. *Mar Mamm Sci.* 8(1):86-88.
- Wada E, Terazaki M, Kabaya Y, Nemoto T. 1987.  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  abundances in the Antarctic Ocean with emphasis on the biogeochemical structure of the web. *Deep Sea Res.* 34:829-841.
- Walker WA. 1981. Geographical variation in morphology and biology of bottlenose dolphins (*Tursiops*) in the eastern north Pacific. National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Center. Technical Report LJ-81-03C, 45p.
- Walton MJ, Silva MA, Magalhães SM, Prieto R, Santos SR. 2007. Using blubber biopsies to provide ecological information about bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) around Azores. *J Mar Biol Ass UK.* 87:223-230.
- Weinrich MT, Lambertsen RH, Baker CS, Shilling MR, Belt CR. 1991. Behavioral responses of humpback whales (*Megaptera novaengliae*) in the Southern Gulf of Maine to biopsy sampling. pp. 91-97. In *Genetic ecology of whales and dolphins: incorporating the proceedings of the workshop on the genetic analysis of cetacean populations.* (ed. Hoelzel A R). Cambridge: International Whaling Commission, Reports of the International Whaling Commission, special issue 3.
- Wetzel DL, Reynolds E III. 2004. Definitive identification of fatty acid constituents in marine mammal tissues. *Can J Fish Aquat Sci.* 61(4):554-560.
- Würsig B, Würsig M. 1977. The photographic determination of group size, composition and stability of coastal porpoises (*Tursiops truncatus*). *Science* 198:755-56.
- Yasui, W. Y.; Gaskin, D. E. 1986. Energy budget of a small cetacean, the harbor porpoise, *Phocoena phocoena* (L.). *Ophelia*, 25:183-197.
- Zerbini AN, Bassoi M, Secchi ER, Higa A, Souza L, Dalla Rosa L, Santos MCO. 1998. Distribution and habitat characteristics of Delphinidae in south eastern and southern Brazil. In 8<sup>a</sup> Reunião

de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul. Olinda, Brasil. Resumo. pp.230.

- Zerbini AN, Andriolo A, Rocha JM, Simões-Lopes PC, Siciliano S, Pizzorno JL, Waite JM, DeMaster DP, VanBlaricom GR. 2004. Winter distribution and abundance of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) off Northeastern Brazil. *J Cetacean Res Manage.* 6(1):101–107.
- Zerbini AN, Andriolo A, Heide-Jørgensen MP, Pizzorno JL, Maia YG, VanBlaricom GR, DeMaster DP, Simões-Lopes PC, Moreira S, Bethlem C. 2004. Satellite-monitored movements of humpback whales *Megaptera novaeangliae* in the Southwest Atlantic Ocean. *Mar Ecol Prog Ser.* 313: 295–304.
- Zimmer DB, Magnuson MA. 1990. Immunochemical localization of P-enolpyruvate carboxykinase in adult and developing mouse tissues. *J Histochem Cytochem.* 38:171-178.

## 5. ANEXOS



Anexo I. Ficha de reação à biópsia.

FICHA DE COLETA E REAÇÃO

No. \_\_\_\_\_

Espécie:	Data:
Local:	Hora:            h            min
Beaufort:	Profundidade:
Velocidade do vento:	Cobertura:                    chuva: ( s / n )
Atirador:	Foto ID: n / s (# da foto:                    )
Embarcação:	Dist. do barco:
Observações:	

Circule o número de acordo com a reação (adaptado de Weinrich et al. 1991):

1. Sem reação (baleia demonstrou o mesmo comportamento de antes da biópsia).
2. Pouca reação (baleia alterou levemente seu comportamento. E.g. mergulho rápido, esquiva, desvio do deslocamento).
3. Reação moderada (baleia reagiu de forma não prolongada, e.g. batida de cauda, aceleração ou mergulho).
4. reação forte (baleia modificou seu comportamento em atividades repetitivas, e.g. batidas repetidas de cauda).

Anexo II. Artigo submetido como *short communication* para publicação na *Journal of Experimental Zoology*.

Identification of glyceroneogenesis in southern right whales (*Eubalaena australis*) and bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): the pathway of migration?

Glauco Caon<sup>1</sup>, Mônica Danielsky<sup>2,3</sup>, Pedro Fruet<sup>4</sup>, Luiz C. Kucharski<sup>1</sup>

1- Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), Departamento de Fisiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

2- Instituto Baleia Franca (IBF), Rua Manuel Álvaro de Araújo, 200, Garopaba, SC.

3- Universidade Federal de Juiz de Fora, Bairro Cidade Universitária, Juiz de Fora, MG.

4- Laboratório de Mamíferos Marinhos, Museu Oceanográfico "Prof. Eliézer C. Rios", Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Cx. P. 379, RS, 96200-970 Brazil.

## ABSTRACT

Glyceroneogenesis is the *de novo* synthesis of glycerol-3-phosphate using pyruvate as a substrate in adipose tissue. As a premise of this pathway, the animal must be submitted to a high-protein-diet and fasting. Cetaceans naturally have a high-protein diet and migratory species fast do not feed for approximately nine months while moving between the feeding and reproduction areas. Nothing is known about the biological importance of glyceroneogenesis for animals in their natural habitat. In order to study this pathway, a calf/female pair (IBF#01 and IBF#02) of southern right whales (*E. australis*) were biopsied at Siriú beach, Santa Catarina, as well as 3 bottlenose dolphins (*T. truncatus*) (LMM-P#24, LMM-P#25 and LMM-P#26) in Patos Lagoon, Rio Grande. Incubation was performed in the adipose tissue with marked pyruvate. A mean incorporation of  $83.79 \pm 29.39$  cpm/g of tissue (n= 2) was observed in the female IBF#02, while in the calf there was no pyruvate intake. Only dolphin LMM-P#26 presented an intake of 414.95 cpm/g of tissue. An alternative methodology to test the tissue integrity was also performed using liquid nitrogen and Trizol. Due to the absence of glycerol phosphatase and the low glycogen concentration in the adipose tissue, the incorporation of this pyruvate can only be explained by glyceroneogenesis. The characteristic of this pathway is the optimization of energy use, so that 60% of the fatty acids are reesterified during lipolysis. Thus, the glyceroneogenic pathway appears to help use lipid reserves, and it is important to preserve these reserves during migration.

Key words: southern right whale, *Eubalaena australis*, bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, glyceroneogenesis, Brazil.

## **Introduction**

Given its name by Gorin et al. ('69), glyceroneogenesis is the *de novo* synthesis of glycerol from precursors other than glucose or glycerol. In '67, Ballard et al. and Reshef et al. described the synthesis of glycerol-3-phosphate in the adipose tissue of mammals through this abbreviated version of glyconeogenesis. It is however possible to observe a high rate of re-synthesizing of triglycerides in mammals submitted to a high protein and carbohydrate-poor diet, submitted to fasting (Brito et al., '99; Reshef et al., '03). In this situation, the glucose offer is low or nil, and this substrate is not available for the formation of glycerol 3-phosphate, then promoting the use of pyruvate through the glyceroneogenic pathway in the adipose tissue for this purpose. This statement is based on a few fundamentals known regarding metabolic activity in this tissue, since white adipose tissue does not oxidize fatty acids to obtain a significant amount of energy, and the activity of glycerolkinase responsible for transforming glycerol into glycerol 3-phosphate is practically nil in this tissue. Furthermore, it is known that white adipose tissue does not contain enough glycogen to supply the glucose required for this reesterification. (Beale et al., '02; Hanson and Reshef, '03).

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) is the key enzyme of this pathway (Beale et al., '02). The importance of PEPCK-C as a key enzyme in glyceroneogenesis became clear already during the first studies on this pathway. As soon as it became possible to understand the specific factors of the PEPCK-C gene transcription, the mechanisms responsible for controlling this enzyme were outlined (Hanson e Reshef, '97). Even with the growing number of recent studies on glyceroneogenesis, and consequent increased understanding of the pathway and its regulation, nothing is known about the biological importance of the glyceroneogenic pathway as related to the animals in their natural environment.

In nature, cetaceans (whales and dolphins) are naturally submitted to a high-protein and carbohydrate-poor diet, and to fasting during certain stages of their biological cycle. The diet of migratory whales in the southern hemisphere is based on krill (*Euphasia superba*) in Antarctic and Sub-Antarctic waters, and they remain approximately nine months without eating during migration (Payne, '86; Best et al.; '93, Bannister et al.; '99). Odontoceti such as the bottlenose-dolphin (*Tursiops truncatus*), usually use the Brazilian coastal waters to predate fish, squid and sometimes crustaceans, their main source of food.

In order to observe the presence of the glyceroneogenic pathway in these animals and to compare migratory and non-migratory animals, the subjects studied in this experiment were the southern right whale (*Eubalaena australis*) and the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*).

## **Method**

### *3.1. Collection and processing of samples*

#### *3.1.1. Biopsies*

The biopsies were performed using a 150-pound crossbow with an arrow especially adapted to collect tissue from cetaceans (Brown et al. 1991), with a metal tip specific for small and large cetaceans, depending on the species studied. This procedure is widely used to study cetaceans and follows international recommendations which show that there are no negative reactions from the animals sampled (Brown et al., '91; Hoebel, '91; Weinrich et al., '91).

The boat approached the animals following the IWC recommendation presented by Carlson ('96) to regulate whalewatching. For this study a southern right whale (*E. australis*) mother/calf pair (IBF#01 and IBF#02) was collected in front of Siriú Beach (SC)(28°00'S,

47°35'W)(Fig. 1) in August 28, 2006, using a 9-meter long inflatable boat with a fiber bottom and two 90-HP motors.

The bottlenose dolphins LMM-P#24, LMM-P#25 and LMM-P#26 were collected in the Pato's Lagoon (32°10'S, 52°05'W)(Fig. 1) in September 27, 2005. The tissue collected from LMM-P#24 and LMM-P#26 animals was used for incubation experiments, while the adipose tissue sample collected from the LMM-P#25 animal was immersed in Trizol (Gibco®) to verify the integrity of the tissue collected for experiments with mRNA.

Part of the adipose tissue collected could be seen at the tip of the arrow used to collect biopsy material from the southern right whales. It was removed from the tip as soon as possible and immersed in liquid nitrogen to conserve the RNA, with the help of pincers and scalpel that had been previously sterilized. The time needed from the moment of collection to immersion in the liquids to conserve the tissue varied from 1 to 3 minutes. The rest of the tissue on the tip was submerged in Krebs-Ringer-bicarbonate solution for mammals, to keep the tissue alive until it reached the laboratory. In the laboratory, the adipose tissue collected was removed from the tips and separated from the skin for incubation.

### *3.1.3. Incubation of the adipose tissue*

No methods have been described for experiments on metabolism in marine mammals, such as the body temperature of the animals and incubation times. Thus, we adapted the known method for the incubation of laboratory animal tissues, in an attempt to obtain the data needed to perform this experiment.

The biopsies were preserved in saline solution from the time they were collected until they arrived in the laboratory, for approximately 30 minutes. Due to the amount of tissue collected, duplicates of the biopsies of southern right whale were made, approximately 0.1 g

for each individual collected. The samples of *T. truncatus* were analyzed whole, because only a small amount was obtained. The samples of adipose tissue were removed from the tip and separated from the skin. Then the adipose tissue was sliced with a scalpel and the slices were placed in a Krebs-Ringer-bicarbonate incubation medium (composition: NaCl = 18g/100ml, KCl = 0.92g/100ml, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0.42g/100ml, NaHCO<sub>3</sub> = 5.46g/100ml, MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) = 0.764g/100ml and Cl<sub>2</sub>Ca (2H<sub>2</sub>O) = 0.96g/100ml) with 0.15 µCi of pyruvic acid [1-C<sup>14</sup>] 13.5 mCi/nmol (NEN Du Pont), 5.0 mM of pyruvate that was unmarked and aerated with carbogen. Pyruvate-[1-C<sup>14</sup>] labelled in the first carbon was used, because this carbon is the one that will be used by glyceroneogenesis to form glycerol 3-phosphate (Boyer '05). The bath lasted 1 hour at 35° C with constant agitation in a metabolic bath. After this procedure, the slices were separated from the incubation medium, dried in filter paper, washed with a saline solution and frozen separately for later analysis. In the laboratory the total lipids were extracted from the adipose tissue using the method of Folch et al. ('57) and the marked glycerol formation was quantified using the beta counter. The result was expressed in cpm/g of tissue.

### *3.1.2. RNA extraction*

As in incubation, no methods have been described in the literature to perform this collection for marine mammals, especially for the enzymes involved in glyceroneogenesis, such as PEPCK. Therefore, we adapted the methods normally used in the laboratory, and tested them in the field to verify whether it was possible to maintain the integrity of mRNA present in the adipose tissue collected and marine mammals in the field.

For this purpose, after biopsy the excess adipose tissue that was visible on the tip was immediately frozen in liquid nitrogen or immersed in Trizol (Gibco®) while still on the boat. After this procedure, in the laboratory the tissue was submitted to RNA extraction according

to Chomczynski and Sacchi ('87). Total mRNA was reverse transcribed using a kit for cDNA synthesis, *SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Immediately after this, quantities of cDNA were submitted to PCR. A fraction of 1µl of cDNA was used as a matrix for PCR with a final volume of 50µl containing 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 2 pmol of each primer, and 1 U *AmpliTag* DNA polymerase (Gibco). The PCR was performed in a Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc.) and consisted of 35 denaturation cycles at 94° C for 1 minutes, annealing at 56° C for 1 minute and extension at 72° C for 1 minute.

A pair of specific oligonucleotides designed from the cDNA sequence of the 28S *Drosophila* (GenBank accession n. AY319386) portion identified as forward primer (5'GCGAAAAGAAAACAGTTCAGC3') and reverse primer (5'GAAGGACTTAAATCGTTAATTTCTCA3') was used to verify the integrity of the tissue collected. The PCR product was run on an 1% agarose gel, and a single band (111 base pairs) was analyzed by ImageMaster<sup>®</sup> VDS (Pharmacia Biotech). A sample of *Drosophila sp* was used for comparison, and the negative control was performed with water.

## 4. Results

### 4.1. Incorporation of pyruvate-[1-C<sup>14</sup>] by adipose tissue

The values of glycerol -C<sup>14</sup> after incubation of pyruvate-[1-C<sup>14</sup>] in the adipose tissue are shown in Table 1. In the southern right whale, only female IBF#02 presented the marked glycerol formation (83.79 ± 29.39 cpm/g of tissue, n= 2) while no glycerol -C<sup>14</sup> formation was observed in the adipose tissue of the calf. In *T. truncatus* only animal LMM-P#26 presented a glycerol formation with tissue values of 414.95 cpm/g.



#### 4.2. Integrity test of the sample collected

The synthesis of cDNA and the presence of bands of 28S gene with 111 base pairs after PCR (Fig. 2) in agarose gel, show that the tissue from LMM-P#25 is whole for the experiments with RNA, and that the appropriate method was used to collect it.

### Discussion

The data presented here show the presence of the glyceroneogenic pathway in cetaceans. The incorporation of marked pyruvate by the adipose tissue can only be explained by this pathway, since the white adipose tissue does not oxidize the fatty acids to obtain energy in significant amounts, the activity of glycerolkinase responsible for the transformation of glycerol 3- phosphate is practically nil in this tissue, and the white adipose tissue does not contain sufficient glycogen to supply the glucose needed for this re-esterification (Beale, '02; Hanson and Reshef, '03).

For migrating whales it can reasonably be accepted that, even with a thick fat layer due to a diet based on krill, other factors help optimize use these reserves. The care of the calf by the female is the activity that demands most energy in mammals.(Gittleman and Thompson, '88). Since this is the sole source of energy during approximately nine months of migration, the use of the reserves present in the fat layer is crucial for the success of the species from feeding to breeding or conception of the young, suckling and returning to the Sub-Antarctic areas. According to Berta and Sumich ('99) the gray whale, *Eschrichtius robustus*, females lose body mass while transferring energy to the calf during suckling, and they weigh approximately 25 tons at the time the calf is born. Ten weeks later, after suckling ends, they weigh 21 tons. During the same period, at the end of suckling, the calf which at birth weighed

approximately 900 kg, weighs 2100 kg. This is only possible because the milk of the migrating mysticeti species has a heavy concentration of lipids from the fat layer, with concentrations that may vary from 20% to 40%, depending on the time of lactation and the species studied (Ofstedal, '97). In this study, female IBF#02, which presents the necessary conditions to activate the glyceroneogenic pathway (fed with protein and fasting) has a mean of  $83.79 \pm 29.39$  cpm/g of tissue, while its calf (IBF#01), which was feeding on fat-rich milk did not present marked glycerol formation. Thus it can be plausibly suggested that, in order to ensure the maintenance of energy reserves in the form of fat in the adipose tissue of the mother when there is energy stress from migration and suckling, glyceroneogenesis can help as a metabolic mechanism for the conservation of lipid reserves. The characteristic of the glyceroneogenic pathway is to re-esterify up to 60% of the fatty acids mobilized in lipolysis, not allowing the total use of these reserves to obtain energy (Jensen et al., '01, Beale et al., '02; Hanson e Reshef, '03). In this way, even with all of the energy expenditure imposed by migration and reproduction, the animals have metabolic means of optimizing the use of the fatty layer.

In general, there are no studies on the lipid metabolism in cetaceans, especially large cetaceans such as whales. Thus, some important information for such studies is also lacking, making it difficult to carry out expensive projects such as those performed on marine mammals without basic data on body temperature, amount of tissue needed, saline solution which should be used, and others. These data are crucial to perform the experiments, and if they are not appropriate the whole experiment may be lost. The method in this study was created utilizing only information on the authors experience in field and physiology work. The attempt proved satisfactory, and it was possible to perform experiments to determine pyruvate-[1-C<sup>14</sup>] use and the formation of marked glycerol in the tissue sample.

In *T. truncatus* it is usual to observe these animals at the entrance to rivers, looking for food such as mullet (*Mugil* sp.) (Simões-Lopes, '91) in southern Brazil. At the time of biopsy each individual is found in a particular nutritional status, some animals will be fasting and others fed. Probably the results found for glycerol -C<sup>14</sup> formation in this species reflect this nutritional status, since animal LMM-P#24 did not present marked glycerol formation and animal LMM-P#26 presented the greatest formation among all of the individuals analyzed (414.95 cpm/g of tissue). The activity of the glyceroneogenic pathway was described in pregnant women fed proteins and in 12-hour fasting, showing that the pathway is activated in relatively short time periods (Kalhan et al., '01). The oceans have zones of higher and lower productivity (Haimovici et al., '96) and glyceroneogenesis may be helping maintain the lipid reserves in these animals while seeking new sources of food.

In metabolism studies, besides incubation as an indicator of the presence of the pathway, it is also necessary to observe the activity and sequencing of the key enzymes. For this purpose the integrity of tissue for RNA studies is essential. For this reason methods to conserve the information of the adipose tissue were tested. Both the methods of freezing in liquid nitrogen and immersion in Trizol (Gibco®) were satisfactory, as shown by the presence of a strong band for the 28S portion, used for RNA integrity tests. These methods may be used in future studies involving tissue collection in field work, for the purpose of molecular analyses.

Despite the small number of the sample, the objective of identifying glyceroneogenesis in these animals was achieved. Based on these data, new studies will be performed about this pathway, allowing more information and variables to be analyzed. The data shown here are very useful to carried out *in vitro* experiments on the metabolism of marine mammals alive in nature, since about collect biopsy are seldom in the literature.

## Acknowledgements

We thank to Eduardo Peixoto, Patrícia Martin and all the staff of Instituto Baleia Franca, Dr. Lauro Barcelos from Oceanographic Museum ‘Prof. Eliézer C. Rios’ e Dr. Eduardo R. Secchi from the Sea Turtle and Marine Mammals Laboratory (LMM/FURG), Dr. Ilma S. Brum da Silva by use the facilities of her laboratory, Maria Elizabeth Carvalho da Rocha from Environmental Protection Area of the southern right whale (APA-Baleia Franca/IBAMA), and Enrique Litman from Turismo Vida Sol e Mar, Garopaba.

## Tables

TABLE 1. Marked glycerol formation in the adipose tissue of the southern right whale (*E. australis*) and the bottlenose dolphin (*T. truncatus*).

Field code	Species	Collection site	Weight of the tissue <sup>1</sup>	Glycerol-C <sup>14</sup> *
IBF#01 <sup>a</sup>	<i>E. australis</i> (calf)	Siriú Beach (SC)	0.1178	0
IBF#01 <sup>b</sup>	<i>E. australis</i> (calf)	Siriú Beach (SC)	0.1033	0
IBF#02 <sup>a</sup>	<i>E. australis</i> (adult female)	Siriú Beach (SC)	0.1305	104.58
IBF#02 <sup>b</sup>	<i>E. australis</i> (adult female)	Siriú Beach (SC)	0.1295	63.01
LMM- P#24	<i>T. truncatus</i>	Patos’ Lagoon (RS)	0.0754	0

---

<sup>1</sup> = weight in grams

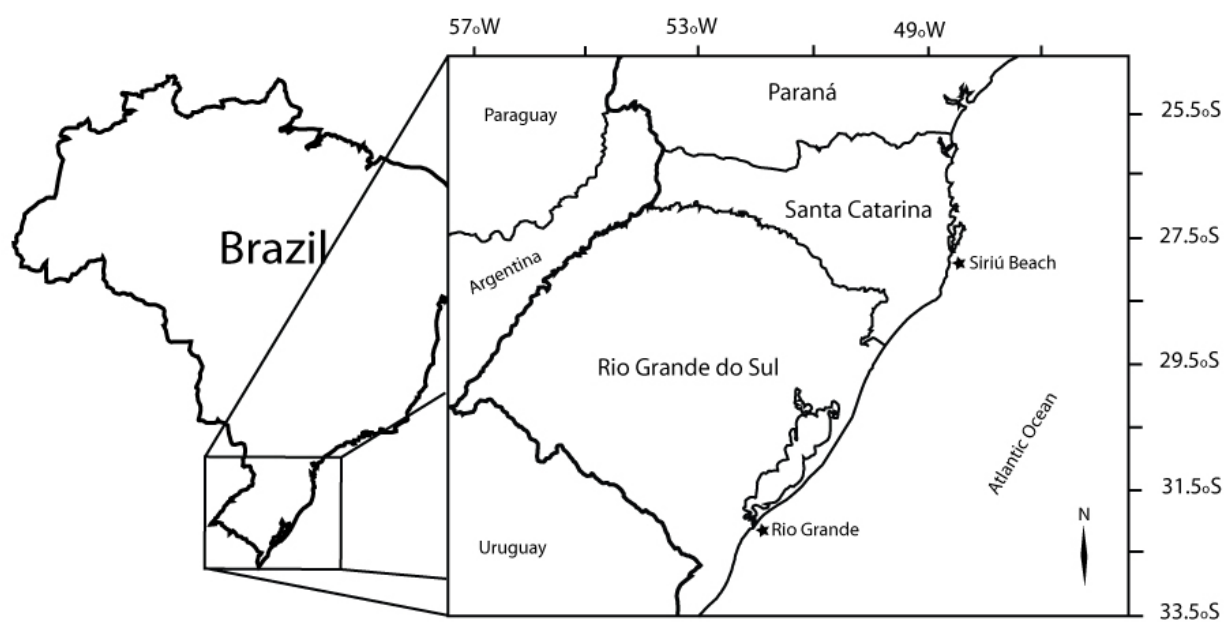
\* = values are expressed in cpm/g of tissue.

<sup>a</sup> = first duplicate.

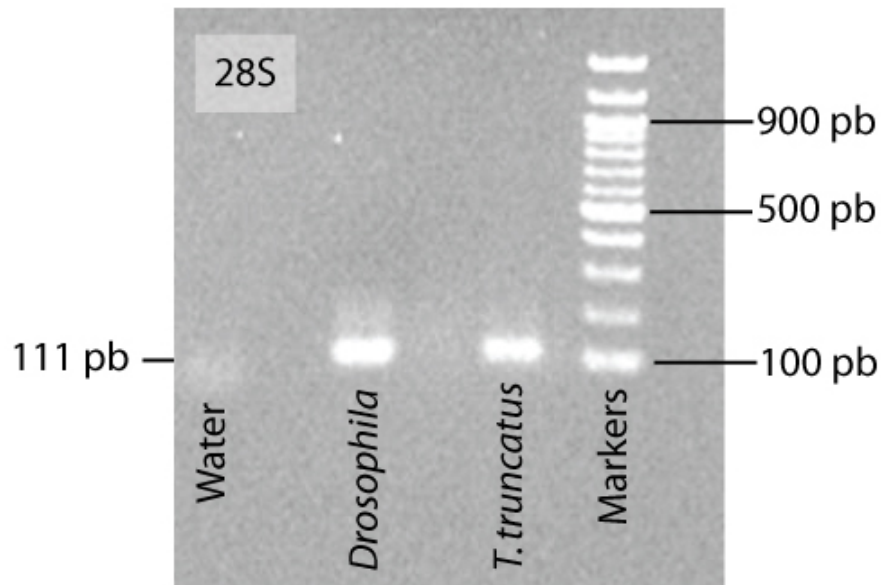
<sup>b</sup> = second duplicate.

### Figures:

**Figure 1.**



**Figure 2.**



### Literature Cited

- Ballard FJ, Hanson RW, Leveille GA. 1967. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and the Synthesis of Glyceride-Glycerol from Pyruvate in Adipose Tissue. *J Biol Chem* 242: 2746–2750.
- Banniseter JL, Pastene LA, Burnell SR. 1999. First record of movement of a southern right whale (*Eubalaena australis*) between warm water breeding grounds and the Antarctic Ocean, South of 60 degrees. *South. Mar Mamm Sci* 15(4):1337-1342.
- Beale EG, Hammer RE, Antoine B, Forest C. 2002. Glyceroneogenesis comes of age. *Faseb J* 16:1695-1696.
- Berta A, Sumich JL. 1999. Reproductive structures, patterns and strategies. In: Berta A, Sumich JL, editors. *Marine Mammals Evolutionary Biology*. London, UK: Academic Press. p 383.

- Best PB, Payne R, Rowntree V, Palazzo JT, Both MC. 1993. Long-range movements of South Atlantic right whales *Eubalaena australis*. *Mar Mamm Sci* 9(3):227–234.
- Boyer R. 2005. *Concepts in Biochemistry*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Brito MN, Brito NA, Brito SRC, Moura MAF, Kawashita NH, Kettelhut LC, Migliorini RH. 1999. Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein carbohydrate-free diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276(4):1003-1009.
- Brown M, Kraus SD, Gaskin DE. 1991. Reaction of north Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) to skin sampling for genetic and pollutant analysis. In: Hoelzel AR, editor. *Genetic ecology of whales and dolphins*. Cambridge: International Whaling Commission Special Issue 13. p 81-89.
- Carlson CA. 1996. A review of whale watching guidelines and regulations around the world. *Rep Inter Whal Commn SC/48/025:59*.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Gittleman JL, Thompson SD. 1988. Energy allocation in mammalian reproduction. *Am Zool* 28:863-875.
- Gorin E, Tal-Or Z, Shafrir E. 1969. Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats. *Eur J Biochem* 8:370-375.
- Haimovici M, Martins AS, Vieira PC. 1996. Distribuição e abundância de peixes teleósteos demersais sobre a plataforma continental do sul do Brasil. *Rev Brasil Biol* 56(1):27-50.
- Hanson RW, Reshef L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66:581-611.

- Hanson RW, Reshef L. 2003. Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 85:1119-1205.
- Hoelzel AR. 1991. Genetic Ecology of Whales and Dolphins. *Rep Inter Whal Commn* (special issue 13):1-311.
- Jensen MD, Ekberg K, Landau BR. 2001. Lipid metabolism during fasting. 2001. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E789–E793.
- Oftedal OT. 1997. Lactation in whales and dolphins: evidence of divergence between baleen- and toothed-species. *J Mammary Gland Biol* 2:205-230.
- Payne R. 1986. Long term behavioral studies of the southern right whales (*Eubalaena australis*). *Rep Int Whal Commn* (Special Issue 10):161-168.
- Reshef L, Niv J, Shapiro B. 1967. Effect of propionate on pyruvate metabolism in adipose tissue. *J Lipid Res.* 8:688–691.
- Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW. 2003. Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle. *J Biol Chem* 278(33):30413-30416.
- Simões-Lopes PC. 1991. Interactions of coastal populations of *Tursiops truncatus* (CETACEA, DELPHINIDAE), with the mullet artisanal fisheries in southern Brazil. *Biotemas* 4(2):83-94.
- Weinrich MT, Lambertsen RH, Baker CS, Shilling MR, Belt CR. 1991. Behavioral responses of humpback whales (*Megaptera novaengliae*) in the Southern Gulf of Maine to biopsy sampling. In: Hoelzel AR, editor. Genetic ecology of whales and dolphins: incorporating the proceedings of the workshop on the genetic analysis of cetacean populations. Cambridge: International Whaling Commission (Special Issue 3). p 91-97.



### **Figure Legends**

Fig. 1. Location of samples collection of *E. australis* (Siriú Beach) and *T. truncatus* (Pato's Lagoon, Rio Grande).

Fig. 2. Agarose gel showing the product of PCR for 28S from the biopsy of the adipose tissue of the bottlenose-dolphin (LMM-P#25), *T. truncatus*, from the fruit fly, *Drosophila sp.*, and the negative control (water).