

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**FILOGENIA DA REGIÃO CONTROLE DO DNA
MITOCONDRIAL E AVALIAÇÃO DA
CONTAMINAÇÃO POR METAIS NA PELE DO
LEÃO-MARINHO (*Otaria flavescens*)
ENCALHADOS NO RIO GRANDE DO SUL**

LIANE DE OLIVEIRA ARTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Adalto Bianchini
Co-orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

RIO GRANDE
07/2007

Aos meus pais.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram para realização deste trabalho contribuindo imensamente para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador Adalto Bianchini por acreditar na proposta de trabalho, pelo apoio e otimismo em todas as horas.

Ao meu co-orientador Luís Fernando Marins pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela dedicação, discussões e paciência nestes anos de trabalho e convivência.

A todos os membros do Laboratório de Bioquímica Marinha da FURG, que fazem parte de uma excelente equipe de colegas, profissionais e grandes amigos!

A toda Equipe do NEMA pelo fornecimento do material para realizar este trabalho, pelo apoio, interesse e muita emoção nas coletas!

A equipe do Laboratório de Zoofisiologia da FURG pela amizade e ajuda em especial à Sandrinha.

Ao Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUC/Porto Alegre pelas análises genéticas e apoio, em especial ao Sandro Bonatto, Cladinéia, Raquel e a Larissa pelas sugestões, questionamentos e interesse.

Ao Professor Kinas pela disposição e colaboração nas análises estatísticas. Ao Joamar Laurino pela parte inicial do seqüenciamento do material.

As minhas eternas amigas que mesmo longe são fundamentais e sempre presentes: Lu Bavaresco, Beta Basso, Beti Careli, Ro Carrer, Di Bordin, Lu Aver e Fer Barea. As amigas Dani Volcan, Tati Ávila, Ka Meyer e Lupe por todos os momentos divididos, parceria, crescimento, apoio, alegrias e paciência, sendo minha segunda família nesse tempo em Rio Grande. Aos amigos João Pedro, Ilka Filipini e Caro Schio pelo incentivo na direção marinha.

Aos amigos Frederico Ceccon, Márcio Azevedo, Ju Sandrini, Nino, Bruna, Jesus pela ajuda, companheirismo e amizade. A Maíra pela amizade e ajuda no trabalho com traduções e discussões. Ao meu amigo Marcelo pelas fotos que foram gentilmente cedidas e quase raptadas. As amigas Lea e Malu pelos ensinamentos, oportunidades de crescimento e harmonização.

Ao Leo por dividir as dificuldades e alegrias das minhas escolhas com muito carinho e muita paciência!

Às famílias Artico, Paim, Bertelli, Bernardi, Castilhos e Volcan pelo apoio, torcida e muito carinho. Ao meu querido irmão Mauri, a Ana Carpegiani e a minha tia Jussara pelo carinho e apoio;

Ao Tiago pela grande ajuda na confecção dos mapas, do banco de dados, correções e discussões em geral, mas principalmente pelo carinho, dedicação, amor e todos os momentos especiais compartilhados na etapa final!

Aos meus Pais por todo respeito e confiança, pelo apoio e incentivo em todos os momentos, pelas oportunidades que me proporcionaram, pelo amor incondicional, por tudo!!!

À Fundação Universidade do Rio Grande (FURG) pela qualidade do ensino público e gratuito, à SANC e seus motoristas pelas saídas à campo. Ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pela bolsa de estudo.

Ao apoio da Fundação O Boticário e IBAMA para realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS _____	VI
LISTA DE FIGURAS _____	VII
Resumo _____	VIII
Abstract _____	X
1. Introdução _____	1
1.2. Justificativa _____	6
1.3. Hipótese _____	7
1.4. Objetivos _____	7
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i> _____	7
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i> _____	8
2. Capítulo I: VARIABILIDADE GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLE DO mtDNA DO LEÃO-MARINHO (<i>Otaria flavescens</i> , SHAW 1800) E ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE REPRESENTANTES DE OTARIIDAE. _____	9
2.1. Introdução _____	9
2.2. Materiais e Métodos _____	11
2.2.1. <i>Área de Estudo</i> _____	11
2.2.3. <i>Extração de DNA e Seqüenciamento</i> _____	13
2.2.4. <i>Análise do mtDNA</i> _____	14
2.2.5. <i>Árvore Filogenética</i> _____	15
2.3. Resultados _____	15
2.3.1. <i>Banco de Dados</i> _____	15
2.3.3. <i>Árvore Filogenética</i> _____	18
2.4. Discussão _____	23
2.5. Conclusões _____	29
2.6. Recomendações _____	30
3. Capítulo II: CONCENTRAÇÃO DE METAIS NO EPITÉLIO DO LEÃO-MARINHO (<i>Otaria flavescens</i> , SHAW 1800) NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL (BRASIL). _____	31
3.1. Introdução _____	31
3.2. Materiais e Métodos _____	35
3.2.1. <i>Área de Estudo</i> _____	35
3.2.2. <i>Dados de Coleta</i> _____	35
3.2.3. <i>Análise de Metais</i> _____	36
3.2.4. <i>Análise Estatística</i> _____	36
3.3. Resultados _____	38
3.3.1. <i>Banco de Dados</i> _____	38
3.3.2. <i>Variações Sazonais</i> _____	41
3.3.3. <i>Varição Genética</i> _____	43
3.3.4 <i>Variações Sexuais e Biométricas</i> _____	44
3.3.5. <i>Grau de decomposição da amostra</i> _____	45
3.4. Discussão _____	46
3.5. Conclusões _____	52
4. Conclusão Geral _____	53
5. Referências Bibliográficas _____	53

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Haplótipos descritos no presente trabalho (OFA1-7) para região controle do mtDNA de <i>Otaria flavescens</i> na costa do Rio Grande do Sul (Sul do Brasil). Juntamente com os haplótipos presentes no GenBank para outras espécies de leão-marinho.	18
2	Haplótipos descritos para o gene do Citocromo <i>b</i> do mtDNA, presentes no GenBank para diferentes espécies de leão-marinho.	18
3	Concentração média (\pm erro padrão) de metais na pele do leão-marinho <i>Otaria flavescens</i> amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul, no inverno. Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos haplotípicos para cada metal analisado.	42
4	Concentração média (\pm erro padrão) de metais na pele do leão-marinho <i>Otaria flavescens</i> amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul no inverno, em função do sexo. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os sexos para cada metal analisado.	43
5	Valores dos coeficientes de correlação de Spearman (R) e da probabilidade (P) entre o comprimento total e a concentração de metais na pele de leões-marinhos <i>Otaria flavescens</i> amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul, no inverno ($n = 21$).	44
6	Concentração média (\pm erro padrão) de metais na pele do leão-marinho <i>Otaria flavescens</i> amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul no inverno, conforme o grau de decomposição da amostra (G1: animal recém-morto; G2: carcaça intacta e rigor mortis; G3: carcaça com forte cheiro e líquidos escorrendo e G4: carcaça em processo de putrefação com grandes danos no corpo). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos de amostras para cada metal analisado.	45
7	Concentrações médias de metais ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) na pele de diferentes espécies de mamíferos marinhos.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Indivíduo adulto de <i>Otaria flavescens</i> no Molhe Leste da Barra de Rio Grande (RS).	2
2	Área de estudo que compreende a Barra da Lagoa do Peixe em Mostardas até a Barra do Chuí (Chuí). As amostras de leão-marinho estão plotadas no mapa de acordo com seus dados de encalhe para o litoral do Rio Grande do Sul (Brasil).	12
3	a) Leões-marinhos no REVIS do Molhe Leste, b) Leão-marinho morto na praia do Cassino, c) Coleta de tecido para análise de metais e genética.	14
4	Rede contendo as 56 seqüências de <i>Otaria flavescens</i> com os respectivos haplótipos do mtDNA encontrados na costa do Rio Grande do Sul (Brasil). O quadrado preto indica um haplótipo ancestral intermediário. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos identificados para cada haplótipo.	17
5	Resultado da análise filogenética de representantes da família Otariidae, baseado na máxima parsimônia. A árvore foi construída a partir de um fragmento de 287pb da região controle do mtDNA contendo os sete novos haplótipos de <i>O. flavescens</i> descritos neste trabalho. Os valores dos <i>bootstrap</i> para os grupos principais estão indicados nos ramos com 1000 interações. As seqüências utilizadas para análise foram retiradas do GenBank e como grupo externo foi adotado o <i>Callorhinus ursinus</i> .	21
6	Resultado da análise filogenética de representantes da família Otariidae, baseado na máxima parsimônia. A árvore foi construída a partir de um fragmento de 360pb da região do Citocromo <i>b</i> do mtDNA contendo as seqüências presentes no GenBank. Os valores dos <i>bootstrap</i> para os grupos principais estão indicados nos ramos com 1000 interações. A seqüência utilizada para representar o grupo externo foi o <i>Callorhinus ursinus</i> .	22
7	Área de estudo com o local de coleta das amostras de leão-marinho <i>Otaria flavescens</i> e plotadas conforme as respectivas concentrações de Cd, Fe e Pb.	38
8	Área de estudo com o local de coleta das amostras de leão-marinho <i>Otaria flavescens</i> e plotadas conforme as respectivas concentrações de Ag, Cu e Zn.	39
9	Concentração de metais na pele de leões-marinhos <i>Otaria flavescens</i> amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul (n = 49) no outono (n = 9), inverno (n = 24), primavera (n = 9) e verão (n = 7).	41

Resumo

Ao longo da costa brasileira existem dois locais de agregação do leão-marinho *Otaria flavescens* (Ilha dos Lobos e Molhe Leste da Barra do Rio Grande), ambos no Rio Grande do Sul. Esses locais estão sob constante influência de impactos naturais e antrópicos (poluição e pesca), que oferecem riscos aos animais aquáticos (toxicidade e perda de variabilidade genética). Devido a bioacumulação e persistência dos metais, suas concentrações nos tecidos de mamíferos podem caracterizar grupos ecológicos distintos a partir de um perfil de contaminação ambiental. No presente estudo, o grau de diferenciação entre leões-marinhos encontrados mortos no litoral Sul do Rio Grande do Sul, entre maio de 2005 e setembro de 2006, foi avaliado através da variação genética na seqüência da região controle do DNA mitocondrial em um fragmento de 287pb. Foram descritos 7 novos haplótipos para os leões-marinhos do Atlântico Sul Ocidental, sendo o haplótipo OFA1 o mais freqüente (52%). A diversidade nucleotídica foi moderada ($\pi= 0,00615$) e a haplotípica relativamente baixa (67%). Além disso, foi observado um valor significativo (93%) entre as relações filogenéticas do D-loop mitocondrial entre as populações de *O. flavescens* do oceano Atlântico e do oceano Pacífico. Quanto aos estudos de contaminação por metais, as concentrações médias ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) de Ag (0,34), Cu (0,93), Fe (68,25), Cd (0,43), Pb (4,95) e Zn (9,81) na pele dos leões-marinhos amostrados indicaram níveis elevados de Ag, Cd, Pb e Fe. De forma geral, os maiores níveis de contaminação foram observados nos animais coletados próximos à desembocadura dos estuários da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) e Arroio Chuí (Chuí, RS). Além disso, foram

observadas variações sazonais nos níveis de contaminação por Ag e Zn. Porém, estes níveis não dependeram do haplótipo, sexo e biometria do animal, bem como do grau de decomposição da amostra. Os resultados genéticos sugerem que os leões-marinhos que ocupam o litoral sul do Rio Grande do Sul para alimentação e repouso têm origens de distintas colônias reprodutivas. No entanto, os dados de contaminação por metais sugerem que estes animais estão compartilhando o mesmo habitat ou habitats com perfis semelhantes de contaminação ambiental.

Palavras-chave: concentração de metais, filogenia, leão-marinho, mtDNA, *Otaria flavescens*, pele, poluição, variabilidade genética.

Abstract

Along the Brazilian coastline, there are only two rookeries for the South American sea lion (*Otaria flavescens*): the “Refúgio da Vida Silvestre da Ilha dos Lobos” and the “Refúgio da Vida Silvestre do Molhe Leste”. Both refuges are in the Rio Grande do Sul state (Southern Brazil). They are under constant influence of both natural and anthropogenic (pollution and fisheries) impacts, which can offer risks to the aquatic animals (toxicity and loss of genetic variability). Metal concentrations in mammal tissues can characterize different ecological groups associated with the environmental contamination profile due to the bioaccumulation and persistence of these elements. In the present study, the degree of differentiation between individuals of the south American sea lion found dead along the Southern coast of the Rio Grande do Sul, sampled between May 2005 and September 2006, was evaluated through genetic analyses. The genetic variation in the mitochondrial control region (D-loop) was evaluated in a fragment of 287bp. Seven new haplotypes were described for the South American sea lion of the Southern coast of the Rio Grande do Sul. Haplotype OFA1 was the most frequent (52%). The nucleotidic diversity was moderate ($\pi= 0.00615$) and the haplotypic diversity was relatively low (67%). Furthermore, a significant value (93%) was observed in the mtDNA (D-loop) phylogenetic relationships between populations of *O. flavescens* from the Atlantic ocean and Pacific ocean. Regarding the metal contamination studies, mean concentrations ($\mu\text{g/g}$ dry weight) of Ag (0.34), Cu (0.93), Fe (68.25), Cd (0.43), Pb (4.95) and Zn (9.81) in the skin of sea lions sampled indicated high levels of Ag, Cd, Pb and Fe. In a broad view, the higher levels of contamination

were observed in animals sampled next to the mouth of the Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) and Arroio Chuí (Chuí, RS). Furthermore, seasonal variations were observed in the Ag and Zn levels. However, these levels did not change according to the sex and total length of the animal, as well as to the degree of sample decomposition. Genetic data suggest that South American sea lion using the Southern coast of the Rio Grande do Sul for feeding and resting are originated from distinct reproductive colonies. However, metal contamination data suggest that these animals are sharing the same habitat or different habitats with similar degrees of environmental contamination.

Key-words: genetic variability, metal concentrations, mtDNA, *Otaria flavescens*, phylogeny, pollution, sea lion, skin.

1. Introdução

Recentemente, Arnason *et al.* (2006) elaboraram uma nova hipótese sobre a origem e dispersão dos pinípedes, a partir de resultados filogenéticos em conjunto com dados moleculares e novas ferramentas de paleontologia e climatologia. A monofilia dos Pinnipedia e a ocorrência de fósseis de focídeos no Atlântico e de otarídeos no Pacífico, na costa da América do Norte, sugerem que os Pinípedes se originaram neste continente. Após uma fase inicial (ocupação de lagos, rios e estuários), os organismos penetraram o ambiente marinho. Ancestrais de Phocidae se deslocaram em direção ao leste de águas Atlânticas e representantes de Otarioides (Otaridae e Odobenidae) dispersaram-se em direção oeste do Pacífico. Os ancestrais de *Otaria* colonizaram a costa oeste da América do Sul e mais tarde se dispersaram para costa sul do Atlântico, formando colônias reprodutivas ao longo destes deslocamentos.

O leão-marinho do sul *Otaria flavescens* (Shaw, 1800), também conhecido como lobo-marinho de um pêlo, pertence à família Otariidae (Figura 1). Caracteriza-se pelo focinho curto, achatado e voltado para cima, bem como pela presença de uma juba nos machos adultos (Vaz-Ferreira, 1981). No Uruguai, o comprimento máximo registrado para machos e fêmeas adultas foi de 245 e 200 cm, respectivamente (Vaz-Ferreira, 1981). No Rio Grande do Sul, estes valores foram de 266 e 204 cm, respectivamente (Rosas, 1989). Alimentam-se principalmente de peixes, crustáceos e moluscos (Vaz-Ferreira, 1981; Crespo *et al.*, 1990; Alonso *et al.*, 2000). A longevidade está em torno dos 16 anos (Rosas *et al.*, 1993).

A distribuição geográfica de *O. flavescens* para a costa da América do Sul vai de 6°S no Oceano Pacífico até 29°S no Oceano Atlântico (Vaz-Ferreira, 1981) com uma ocorrência de 13°S na Bahia (Castello, 1984). No Atlântico Sul, as colônias reprodutivas estão no Uruguai e Argentina, enquanto no Pacífico reproduzem-se no Chile e Peru (Vaz-Ferreira, 1981). A espécie não é considerada migratória, porém movimentos sazonais ocorrem quando machos adultos, após o período de reprodução, deslocam-se para o mar em busca de alimento (Vaz-Ferreira, 1981; Pinedo, 1992).

Vaz-Ferreira (1981) estima que a população mundial é composta por 275.000 leões-marinhos do sul, enquanto Reijnders *et al.* (1993) afirmaram haver apenas 210.000 indivíduos. Censos realizados na região costeira, onde estão localizadas as colônias de reprodução, apontam um total de 15.000 indivíduos no Uruguai (Szapkievich *et al.*, 1999), 22.157 na costa sul da Argentina (Schiavini *et al.*, 2004), 24.912 no norte da Argentina (Dans *et al.*, 2004), 2.747 filhotes nas Ilhas Falklands (Thompson *et al.*, 2005), 94.535 no Chile (Venegas *et al.*, 2002) e 118.220 no Peru (Márquez *et al.*, 2006).



Figura 1. Indivíduo adulto de *Otaria flavescens* no Molhe Leste da Barra de Rio Grande (RS).

Pavês *et al.* (2005) sugerem a existência de uma relação entre as condições ambientais locais e a biologia reprodutiva de otarídeos. Entre as temporadas reprodutivas de 1996-1997 e 1997-1998, estes autores observaram alterações nos padrões intraespecíficos de conduta frente a modificações ambientais locais em uma colônia na costa do Chile. Essas perturbações resultaram na diminuição do número de haréns, alteração na distribuição espacial destes haréns e diminuição da proporção etária da população.

Fenômenos climáticos como El Niño (ENSO – El Niño Southern Oscillation) e La Niña (LNSO – La Niña Southern Oscillation) são descritos como fatores responsáveis por alterações populacionais em mamíferos marinhos (Riedman, 1990; Fiedler, 2002; Majluf *et al.*, 2002; Trites *et al.*, 2003; Soto *et al.*, 2004; Turner, 2004; Soto *et al.*, 2006). Márquez *et al.* (2006), analisaram o tamanho e a distribuição populacional de *Arctocephalus australis* e *O. flavescens* no Peru, influenciados pela variabilidade ambiental no período de 1971-2006. O maior decréscimo observado para *A. australis* foi após o evento El Niño de 1997-1998, com a diminuição de 24.481 indivíduos para 6.257 (74%). O mesmo ocorreu com o leão-marinho *O. flavescens*, onde houve uma redução de 81%, passando de 144.087 indivíduos em 1997 para 27.998 em 1998. Oliveira (1999) através da caracterização das ocorrências de pinípedes no litoral norte do Rio Grande do Sul, entre 1993 e 1998, observou uma possível relação entre os anos de maior ocorrência de *Arctocephalus tropicalis* com anos de ocorrência dos fenômenos oceanográficos El Niño e La Niña. De acordo com a autora, nas duas últimas décadas foram registrados picos de

ocorrência de *A. tropicalis* para a costa Atlântica da América do Sul nos anos de 1984, 1988, 1992, 1994 e 1998. A ocorrência da espécie aconteceu nos anos marcados pelo fim do fenômeno do ENSO e pelo início do LNSO. Já os registros ocorridos em 1992 e 1994 foram marcados exclusivamente pelo ENSO. Esses resultados sugerem, segundo a autora, que em anos de ocorrência do fenômeno ENSO as condições ambientais (tróficas) do Oceano Austral poderiam ser afetadas em larga escala. De fato, a dieta de muitos pinípedes, especialmente otarídeos que vivem em regiões de clima temperado e tropical, varia de acordo com a ocorrência de fenômenos climáticos. Essa variação é causada principalmente pelo El Niño, afetando diretamente a abundância de recursos alimentares (Riedman, 1990).

Ao longo dos 8.000 km de costa do litoral brasileiro existem apenas dois locais de agregação de pinípedes: o Refúgio de Vida Silvestre da Ilha dos Lobos (REVIS) (29° 20'S, 49° 43'W) em Torres (Vaz-Ferreira, 1981) e o Refúgio de Vida Silvestre do Molhe Leste da Barra do Rio Grande (32°10'S/52°06'W) na Lagoa dos Patos, ambos no Rio Grande do Sul (Rosas, 1989; Rosas *et al.*, 1994).

O leão-marinho *O. flavescens* ocorre com maior freqüência no Brasil principalmente durante o inverno e primavera (Pinedo, 1986; Rosas, 1989; Rosas *et al.*, 1993). Sua presença está associada geralmente à abundância de alimento e à influência da corrente fria das Malvinas (Pinedo, 1986). Em sua maioria, os indivíduos são machos adultos (Rosas, 1989). As colônias de reprodução no Atlântico Sul ocidental ocorrem ao longo da costa do Uruguai, Argentina e Ilhas Malvinas, onde são formados haréns no verão (Pinedo *et al.*,

1992). Fora do período reprodutivo, os leões-marinhos deslocam-se para o norte e sul, em busca de alimento (Pinedo, 1986; Rosas *et al.*, 1994).

Os refúgios no litoral gaúcho, entre outros locais de ocorrência da espécie, estão sob constante influência de impactos naturais e antrópicos, tais como poluição e atividades relacionadas com a pesca (Grübel, 2004). Por exemplo, Rosas (1989) verificou que 29,8% dos 292 indivíduos de *O. flavescens* registrados de 1977 à 1986 apresentavam ferimentos decorrentes da ação humana. Por outro lado, os níveis crescentes de poluição marinha podem caracterizar a ameaça mais séria à sobrevivência de populações de mamíferos marinhos em muitas partes do mundo. Segundo Niencheski *et al.* (1994), um dos principais problemas dessa poluição é a contaminação por metais, os quais podem ser introduzidos no ambiente aquático principalmente por descargas de efluentes industriais, atividades de mineração e precipitação atmosférica.

A introdução de metais na água do mar causa, inevitavelmente, a sua contaminação. Por sua vez, os organismos aquáticos tendem a acumular estes metais em seus tecidos, mesmo quando a água possui níveis desses elementos abaixo da concentração máxima permitida pela legislação. Em peixes, os quais constituem a principal fonte de alimento dos leões-marinhos, a ingestão de alimento e água é a principal rota de entrada de contaminantes, sendo que esses se acumulam diferentemente em cada tecido, de acordo com suas características e em função dos processos bioquímicos internos do indivíduo (Niencheski & Fillmann, 2006). Esta bioacumulação leva, sem dúvida, a grandes riscos de contaminação da cadeia trófica. Tendo em vista que os

mamíferos marinhos são animais de alta longevidade, predadores de topo de cadeia trófica e mantêm reservas de energia sob forma de gordura, altos níveis de substâncias potencialmente tóxicas, como os metais, podem então ser detectados nos tecidos destes organismos, devido à biomagnificação destes compostos (Becker, 2000).

Apesar dos impactos aos quais as populações de *O. flavescens* estão expostas, colônias reprodutivas do norte da Argentina apresentam um aumento populacional significativo. Entre os anos de 1983 a 2002 foi observado um incremento no número total de indivíduos (5,7%), no número de nascimento por ano, tanto em colônias mais antigas (3,4%), como em colônias formadas recentemente (Dans *et al.*, 2004). De fato, *O. flavescens* é considerada uma espécie em baixo risco de extinção (IUCN, 2006). No entanto, sua conservação em unidades ambientais distantes das colônias reprodutivas e sujeitas à impactos antrópicos, como ocorre na costa do Rio Grande do Sul, exigem o estabelecimento de estratégias bem definidas. Como forma de subsidiar o estabelecimento destas estratégias de conservação faz-se necessária a realização de estudos que determinem a origem e diversidade genética, bem como avaliem os níveis de exposição aos contaminantes nos leões-marinhos que ocorrem no litoral do Rio Grande do Sul.

1.2. Justificativa

Devido à escassez de informação genética envolvendo as populações de leão-marinho da América do Sul, o presente trabalho pretende contribuir fornecendo dados de diversidade genética que auxiliem na caracterização da

população e avaliar a contaminação aquática. Esta caracterização será baseada em dados de diversidade genética, filogenia e níveis de contaminação da pele por metais em indivíduos que utilizam o litoral gaúcho como refúgio e zona de alimentação ao longo de todo ano.

1.3. Hipótese

Considerando que diferentes grupos genéticos podem ocupar diferentes habitats, que o perfil de contaminação dos indivíduos por contaminantes aquáticos pode estar relacionado ao habitat ocupado e que os metais são bioacumulados e biomagnificados em mamíferos marinhos, grupos genéticos distintos de leões-marinhos do Sul coletados na costa do Rio Grande do Sul apresentarão perfis também distintos de contaminação da pele por metais. As análises genéticas de filogenia e diversidade poderão contribuir para caracterização genética e origem da população que ocorre no litoral gaúcho.

1.4. Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Gerar dados sobre a genética e o nível de contaminação por metais que auxiliem na caracterização da população de leões-marinhos *Otaria flavescens* que utilizam a costa do Rio Grande do Sul como refúgio e zona de alimentação.

1.2.2. Objetivos específicos

- Analisar a variabilidade genética na população de *Otaria flavescens* que ocorre no litoral Sul do Rio Grande do Sul utilizando a região controle (D-loop) do mtDNA;
- Analisar as relações filogenéticas entre as espécies de leões-marinhos comparando genes mitocondriais;
- Avaliar a concentração de metais pesados (cobre, prata, cádmio, zinco, ferro e chumbo) no tecido epitelial dos leões-marinhos encontrados mortos no litoral sul do Rio Grande do Sul;

2. Capítulo I: VARIABILIDADE GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLE DO mtDNA DO LEÃO-MARINHO (*Otaria flavescens*, SHAW 1800) E ANÁLISE FILOGENÉTICA ENTRE REPRESENTANTES DE OTARIIDAE.

2.1. Introdução

Métodos moleculares aplicados em estudos de conservação biológica têm aberto novas perspectivas para utilização de técnicas que permitem analisar a escala evolutiva de diferenciação genética de um determinado organismo, sendo que a magnitude e o parentesco dessa diversidade genética podem ser avaliados. Estudos baseados em filogenias intraespecíficas de linhagens do DNA mitocondrial (mtDNA) com transmissão materna utilizam uma região específica do genoma mitocondrial para o estudo de estrutura e fluxo gênico de uma população. Estes são capazes de identificar a estrutura geográfica e subdivisões históricas ou atuais (Avice, 1996). O DNA mitocondrial pode modificar-se com o tempo e a estimativa da sua evolução varia de acordo com a região do genoma analisada e depende do organismo em questão, como foi demonstrado por Saccone *et al.* (2000). A região controle do mtDNA foi utilizada no presente trabalho (D-loop ou alça D) devido sua taxa de mutação ser mais elevada que o restante da molécula.

As principais vantagens que justificam o uso difundido do DNA mitocondrial, em estudos de populações animais, são a herança matrilinear e a concomitante transmissão de haplótipos, os quais fornecem informações sobre a história evolutiva das fêmeas. Sbisà *et al.* (1997) analisaram a estrutura da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial, a fim de comparar em nível

molecular, dez diferentes classes de mamíferos com radiação de 150 milhões de anos. Foram encontradas novas seqüências conservadas com importância evolutiva e funcional entre as espécies.

As relações filogenéticas entre os representantes da ordem Carnivora, baseadas em estudos mais atuais, suportam uma divisão entre Phocidae (focas), Otariidae (lobos e leões-marinhos) e Odobenidae (morsas). Uma associação entre as famílias Otariidae e Odobenidae suporta a formação de uma superfamília denominada de Otaroidea (Davis *et al.*, 2004, Flynn *et al.*, 2005, Arnason *et al.*, 2006). A família Otariidae é fortemente suportada por uma monofilia, sendo que a divisão em duas subfamílias: Otariinae (leões-marinhos) e Arctocephalinae (lobos-marinhos) não é considerada por muitos autores, sugerindo que ambas são parafiléticas (Wynen *et al.*, 2001, Davis *et al.*, 2004 e Delisle & Strobeck, 2005). As relações filogenéticas entre estes animais ainda não estão claras, como exemplo da divisão entre lobos e leões-marinhos, demonstrando a necessidade de estudos moleculares adicionais (Wynen *et al.*, 2001 e Fulton *et al.*, 2006). Atualmente cinco espécies de leão-marinho estão descritas: *Zalophus californianus*, com três subespécies representadas por *Z. c. californianus* (leão-marinho da Califórnia), *Z. c. wollebaeki* (leão-marinho de Galápagos), *Z. c. japonicus* (leão-marinho do Japão) e as demais espécies *Eumetopias jubatus* (leão-marinho do Alaska), *Neophoca cinerea* (leão-marinho da Austrália), *Phocarcos hookeri* (leão-marinho da Nova Zelândia) e *Otaria flavescens*, também denominada *Otaria byronia* (leão-marinho do sul), sendo que ambos pertencem à mesma espécie e atualmente as duas nomenclaturas são utilizadas. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo analisar as

relações filogenéticas entre representantes de Otariidae e avaliar a diversidade populacional de *Otaria flavescens* encalhados no litoral sul do Rio Grande do Sul. Devido à falta de estudos genéticos envolvendo as populações da América do Sul, é importante que sejam empregadas novas ferramentas moleculares que auxiliem em um conhecimento maior das espécies que ocorrem em nosso litoral, como é o caso da região controle do mtDNA.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Área de Estudo

Amostras de tecido epitelial de 52 indivíduos de leões-marinhos (*Otaria flavescens*) encontrados mortos foram coletadas através de monitoramentos mensais realizados de maio de 2005 a setembro de 2006. Além destes, mais 12 indivíduos foram utilizados para análise genética, provenientes do banco de amostras do NEMA (Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental) referentes à monitoramentos mensais realizados de junho de 2002 a junho de 2004. A área de estudo compreende o litoral sul do Estado do Rio Grande do Sul, entre a Barra da Lagoa do Peixe em Mostardas (31°21' 31.9" S, 51°02' 19.6" W) até o Molhe Leste (32°09'35.9"/52°05'52.8") (135 km) e do Molhe Oeste (32°10'S/52°06'W) até a Barra do Chuí (33°44'37.7"/53°22'10.5") (220 km) (Figura 2) totalizando de 355 km de praia. A licença N° 065/2004 para pesquisa em Unidade de Conservação corresponde ao processo N° 02001.007206/03-37.

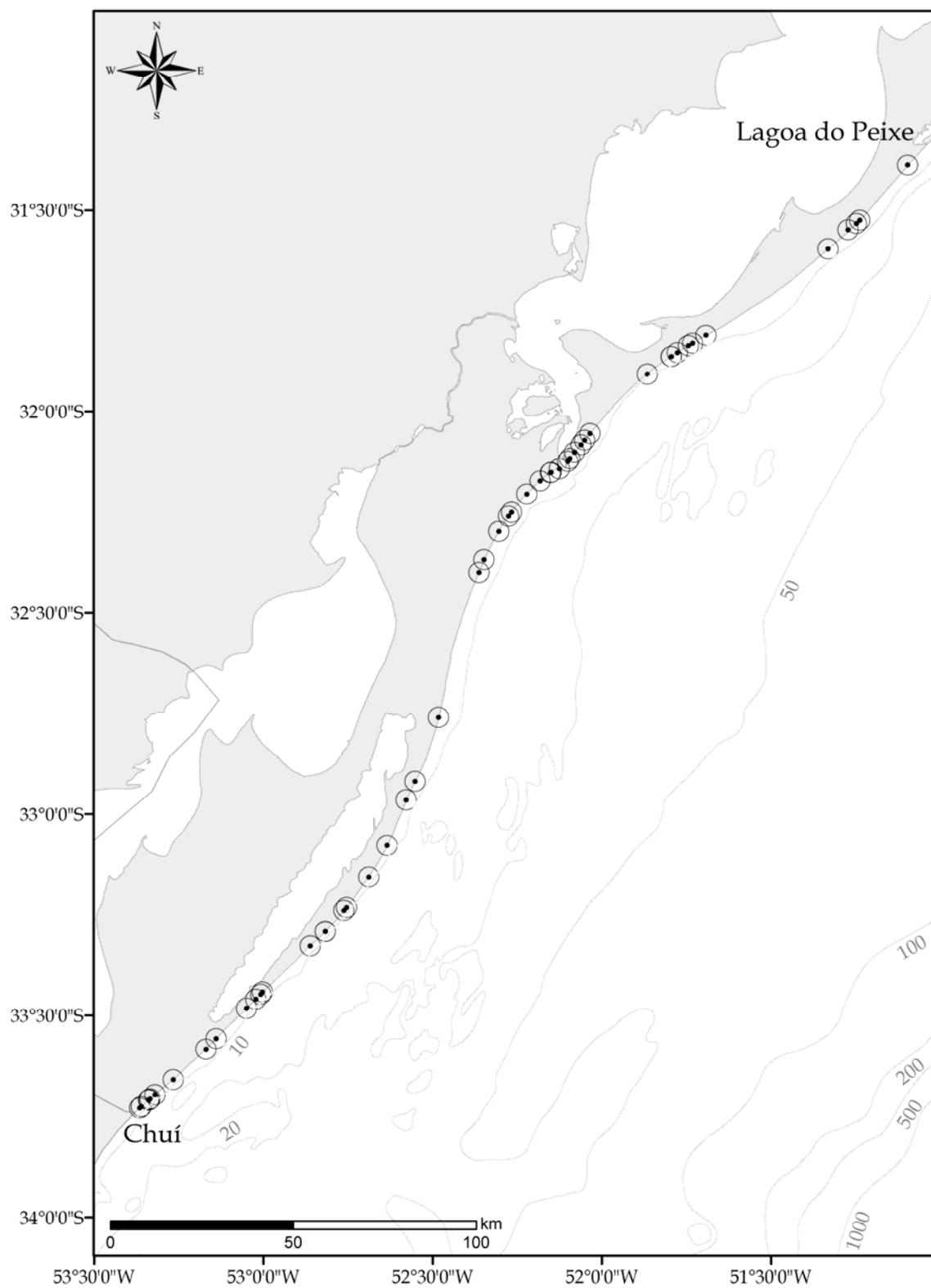


Figura 2. Área de estudo que compreende a Barra da Lagoa do Peixe em Mostardas até a Barra do Chuí (Chuí). As amostras de leão-marinho estão plotadas no mapa de acordo com seus dados de encalhe para o litoral do Rio Grande do Sul (Brasil).

2.2.2. Dados de Coleta

Após avistado o encalhe durante o monitoramento de praia, o local escolhido para retirada do tecido epitelial foi lavado com água destilada para retirada da areia e do sal. Aproximadamente um grama de pele foi retirada do animal morto com bisturi de aço inoxidável, pinça plástica e novamente lavada com água destilada. Para cada espécime coletado foi registrado sempre que possível data da coleta, estação do ano, comprimento total (da ponta do focinho ao final da cauda), posição geográfica, sexo (características morfológicas externas), grau de decomposição (G1: recém-morto; G2: carcaça intacta e *rigor mortis*; G3: carcaça com forte cheiro e líquidos escorrendo; G4: carcaça em processo de putrefação com grandes danos no corpo e G5: carcaça putrificada com partes do corpo faltando). Essas informações foram organizadas em um banco de dados para elaboração de um Sistema de Informações Geográficas (SIG). As amostras de tecido foram depositadas no laboratório de Bioquímica Marinha da FURG e acondicionadas em frascos de vidro com álcool 95% a -10°C para posterior análise de genética.

2.2.3. Extração de DNA e Seqüenciamento

Foram utilizadas para análise genética um total de 56 amostras de tecido epitelial de leão-marinho encontrados mortos na praia (Figura 3). O DNA das amostras foi extraído de acordo com Sambrook *et al.* (1989) e amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction”). Foram utilizados “primers” universais selecionados para amplificar a região controle do DNA mitocondrial, com base em estudos já realizados com mamíferos e peixes (Hoelzel, 1994), contendo as seqüências de nucleotídeos DL-FOR (5'-

TTCCCCGGTCTTGTAACC- 3') e DL-REV (5'- ATTTTCAGTGTCTTGCTTT- 3'). A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose 1%, corado com 1,5 µl de brometo de etídio, sob voltagem constante de 100 V, durante 30 minutos e visualizado em luz ultravioleta. Os produtos de PCRs foram analisados no seqüenciador automático MegaBace 1000 no Centro de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul em Porto Alegre.

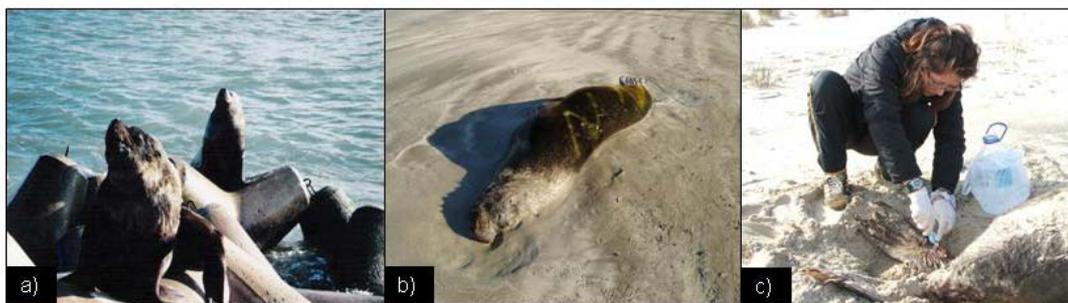


Figura 3. a) Leões-marinhos no REVIS do Molhe Leste, b) Leão-marinho morto na praia do Cassino, c) Coleta de tecido para análise de metais e genética.

2.2.4. Análise do mtDNA

As seqüências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X 1.83 (Thompson *et al.*, 1997). Os dados de polimorfismo, diversidade nucleotídica (Equação 17, Nei e Tajima, 1981) e diversidade haplotípica (Equação 7, Nei e Tajima, 1981), foram obtidos utilizando os programas Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 1999) e DNASP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). A rede contendo as variações entre os haplótipos observados foi construída com o programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000).

2.2.5. Árvore Filogenética

As análises filogenéticas foram processadas usando o pacote PHYLIP 3.6 (Phylogeny Inference Package) (Felsenstein, 1993). Os alinhamentos das seqüências nucleotídicas foram utilizados para gerar as árvores filogenéticas com o método de máxima parsimônia (DNAPARS). Uma análise de bootstrapping com 1000 interações foi conduzida utilizando o programa SEQBOOT. Na primeira árvore, foram utilizadas as seqüências nucleotídicas do D-loop dos sete haplótipos dos 56 indivíduos de *O. flavescens*. Juntamente com outras espécies de leões-marinhos, foi utilizada para análise uma matriz de dados de 289 caracteres, respectivos às seqüências nucleotídicas de uma região homóloga do D-loop, retiradas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) e que estão representadas na tabela 1. Como grupo externo foi adotado a seqüência de *Callorhinus ursinus*.

Para gerar a segunda árvore filogenética foi utilizado um fragmento de 360pb do Citocromo *b* de 15 seqüências nucleotídicas presentes no GenBank, representadas na tabela 2. Como grupo externo foi adotado a seqüência de *Callorhinus ursinus*.

2.3. Resultados

2.3.1. Banco de Dados

As informações de cada amostra referente ao haplótipo, sentido, data, estação, comprimento, grau de decomposição, sexo, coordenada geográfica, foram reunidas em um banco de dados no software MS Access para a posterior

inserção em um Sistema de Informações Geográficas (SIG). Em alguns casos, faltavam os registros das coordenadas geográficas, que foram obtidas através conversão da distância percorrida dos molhes até o animal. A inserção de todas as informações associadas aos pontos no SIG possibilitou a visualização espacial de todos os atributos (Figura 2).

2.3.2. Análise do mtDNA

Utilizou-se para análise 56 seqüências do fragmento de 287 pares de bases da região controle do genoma mitocondrial do leão-marinho *Otaria flavescens*. O alinhamento múltiplo das seqüências revelou sete novos haplótipos de mtDNA e sete sítios polimórficos envolvendo somente transições (C-35-T, C-97-T, T-100-C, G-122-A, G-123-A, A-204-G e C-216-T) (Figura 4). A seqüência nucleotídica correspondente a cada haplótipo encontrado foi depositada no Genbank (Tabela 1). A diversidade nucleotídica foi de $0,00615 \pm 0,00067$ e a diversidade haplotípica encontrada foi de $0,670 \pm 0,051$.

A maior freqüência observada foi do haplótipo OFA1 representando 51,78% (29/56) da população, seguido do haplótipo OFA2 com 19,64% (11/56), OFA3 com 17,85% (10/56), OFA4 e OFA5 com 3,57% (2/56) e OFA6 e OFA7 com 1,78% (1/56) (Figura 4).

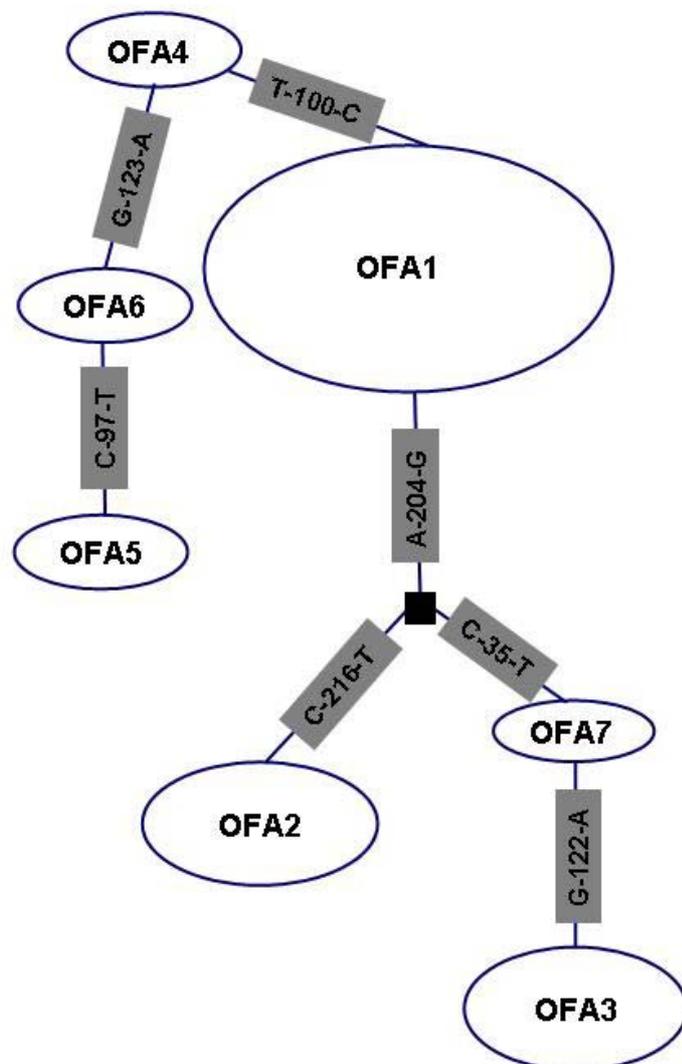


Figura 4. Rede contendo as 56 seqüências de *Otaria flavescens* com os respectivos haplótipos do mtDNA encontrados na costa do Rio Grande do Sul (Brasil). O quadrado preto indica um haplótipo ancestral intermediário. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos identificados para cada haplótipo.

Tabela 1. Haplótipos descritos no presente trabalho (OFA1-7) para região controle do mtDNA de *Otaria flavescens* na costa do Rio Grande do Sul (Sul do Brasil). Juntamente com os haplótipos presentes no GenBank para outras espécies de leão-marinho.

Espécie	Haplótipo	Número de acesso
<i>Otaria flavescens</i>	OFA1-7	EU044835-41
<i>Otaria byronia</i>	OB2	AF384420
	OB4	AF384422
	OB5	AF384423
<i>Zalophus c. japonicus</i>	ZCJA-D	AB262362-65
<i>Z. californianus</i>	ZCSN1	L37032
	ZSM26	L37028
	ZCSM34	L37031
	PB2	L37025
	PB3	L37026
<i>Z. c. wollebaeki</i>	ZCWGE1	AM422167
	ZCWFH17	AM422171
	ZCWSF25	AM422166
	ZCWIB14	AM422169
<i>Eumetopias jubatus</i>	EJ1-5	AF384414-18
<i>Phocarcos hookeri</i>	PH7	AF384413
<i>Neophoca cinerea</i>	NC1-5	AF384408-12
<i>Callorhinus ursinus</i>	CU	AF384387

Tabela 2. Haplótipos descritos para o gene do Citocromo *b* do mtDNA, presentes no GenBank para diferentes espécies de leão-marinho.

Espécie	Haplótipo	Número de acesso
<i>Otaria flavescens</i>	OFHA	AY713014
	OFHB	AY713017
	OFHC	AY713032
	OFHD	AY713034
<i>O. byronia</i>	OB1-2	AF380906-7
<i>N. cinerea</i>	NC1	AF380911
<i>P. hookeri</i>	PH7	AF380919
<i>Z. californianus</i>	ZCM02	AM422163
	ZCF03	AM422154
<i>Z. c. wollebaeki</i>	ZWMO1	AM422145
	ZWGE1	AM422148
<i>E. jubatus</i>	EJ1	AF380920
	EJ5	AF380924
<i>C. ursinus</i>	CU	AF380888

2.3.3. Árvore Filogenética

Os resultados obtidos a partir da árvore filogenética com as seqüências nucleotídicas do D-loop para os 35 haplótipos representantes de otarídeos estão representadas na figura 5. A análise demonstra haver a formação de dois

grupos genéticos agrupados com um valor de *bootstrap* (~70%) entre os haplótipos da região controle do mtDNA (OFA1-OFA7) para *Otaria flavescens* analisados nesse estudo, descritos pela primeira vez para o Atlântico Sul Ocidental. Esses haplótipos diferem dos encontrados para mesma região mitocondrial que estão descritos para *Otaria byronia* de indivíduos provenientes de Punta San Juan, Perú, (OB2, OB4 e OB5) incluídos nesta análise. Observou-se a formação de dois grupos genéticos distintos entre os representantes de otariídeos. O primeiro grupo formado pelos haplótipos do gênero *Neophoca* e um segundo grupo correspondendo às espécies pertencentes aos gêneros *Zalophus*, *Eumetopias*, *Phocarctos* e *Otaria*, agrupados com um *bootstrap* de 100%. As demais relações presentes entre os ramos mais internos da árvore demonstram haver um agrupamento significativo entre a filogenia representada pelas subespécies do gênero *Zalophus* com um valor de *bootstrap* de 92,9%. O mesmo ocorre entre os representantes do gênero *Otaria* com um valor ainda mais elevado, sendo observada a formação de dois grupos com 93,7% de *bootstrap* entre os haplótipos descritos para o Atlântico e para o Pacífico.

As relações filogenéticas presentes entre as espécies representantes de Otariidae utilizando as seqüências do gene mitocondrial do Citocromo *b* estão representadas na figura 6. A análise demonstra haver a formação de dois grupos filogenéticos com um *bootstrap* significativo de 100% entre o haplótipo representante do gênero *Neophoca* e as demais seqüências presentes na árvore. Dentro dos ramos mais internos não foi observada a formação de

grupos com um valor significativo de *bootstrap* para o gênero *Otaria*. Sendo que o mesmo ocorre para as subespécies que representam o gênero *Zalophus*.

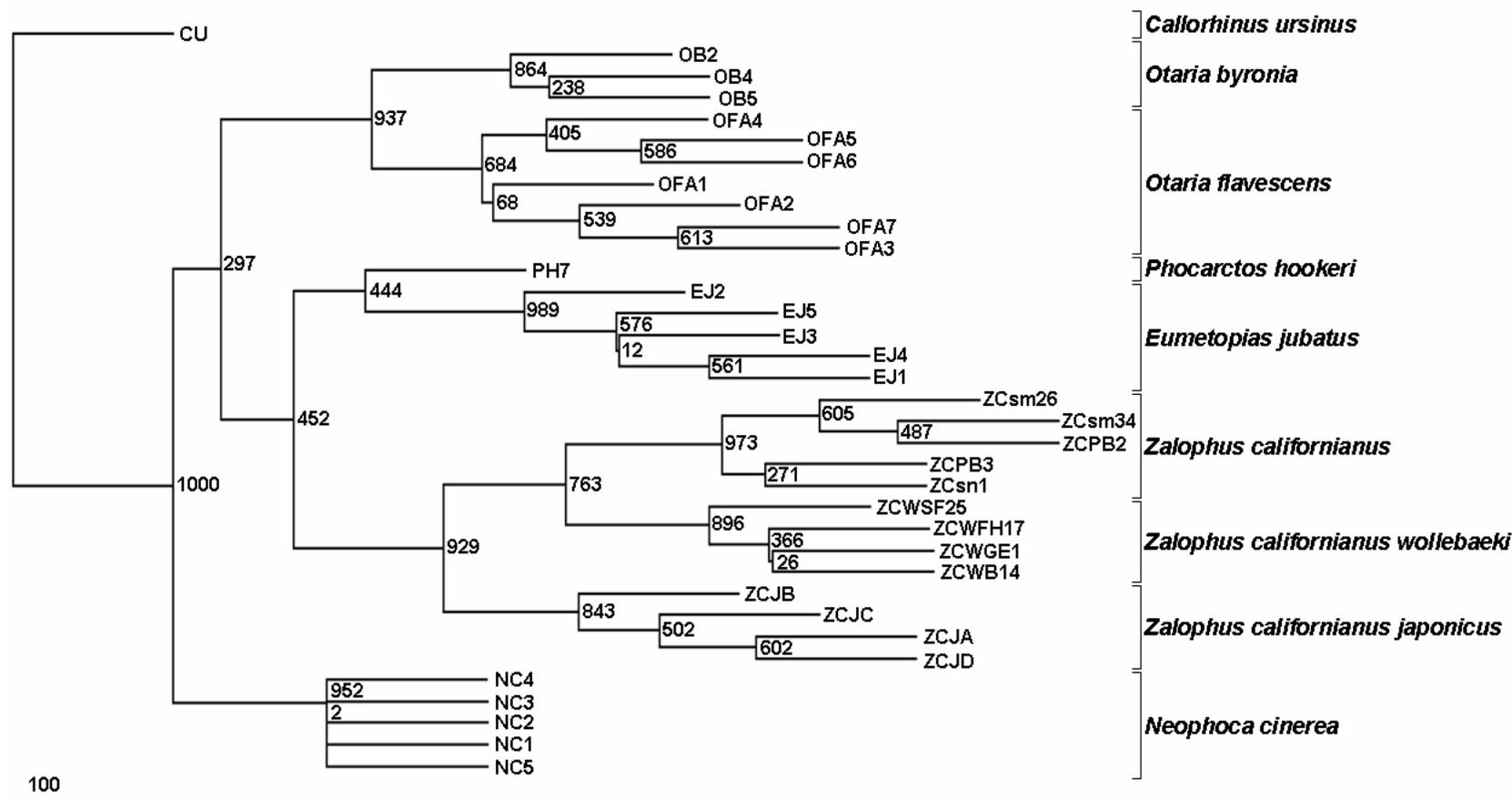


Figura 5. Resultado da análise filogenética de representantes da família Otariidae, baseada no método de máxima parsimônia. A árvore foi construída a partir de um fragmento de 287pb da região controle do mtDNA contendo os sete novos haplótipos de *O. flavescens* descritos neste trabalho. Os valores dos *bootstrap* para os grupos principais estão indicados nos ramos com 1000 iterações. As seqüências utilizadas para análise foram retiradas do GeneBank e como grupo externo foi adotado o *Callorhinus ursinus*.

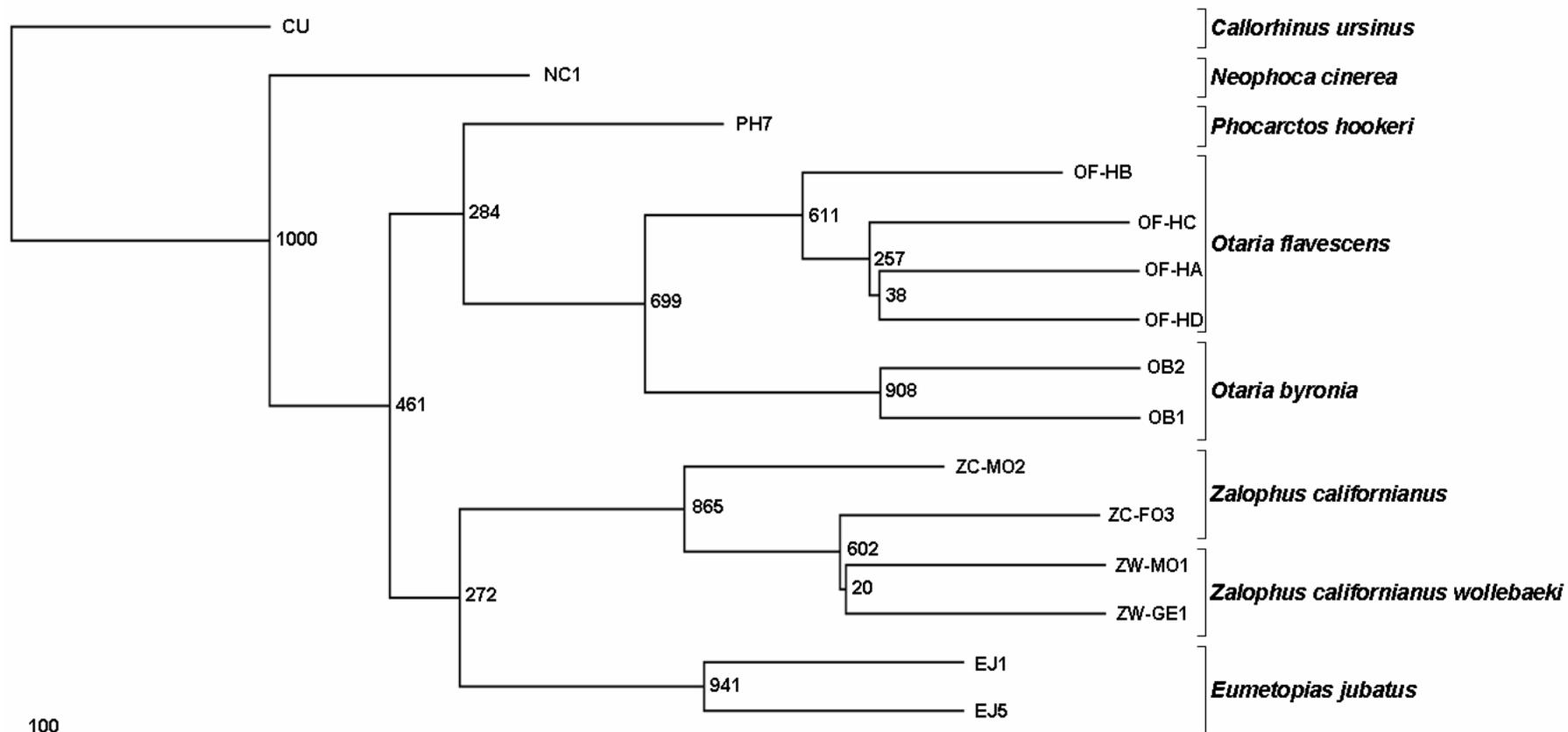


Figura 6. Resultado da análise filogenética de representantes da família Otariidae, baseado na máxima parsimônia. A árvore foi construída a partir de um fragmento de 360pb da região do Citocromo *b* do mtDNA contendo as seqüências presentes no GeneBank. Os valores dos *bootstrap* para os grupos principais estão indicados nos ramos com 1000 interações. A seqüência utilizada para representar o grupo externo foi o *Callorhinus ursinus*.

2.4. Discussão

No presente estudo, foi analisado um fragmento de 287pb da região controle do genoma mitocondrial de 56 leões-marinhos (*Otaria flavescens*) de encalhes na costa do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Os resultados desta análise demonstraram a presença de sete haplótipos (OFA1-OFA7), sendo que os mais freqüentes foram OFA1 (51,78%), OFA2 (19,64%) e OFA3 (17,85%). Ou seja, aproximadamente 90% dos indivíduos analisados compartilham apenas três dos sete haplótipos descritos.

A diversidade genética foi analisada através dos índices de diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π). O índice de diversidade nucleotídica encontrado para *O. flavescens* foi de $0,006 \pm 0,00067$. Este valor está de acordo com os valores descritos por Wynen, *et al.* (2001) para a mesma região controle do mtDNA de espécies de leões-marinhos, tais como: *Otaria byronia* da costa do Pacífico ($\pi= 0,008$), *Eumetopias jubatus* do Alaska ($\pi= 0,004$) e *Phocarctus hookeri* da Nova Zelândia ($\pi= 0,004$). Entretanto, no mesmo estudo, os autores encontraram para *Zalophus californianus* da costa da Califórnia e *Callorhinus ursinus* do Alaska, níveis significativamente mais elevados de diversidade nucleotídica ($\pi= 0,03$ e $0,027$, respectivamente). Desta forma, o resultado observado para *O. flavescens* encontra-se dentro dos níveis moderados de diversidade nucleotídica descritos para outras espécies de leões-marinhos.

Em termos de diversidade haplotípica, foi observado um valor relativamente baixo ($h=67\%$) para *O. flavescens*, quando comparado para o mesmo gene de outras espécies de pinípedes. Valores elevados de

diversidade haplotípica ($h=93\%$) foram detectados em *Eumetopias jubatus* coletados no Alaska por O'Corry-Crowe *et al.* (2006) em 531pb. Baker, *et al.* (2005), observaram para mesma espécie citada anteriormente, uma diversidade haplotípica de 91% para indivíduos coletados no Norte do Pacífico e Mar de Behring, em um fragmento de 238pb. Westlake *et al.* (2002), descrevem para *Phoca vitulina* do norte do Pacífico, uma diversidade haplotípica de $h=97\%$ analisando um fragmento de 435pb. Em amostras de lobos-marinhos (*A. philippii*) de Ilhas Chilenas, Goldsworthy *et al.* (2000) detectaram, em um fragmento de 315pb, um índice elevado ($h=90\%$). Um valor próximo ($h=91,4\%$) foi observado em amostras de *Phocoena phocoena* coletadas no Atlântico (Rosel *et al.*, 1999).

O fato da diversidade haplotípica observada no presente estudo para *O. flavescens* apresentar um valor moderado nos indivíduos coletados na costa do Rio Grande do Sul pode ser explicado por um evento evolutivo que ocorreu durante o Pleistoceno. Este evento caracterizou-se por uma seqüência de episódios glaciais que tornaram a costa do Atlântico sul ocidental um lugar inabitável (Hoelzel *et al.*, 1993). A ocorrência destes episódios glaciais gerou um impacto nas populações locais, causando um efeito de gargalo, o qual reduziu drasticamente a variabilidade genética dos mamíferos marinhos que habitavam esta região há aproximadamente 100.000 anos atrás. Este fato tem sido demonstrado por Hoelzel *et al.* (1993) para o elefante-marinho *Mirounga leonina* da Península de Valdéz (Argentina) e citado em um estudo mais recente, realizado por Túnez *et al.* (2006), com o leão-marinho *O. flavescens* e o lobo-marinho *Arctocephalus australis*. No último estudo, foi observado um

baixo nível de diversidade haplotípica para o gene do Citocromo *b* em ambas espécies, principalmente nas colônias que habitam a costa do Uruguai. Os autores atribuem esta diminuição na variabilidade ao fato de que esta região foi colonizada recentemente por estas espécies, associado ao efeito de gargalo originado pelos episódios glaciais do Pleistoceno. Desta forma, a redução da variabilidade parece ter sido um evento comum às espécies de pinípedes que habitam o Atlântico sul ocidental.

Episódios glaciais normalmente produzem eventos evolutivos importantes uma vez que se constituem em barreiras físicas à dispersão e ao fluxo gênico. Este evento, associado à distância geográfica, pode ser o motivo de uma sensível diminuição no fluxo gênico entre as colônias de leões-marinhos do Pacífico e do Atlântico sul ocidental. Este fato é evidenciado pela falta de haplótipos compartilhados entre essas populações, conforme descrito por Túnez *et al.* (2006) para o gene do Citocromo *b* e corroborado pelo presente estudo para a região controle do mtDNA. Estas evidências genéticas isoladas não acarretam na determinação imediata de unidades evolutivas independentes, sendo necessários estudos adicionais com genes nucleares, análises morfológicas e de comportamento (Moritz, 1994). Entretanto, a nomenclatura utilizada para o leão-marinho do sul, que ocorre em ambos oceanos, divergem segundo alguns autores. Desta forma, a descrição taxonômica do gênero *Otaria* aponta para a existência de uma mesma espécie que ocorre nos dois oceanos. Em um estudo realizado por Rodriguez e Bastida (1993), as características morfológicas do holótipo descrito por Shaw em 1800, correspondente a um filhote de leão-marinho (*O. flavescens*) foram

comparadas com os dados obtidos do primeiro registro de *Otaria byronia* descrito por de Blainville em 1820. O status do nome específico do leão-marinho é controverso e atualmente os dois nomes estão em uso. Os autores concluíram que o nome específico que deve ser adotado é *Otaria flavescens* devido ao holótipo de Shaw ser oriundo de uma localidade válida e com prioridade de data sobre *O. byronia*.

Com o propósito de verificar a ausência de compartilhamento de haplótipos entre leões-marinhos do Atlântico e do Pacífico, foram realizadas análises filogenéticas entre os representantes de Otariidae. Para isso, foram utilizados os haplótipos para a região controle do mtDNA descritos no presente estudo juntamente com haplótipos disponíveis no GenBank para outras espécies de leões-marinhos, incluindo os haplótipos de *O. byronia* da costa do Perú. Adicionalmente, foram realizadas análises filogenéticas com haplótipos do gene do Citocromo *b*, também disponíveis no GenBank, para espécies de leões-marinhos. O objetivo de utilizar diferentes regiões do mtDNA neste estudo é avaliar as relações filogenéticas entre os grupos com base em genes com distintas taxas evolutivas. A região controle apresenta uma taxa evolutiva cinco vezes maior que a região abrangente do gene do Citocromo *b* (Bargelloni *et al.*, 2003). Tal diferença evolutiva proporciona uma avaliação mais sensível a nível intraespecífico utilizando o D-loop, enquanto que diferenças no Citocromo *b* podem ser observadas em estudos que envolvem um nível de variabilidade interespecífica, o que tem sido utilizado para análises filogenéticas dentro de Otariidae (Wynen *et al.*, 2001).

A análise filogenética realizada com haplótipos da região controle (Figura 5) mostrou a formação de dois grupos entre os haplótipos do Peru (*O. byronia*) e do Atlântico (*O. flavescens*) com um valor de *bootstrap* de 93,7%. Este valor significativo reflete uma possibilidade de diferenciação entre os leões-marinhos do Atlântico e do Pacífico em nível subespecífico. Eventos de especiação e subespeciação têm sido descritos em leões-marinhos do gênero *Zalophus*. A espécie *Zalophus californianus* atualmente encontra-se dividida em três subespécies: *Z. c. californianus* (Califórnia), *Z. c. wollebaeki* (Ilhas Galápagos) e *Z. c. japonicus* (Japão). Esta última subespécie tem gerado controvérsia a respeito do seu status taxonômico, visto que Brunner (2004) sugeriu o nível de espécie para este leão-marinho do Japão. Um estudo filogenético recente utilizando a região controle do mtDNA (Sakahira *et al.*, 2007) reporta um valor elevado de *bootstrap* (98%) entre os ramos formados entre *Z. c. japonicus* e *Z. c. californianus*. Entretanto, os autores sugerem que o nível de subespécie para o leão-marinho do Japão está adequado, visto que ele encontra-se geneticamente muito próximo do leão-marinho da Califórnia.

No presente estudo, haplótipos da região controle do mtDNA das três subespécies de *Zalophus* foram incorporadas na análise como forma de calibração para comparar o valor observado entre o gênero *Otaria*. Surpreendentemente, o valor de *bootstrap* obtido na filogenia entre os haplótipos das subespécies de *Zalophus* já reconhecidas foi inferior (92,9%) ao observado no agrupamento entre os haplótipos de *O. byronia* e *O. flavescens*.

Na análise filogenética utilizando o Citocromo *b* os valores de *bootstrap* obtidos não demonstram qualquer valor significativo, tanto entre os haplótipos

que representam o gênero *Otaria* quanto ao observado no gênero *Zalophus* (Figura 6). Cabe ressaltar que nesta filogenia não foram incluídos haplótipos de *Z. c. japonicus*, pois estes não encontravam-se disponíveis no GenBank. De qualquer forma, este resultado indica que o nível filogenético entre *O. byronia* e *O. flavescens* pode ser considerado como intraespecífico. Para uma definição mais consistente do nível de diferenciação populacional ou subespecífico entre os leões-marinhos que ocorrem nas costas do Pacífico e do Atlântico sul ocidental, serão necessários estudos adicionais envolvendo análises filogenéticas de genes nucleares, estudos de morfologia, entre outros.

Uma análise entre o agrupamento dos haplótipos de *O. flavescens* descritos no presente estudo para o D-loop demonstra haver um agrupamento com um valor de *bootstrap* significativo (~70%) formado pelos haplótipos OFA4, OFA5 e OFA6, e outro formado por OFA1, OFA2, OFA3 e OFA7. Esse resultado pode refletir uma origem diferente para os dois grupos de haplótipos divergentes. Túnez *et al.* (2006), com base na frequência de haplótipos do Citocromo *b*, reportam a presença de dois agrupamentos de colônias reprodutivas separadas por 1.000 Km, sendo uma localizada no Uruguai e outra na Patagônia (Argentina). Desta forma, a presença de dois grupos de haplótipos com uma possível origem filogenética distinta, na costa do Rio Grande do Sul, pode representar a dispersão de indivíduos a partir dos diferentes agregados reprodutivos localizados no Uruguai e na Argentina. Levando-se em consideração o somatório da frequência dos haplótipos constituintes de cada grupo gerado na presente análise filogenética, observa-se que o grupo formado por OFA4, OFA5 e OFA6 representa apenas cerca de

9% do total (5/56), enquanto que outro formado por OFA1, OFA2, OFA3 e OFA7 representa cerca de 91% (51/56). O haplótipo OFA1 é o mais freqüente (51%) e caracteriza-se como sendo o haplótipo ancestral que deu origem a todos os outros, conforme demonstra a análise realizada com auxílio do Programa TCS (Figura 4). Levando em consideração a freqüência dos haplótipos e a distância geográfica entre as colônias reprodutivas do Uruguai e Argentina e o litoral do Rio Grande do Sul, sugere-se que a maioria dos indivíduos que chegam ao sul do Brasil são provenientes de deslocamentos realizados a partir das colônias reprodutivas localizadas no Uruguai. Portanto, apenas uma pequena parcela dos animais seriam oriundos de deslocamentos a partir das colônias Argentinas. Além disso, a menor diversidade haplotípica observada para os indivíduos analisados no presente estudo corrobora com a hipótese de dispersão a partir do Uruguai descrita por Túnez *et al.* (2006), onde demonstraram uma ausência de variabilidade para os indivíduos oriundos daquele país, a partir da análise do gene mitocondrial do Citocromo *b*.

2.5. Conclusões

- Foram identificados sete novos haplótipos de mtDNA descritos pela primeira vez para o Atlântico sul ocidental. Esses haplótipos diferem dos encontrados para mesma região mitocondrial descritos por Wynen *et al.*, (2001) de indivíduos provenientes de Punta San Juan, Peru.
- Sugere-se que a maioria dos indivíduos que ocupam o litoral do Rio Grande do Sul sejam provenientes de colônias reprodutivas do Uruguai;

- A diversidade nucleotídica encontrada foi similar com estudos já realizados em outras espécies de pinípedes. A diversidade haplotípica da região controle do mtDNA foi relativamente baixa (67%).

2.6. Recomendações

- As populações de leões-marinhos vêm sofrendo impactos no decorrer das décadas pela ação de eventos naturais, poluição, atividades pesqueiras, entre outros. Esses impactos podem trazer graves conseqüências para espécie, tais como perda de variabilidade genética, alterações fisiológicas e mudanças na dinâmica populacional. Desta forma, torna-se fundamental desenvolver ações para a conservação e o manejo dos leões-marinhos que ocupam os locais rochosos do nosso litoral como refúgio e zona de alimentação.

3. Capítulo II: CONCENTRAÇÃO DE METAIS NO EPITÉLIO DO LEÃO-MARINHO (*Otaria flavescens*, SHAW 1800) NO LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL (BRASIL).

3.1. Introdução

Além da contaminação via direta, ou seja, através do contato com água e com a atmosfera, os mamíferos aquáticos estão sujeitos aos efeitos da biomagnificação de contaminantes, podendo adquirir grandes cargas destes compostos através da ingestão de presas contaminadas (O' Shea *et al.*, 1999). Outra importante forma de contaminação destes organismos se dá através da transferência de contaminantes entre gerações pela lactação e via placentária. Por exemplo, Miranda (2004) observou que o processo lactacional representa uma forma notável de transferência de contaminantes das fêmeas lactantes para os filhotes do elefante-marinho do Sul (*Mirounga leonina*) nascidos na Ilha Elefante (Antártica).

Tendo em vista que os mamíferos marinhos são animais de alta longevidade, predadores de topo de cadeia trófica e mantêm reservas de energia sob forma de gordura, altos níveis de substâncias potencialmente tóxicas, como os metais e organoclorados, podem então ser detectados nos tecidos destes organismos, devido à biomagnificação destes compostos (Becker, 2000). Portanto, estes organismos são potencialmente vulneráveis à toxicidade de compostos químicos, como os metais, em longo prazo.

O tipo e a área de alimentação influenciam, em particular, a natureza e o grau de exposição aos contaminantes. Em geral, populações litorâneas de

mamíferos marinhos tendem a apresentar níveis mais elevados de contaminação do que as populações mais oceânicas, presumivelmente porque suas cadeias alimentares estão mais expostas às fontes de contaminação de origem terrestre (O'Shea *et al.*, 1999).

Estudos relacionados aos possíveis efeitos de compostos de origem antropogênica e de elementos traço em mamíferos marinhos têm aumentado nos últimos anos, devido ao aumento da frequência de doenças nestes organismos. Em geral, são detectados altos níveis de poluentes nos tecidos dos organismos afetados e evidências de que certos contaminantes causam efeitos deletérios na reprodução e no sistema imunológico são observadas (O'Shea *et al.*, 1999; Becker, 2000).

Ikemoto *et al.* (2004) analisaram a acumulação de 18 metais em três diferentes espécies: *Pusa sibirica*, *Pusa caspica* e *Callorhinus ursinus* do Lago Baikal, Mar Cáspio e do Japão, respectivamente. As três espécies apresentaram concentrações elevadas de Ag no fígado, Cd nos rins, Zn no músculo e Pb no pêlo. No estudo realizado por Campos (2002), foram analisadas as concentrações de metais essenciais e não-essenciais no sangue, plasma e pêlo do elefante-marinho do Sul (*M. leonina*) na Ilha Elefante (Antártica), durante o verão austral. Os resultados demonstraram concentrações elevadas de Fe no sangue, de Cu, Fe, Zn, Cd e Pb no pêlo e de Fe e Zn no plasma. Observa-se, portanto, que em ambos os estudos o pêlo demonstrou ser um tecido potencialmente utilizável para o monitoramento da exposição ambiental de mamíferos marinhos aos poluentes presentes na água do mar.

Por sua vez, a pele também tem sido comumente utilizada como material biológico para monitoramento e avaliação do impacto da contaminação de metais em mamíferos marinhos (Saeki *et al.*, 2001; Frodello *et al.*, 2002 ; Carvalho *et al.*, 2002 ; Fossi *et al.*, 2004). Além disso, tem sido utilizada como amostra biológica para determinar perfis de contaminação por elementos traço (Monaci *et al.*, 1998; Kunito *et al.*, 2002) e avaliação genética (Natoli *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 2006), visando identificar estoques populacionais distintos.

No que se refere aos estudos de contaminação no litoral Sul do Rio Grande do Sul, os maiores esforços encontram-se concentrados na região estuarina da Lagoa dos Patos e costeira adjacente (Rio Grande, RS). Niencheski *et al.* (2000) demonstraram que o sedimento da parte sul deste estuário está enriquecido por metais como Cu, Pb e Zn, os quais são provenientes de atividades urbanas, industriais e portuárias desenvolvidas no entorno da região estuarina. Por sua vez, a contaminação do ambiente pode levar a contaminação dos organismos que o habitam. Said (2003) demonstrou que as concentrações de Cu e Fe em fezes do leão-marinho *O. flavescens* no molhe leste da Barra do Rio Grande são semelhantes àqueles encontrados em fezes de outros mamíferos de ambientes não contaminados. No entanto, a autora relatou que os valores observados para Cd, Pb (não-essenciais) e Zn (essencial), sendo foram maiores que aqueles observados em fezes de outros mamíferos de ambientes não contaminados, indicando que estes valores estão de acordo com as concentrações destes metais na água ou com seus fatores de bioacumulação. Assim, o habitat ocupado por um grupo de indivíduos pode

determinar o perfil, bem como o grau de contaminação destes por metais. Esses fatos demonstram a necessidade de se adequar um plano de manejo e estratégias para conservação dos mamíferos marinhos, minimizando assim os impactos antrópicos que oferecem riscos de contaminação e perda de variabilidade genética da população (Grübel, 2004).

Quanto à genética populacional dos leões-marinhos do litoral sul do Rio Grande do Sul, observou-se no estudo apresentado no capítulo I a presença de sete diferentes haplótipos, com um agrupamento significativo (~70%) formado pelos haplótipos 4, 5 e 6, e um outro ramo formado pelos haplótipos 1, 2, 3 e 7.

Considerando os aspectos apresentados acima, foram avaliados no presente estudo os níveis de contaminação por diversos metais na pele dos leões-marinhos do Sul (*Otaria flavescens*) que utilizam o litoral sul do Rio Grande do Sul como área de refúgio e alimentação, visando estabelecer possíveis perfis de contaminação em função da diferença haplotípica observada nesta espécie. Objetiva-se, portanto, comparar dados de sazonalidade, variação genética, comprimento, sexo e decomposição da amostra. Os resultados poderão auxiliar na caracterização da origem da população, bem como na identificação de possíveis impactos biológicos associados à contaminação por metais nestes indivíduos, subsidiando assim o estabelecimento de estratégias de conservação para a espécie na costa gaúcha.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Área de Estudo

Amostras de pele de 49 leões-marinhos (*O. flavescens*) encalhados entre a Barra da Lagoa do Peixe em Mostardas (31°21'31.9"S, 51°02'19.6"W) até o Molhe Leste (32°09'35.9"S, 52°05'52.8"W) e do Molhe Oeste (32°10'S, 52°06'W) até a Barra do Chuí (33°44'37.7"S, 53°22'10.5"W) foram coletadas através de monitoramentos mensais realizados de maio de 2005 a setembro de 2006 (Figura 2). A licença N° 065/2004 para pesquisa em Unidade de Conservação corresponde ao processo N° 02001.007206/03-37. As amostras de tecido foram depositadas no laboratório de Bioquímica Marinha da FURG e acondicionadas a -10°C para posterior análise de metais.

3.2.2. Dados de Coleta

Após avistado o encalhe durante o monitoramento de praia, o local escolhido para retirada do tecido epitelial foi lavado com água destilada para retirada da areia e do sal. Aproximadamente 5g de pele foi retirada do animal morto com bisturi de aço inoxidável e pinça plástica para evitar a contaminação do material biológico. Posteriormente a amostra foi novamente lavada com água destilada abundante. Para cada amostra foram registrados, quando possível determinar o sexo (características morfológicas externas) e medir o comprimento total (da ponta do focinho ao final da cauda), bem como a posição geográfica, data da coleta, estação do ano e grau de decomposição (G1-G5).

Essas informações foram organizadas em um banco de dados para elaboração de um Sistema de Informações Geográficas (SIG).

3.2.3. Análise de Metais

Foram coletadas amostras de tecido epitelial (aproximadamente 5 g) de cada leão-marinho encontrado na praia. As amostras obtidas foram pesadas e acondicionadas em coletor plástico universal, os quais foram pré-lavados com ácido nítrico 65% para eliminação de possíveis contaminantes. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa a 50°C durante 15 dias ou até a obtenção de peso constante. Foram então adicionados 10 ml de HNO₃ (Suprapur, Merck, EUA), e a amostra permaneceu na estufa a 50°C até a digestão completa do tecido (48-72 h). As concentrações de cobre, ferro, prata, zinco, chumbo e cádmio no material digerido foram então determinadas por espectrofotometria de absorção atômica no modo chama (Avanta Plus, GBC, EUA), utilizando-se as respectivas soluções padrões de metais como referência (CELM, São Paulo, Brasil).

3.2.4. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Diferenças haplotípicas (7 haplótipos isoladamente), sazonais ou associadas ao grau de decomposição das amostras foram avaliadas através de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *a posteriori* de Tukey. Diferenças sexuais e haplotípicas (grupo A = haplótipos 1, 2, 3 e 7; grupo B = haplótipos 4, 5 e 6) para cada metal analisado foram comparados através de teste *t* de

Student. Correlações entre o comprimento total e o grau de contaminação por metais foram avaliadas através do Coeficiente de Correlação de Spearman. Todos os dados foram previamente transformados matematicamente (função log) visando atender aos pré-requisitos de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA). O nível de significância adotado foi de 95%.

3.3. Resultados

3.3.1. Banco de Dados

As informações de cada leão-marinho quanto à data e estação do ano de coleta, comprimento total, grau de decomposição, sexo, coordenadas geográficas e concentração de metal na pele foram reunidas em um banco de dados no software MS Access para a posterior inserção em um Sistema de Informações Geográficas (SIG). Quando o registro das coordenadas geográficas não foi possível, estas foram obtidas através da conversão da distância percorrida entre Molhes da Barra do Rio Grande e o local de coleta.

Considerando-se todos os animais amostrados ($n = 49$), os valores médios de concentração (\pm erro padrão) foram de $0,341 \pm 0,039$; $0,930 \pm 0,131$; $68,25 \pm 8,40$; $0,434 \pm 0,042$; $4,954 \pm 0,295$ e $9,807 \pm 0,853$ $\mu\text{g/g}$ de peso seco, para Ag, Cu, Fe, Cd, Pb e Zn, respectivamente. Foi observada uma tendência de maiores concentrações de metais em amostras encalhadas próximo à Barra do Chuí (Chuí – RS) e aos molhes da Barra da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) (Figuras 7 e 8).

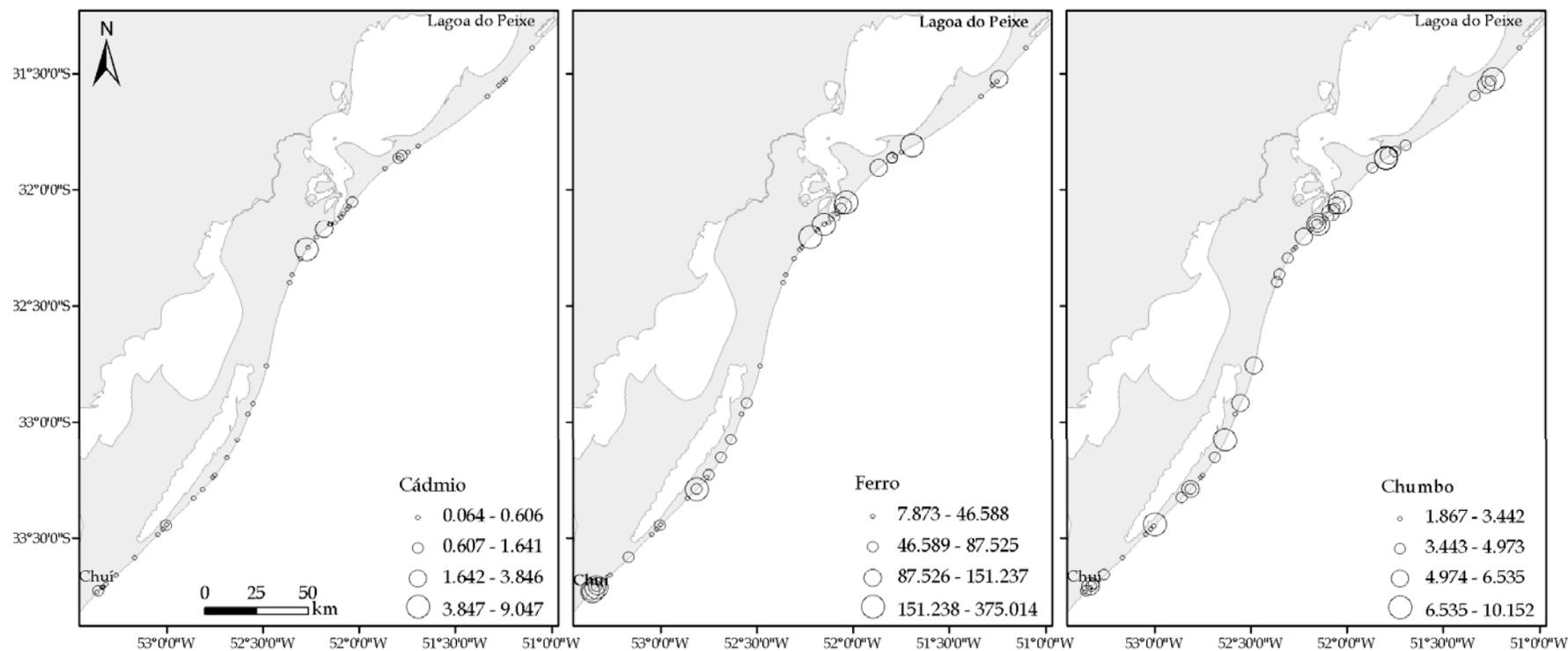


Figura 7. Área de estudo com o local de coleta das amostras de leão-marinho *Otaria flavescens* e plotadas conforme as respectivas concentrações de Cd, Fe e Pb.

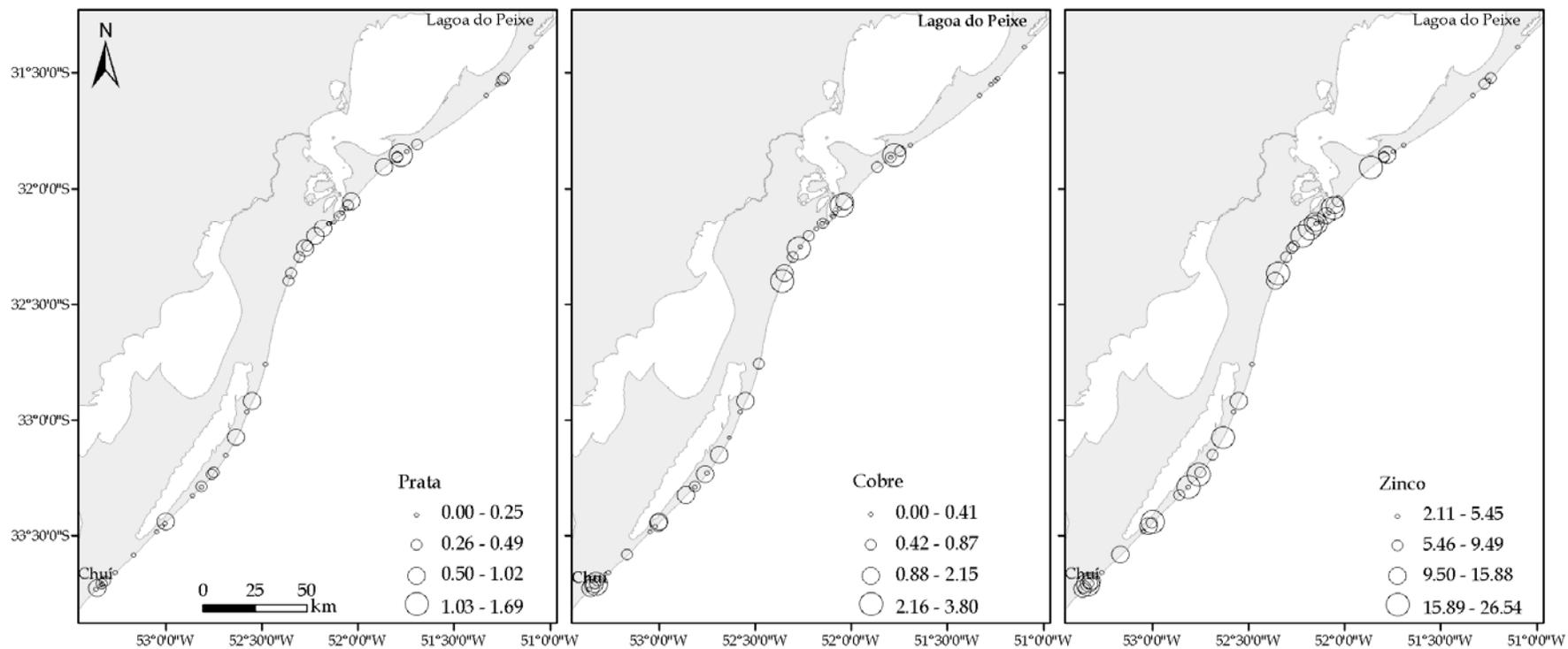


Figura 8. Área de estudo com o local de coleta das amostras de leão-marinho *Otaria flavescens* e plotadas conforme as respectivas concentrações de Ag, Cu e Zn.

3.3.2. Variações Sazonais

Para a análise das variações sazonais, foram consideradas todas as amostras coletadas, uma vez que não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de metais em função do haplótipo, do sexo e do comprimento total dos animais, bem como do grau de decomposição das amostras, como será descrito posteriormente.

Menores concentrações de Ag e de Zn foram observadas no inverno, enquanto maiores níveis de Ag foram observados na primavera ($P < 0,05$). Para os demais metais não foram observadas variações sazonais significativas (Figura 9).

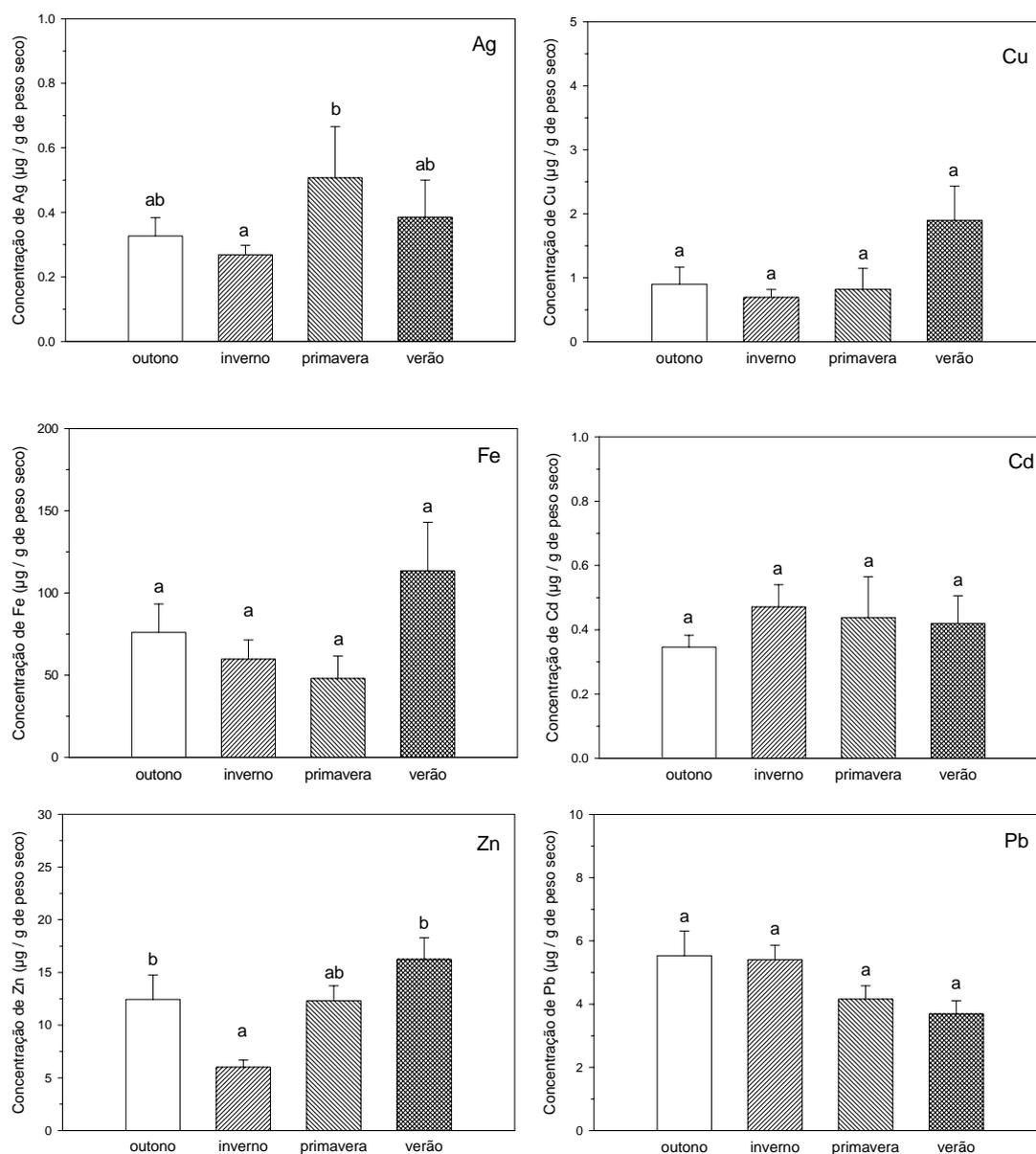


Figura 9. Concentração de metais na pele de leões-marinhos *Otaria flavescens* amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul ($n = 49$) no outono ($n = 9$), inverno ($n = 24$), primavera ($n = 9$) e verão ($n = 7$).

3.3.3. Variação Genética

Para a análise da possível variação da concentração de metais em função dos haplótipos dos leões-marinhos, somente foram consideradas as amostras coletadas no inverno e que tiveram o haplótipo e a concentração de metais analisados ($n = 18$; machos e fêmeas). Esta decisão foi tomada com base nos seguintes fatos: a maioria das amostras foi obtida nesta estação do ano, todos os leões-marinhos que apresentaram os haplótipos 4, 5 e 6 foram coletados no inverno e variações sazonais significativas nas concentrações dos metais foram observadas.

Quando os 7 haplótipos foram considerados individualmente ou agrupados (grupos A e B), não foram observadas diferenças significativas nas concentrações dos metais na pele em função do haplótipo ou dos grupos de haplótipos (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração média (\pm erro padrão) de metais na pele do leão-marinho *Otaria flavescens* amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul, no inverno. Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos haplotípicos para cada metal analisado.

Metais	Grupo haplotípico A (n=13)	Grupo haplotípico B (n=5)
Ag	0,266 \pm 0,037	0,327 \pm 0,077
Cu	0,684 \pm 0,163	0,961 \pm 0,369
Fe	63,10 \pm 17,14	72,99 \pm 33,38
Cd	0,529 \pm 0,117	0,428 \pm 0,107
Pb	5,726 \pm 0,708	5,307 \pm 0,767
Zn	6,785 \pm 1,102	5,829 \pm 1,121

3.3.4 Variações Sexuais e Biométricas

A possível influência do sexo ou da biometria sobre a concentração dos metais na pele foi avaliada utilizando-se somente as amostras coletadas no inverno, tendo em vista que a maioria das amostras de fêmeas foi coletada somente nesta estação do ano e que houve diferença sazonal significativa na concentração dos metais.

Não houve diferença significativa entre machos e fêmeas na concentração dos metais na pele dos leões-marinhos coletados no inverno (Tabela 4). Também não foram observadas correlações significativas entre o comprimento total do animal e a concentração de metais (Tabela 5).

Tabela 4. Concentração média (\pm erro padrão) de metais na pele do leão-marinho *Otaria flavescens* amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul no inverno, em função do sexo. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os sexos para cada metal analisado.

Metais	Machos (n=7)	Fêmeas (n=4)
Ag	0,235 \pm 0,058	0,309 \pm 0,105
Cu	0,580 \pm 0,165	1,198 \pm 0,374
Fe	42,08 \pm 8,09	83,23 \pm 40,02
Cd	0,623 \pm 0,181	0,473 \pm 0,133
Pb	5,197 \pm 0,945	4,501 \pm 0,199
Zn	5,527 \pm 0,909	9,424 \pm 2,788

Tabela 5. Valores dos coeficientes de correlação de Spearman (R) e da probabilidade (P) entre o comprimento total e a concentração de metais na pele de leões-marinhos *Otaria flavescens* amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul, no inverno (n = 21).

Metais	R	P
Ag	-0,170	0,474
Cu	-0,216	0,346
Fe	0,089	0,701
Cd	-0,016	0,947
Pb	0,178	0,440
Zn	-0,231	0,313

3.3.5. Grau de decomposição da amostra

A possível influência do grau de decomposição da amostra sobre a concentração dos metais na pele foi avaliada utilizando-se somente as amostras coletadas no inverno (machos e fêmeas), tendo em vista que a maioria das amostras foi coletada nesta estação do ano e que houve diferença sazonal significativa na concentração de Zn e Ag.

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações dos metais analisados (Ag, Cu, Fe, Cd, Zn e Pb) entre as classes de amostras conforme o grau de decomposição das mesmas (Tabela 6).

Tabela 6. Concentração média (\pm erro padrão) de metais na pele do leão-marinho *Otaria flavescens* amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul no inverno, conforme o grau de decomposição da amostra (G1: animal recém-morto; G2: carcaça intacta e rigor mortis; G3: carcaça com forte cheiro e líquidos escorrendo e G4: carcaça em processo de putrefação com grandes danos no corpo). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos de amostras para cada metal analisado.

Metais	G1 (n=3)	G2 (n=4)	G3 (n=12)	G4 (n=4)
Ag	0,327 \pm 0,090	0,152 \pm 0,033	0,261 \pm 0,040	0,338 \pm 0,094
Cu	0,777 \pm 0,075	0,686 \pm 0,268	0,566 \pm 0,167	1,169 \pm 0,387
Fe	48,53 \pm 13,62	43,82 \pm 13,67	64,04 \pm 18,82	80,18 \pm 40,63
Cd	0,579 \pm 0,103	0,680 \pm 0,324	0,385 \pm 0,069	0,456 \pm 0,139
Pb	7,167 \pm 1,444	3,638 \pm 0,349	6,048 \pm 0,701	4,126 \pm 0,511
Zn	6,171 \pm 0,648	8,084 \pm 3,319	5,448 \pm 0,706	6,332 \pm 1,158

3.4. Discussão

As concentrações de Ag, Cd, Pb e Fe na pele de leões-marinhos *Otaria flavescens* que utilizam o litoral sul do Rio Grande do Sul (RS) como área de refúgio e alimentação foram consideradas elevadas quando comparadas com aquelas relatadas em outros estudos envolvendo diversas espécies de mamíferos marinhos. Por sua vez, as concentrações de Cu e Zn foram consideradas baixas (Tabela 7).

A pele foi utilizada para esse estudo devido sua capacidade de monitorar e avaliar a concentração de metais presente nos mamíferos marinhos apresentando um perfil de contaminação recente do animal, ser um tecido de fácil coleta e decomposição lenta quando comparado com tecidos mais internos e também por ser capaz de caracterizar estoques populacionais distintos em estudos genéticos. As concentrações analisadas em *O. flavescens*

foram comparadas apenas com estudos realizados na pele de diferentes espécies de mamíferos marinhos e expressas em peso seco. Essa decisão foi baseada na necessidade de padronizar o material biológico para comparar com os resultados presentes na literatura.

A média da concentração de Ag na pele dos leões-marinhos encalhados no litoral gaúcho apresentou um valor elevado (0,34 µg/g). Os valores descritos por Saeki *et al.* (2001) para duas fêmeas de *Callorhinus ursinus* de 7 e 14 anos de idade foram de 0,0012 e 0,0044 µg/g de prata, respectivamente. As amostras de pele foram coletadas no norte do Oceano Pacífico e apresentam baixos níveis de contaminação quando comparadas com os valores descritos no presente estudo. O valor de Cd (0,43 µg/g) também foi elevado nos leões-marinhos quando comparado ao maior valor relatado na literatura (0,29 µg/g) na pele de *Ziphius cavirostris* do Mediterrâneo (Frodello *et al.*, 2002). Porém, o valor médio de concentração de Fe nas amostras de pele de *O. flavescens* no presente estudo foi de 68,25 µg/g, sendo bem similar àqueles encontrados na pele de *Tursiops truncatus* (40 µg/g) e *Delfinus delphis* (65 µg/g) amostrados em águas portuguesas no Oceano Atlântico (Carvalho *et al.*, 2002). Além disso, os valores de Pb relatados por estes autores para *T. truncatus* (5,2 µg/g) e *D. delphis* (5,3 µg/g) também foram bastante semelhantes àqueles observados no presente estudo para *O. flavescens* (4,954 µg/g). Essas concentrações, similares ao encontrado para a costa do Rio Grande do Sul são caracterizadas, segundo os autores, como níveis elevados de contaminação presente nos organismos.

Geralmente, altas concentrações de metais são encontradas em espécies coletadas em regiões costeiras. Por exemplo, um estudo direcionado para avaliar a ocorrência de poluentes em pinípedes e cetáceos que ocorrem no litoral da Argentina foi desenvolvido por Marcovecchio *et al.* (1994). Na maioria dos casos, incluindo o leão-marinho *O. flavescens*, estes autores observaram altas concentrações de metais, como é o caso do Cd, em animais encalhados ou capturados acidentalmente. Neste contexto, as altas concentrações de Ag, Cd, Fe e Pb encontradas na pele dos leões-marinhos *O. flavescens* amostrados no litoral sul do Rio Grande do Sul, corroboram com a idéia de que a distribuição global de contaminantes está também afetando os ecossistemas do sudoeste do Oceano Atlântico (Marcovecchio *et al.*, 1994).

Tabela 7. Concentrações médias de metais ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) na pele de diferentes espécies de mamíferos marinhos.

Espécies	Ag	Cu	Fe	Cd	Pb	Zn
<i>Otaria flavescens</i>	0,34 ^a	0,93 ^a	68,25 ^a	0,43 ^a	4,95 ^a	9,8 ^a
<i>Callorhinus ursinus</i>	0,0012 ^{b**} 0,0044 ^{b***}					
<i>Ziphius cavirostris</i>		3,8 ^c		0,29 ^c	2,7 ^c	688 ^c
<i>Tursiops truncatus</i>		5,3 ^c 5,9 ^d	40 ^d	0,09 ^c	2,5 ^c 5,2 ^d	1107 ^c 180 ^d
<i>Delfinus delphis</i>		5,5 ^d	65 ^d		5,3 ^d	512 ^d
<i>Stenella coeruleoalba</i>		2,5 ^{e&} 4,2 ^{e§}		0,1 ^{e&} 0,03 ^{e§} 0,04 ^g	0,61 ^g	475 ^{e&} 482 ^{e§}
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>		1,03 ^{f*} 1,60 ^{f#}		0,013 ^{f*} 0,047 ^{f#}		62 ^{f*} 67 ^{f#}

^a presente estudo; ^b Saeki *et al.* (2001); ^c Frodello *et al.* (2002); ^d Carvalho *et al.* (2002);

^e Monaci *et al.* (1998); ^f Kunito *et al.* (2002); ^g Fossi *et al.* (2004). * Valor para fêmeas; ** valor para fêmea de 7 anos de idade; *** valor para fêmea de 14 anos de idade; # valor para machos; & valor para animais da costa italiana. § valor para animais da costa espanhola.

No entanto, cabe ressaltar que foi observada, uma tendência de ocorrência de leões marinhos *O. flavescens* com maiores concentrações de metais nas desembocaduras dos estuários da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS) e do Arroio Chuí (Chuí, RS). No que se refere aos resultados obtidos para os leões-marinhos coletados na desembocadura do estuário da Lagoa dos Patos, os resultados obtidos estão de acordo com os dados de contaminação no sedimento do referido estuário. Niencheski *et al.* (2000) demonstraram no sedimento da parte sul do estuário da Lagoa dos Patos um enriquecimento por metais, como é o caso do Pb, oriundos de atividades urbanas, industriais e portuárias na cidade do Rio Grande (RS). O mesmo é relatado por Said (2003) onde foram observadas altas concentrações de Pb nas fezes de leões-marinhos coletados no molhe leste da Barra da Lagoa dos Patos. Neste caso, o enriquecimento do sedimento com metais, principalmente os não-essenciais, poderia estar proporcionando uma maior acumulação destes elementos em animais que utilizam o bentos como fonte de alimento (por exemplo, peixes e crustáceos) e que, por sua vez, servem de presas para os leões-marinhos (Frodello *et al.*, 2002).

Neste contexto, diferentes perfis de contaminação dos animais que utilizam habitats com distintos níveis de contaminação por metais poderiam ser observados (Kunito *et al.*, 2002). Apesar de ter sido observada um valor elevado no agrupamento (~70%) entre os haplótipos analisados, não foram observadas variações significativas nas concentrações de metais na pele dos leões-marinhos amostrados em função do haplótipo apresentado pelo animal. Este resultado sugere que, apesar dos dados genéticos indicarem que os

indivíduos que ocupam o litoral sul do Rio Grande do Sul para alimentação e repouso serem provenientes de colônias reprodutivas distintas, estes indivíduos estariam compartilhando o mesmo habitat ou até mesmo diferentes habitats, porém com níveis similares de contaminação ambiental por metais.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam claramente variações sazonais nas concentrações de Ag e Zn na pele dos leões-marinhos analisados, sendo as menores concentrações observadas no inverno. Pelo menos para os animais coletados próximos às regiões da desembocadura dos estuários da Lagoa dos Patos e do Arroio Chuí, bem como nas zonas costeiras adjacentes, estas menores concentrações de Ag e Zn poderiam estar relacionadas com uma redução nos níveis de metais acumulados na biota em função da maior capacidade de diluição da concentração destes elementos durante o inverno, em função dos níveis pluviométricos mais elevados observados nestas regiões nesta estação do ano (Seeliger *et al.*, 1998). Assim, menores níveis de biomagnificação estariam acontecendo nos leões-marinhos que se alimentam destes organismos e, conseqüentemente, menores níveis de contaminação tecidual estariam sendo observados. Cabe ressaltar que a pele dos leões-marinhos é renovada anualmente e que a distribuição de elementos presentes no sangue para este tecido pode ocorrer com certa rapidez, devido às características do sistema circulatório destes animais. Desta forma, este tecido estaria indicando níveis relativamente recentes de contaminação por metais e, conseqüentemente estar refletindo as concentrações vigentes no ambiente nas diferentes estações do ano.

Por último, os dados de contaminação por metais nos leões-marinhos da costa sul do Rio Grande do Sul indicam que a pele é um tecido potencialmente utilizável para monitoramento da contaminação ambiental e avaliação do impacto de metais nestes animais, uma vez que é de fácil coleta, manutenção e análise. Além disso, as variabilidades observadas na concentração de metais neste tecido não estão relacionadas com o haplótipo, sexo e comprimento total dos animais, bem como com o grau de decomposição das amostradas coletadas. Portanto, as possíveis variações uma vez observadas, poderiam ser atribuídas à sazonalidade ou aos níveis de contaminação ambiental. Esta ideia está de acordo com o fato de que a pele tem sido nos últimos anos utilizada freqüentemente para avaliação da contaminação de metais em mamíferos marinhos (Saeki *et al.*, 2001; Frodello *et al.*, 2002 ; Carvalho *et al.*, 2002 ; Fossi *et al.*, 2004).

3.5. Conclusões

- A pele demonstrou ser um tecido potencialmente utilizável como amostra biológica para detectar e monitorar as concentrações de metais em leões-marinhos *Otaria flavescens* que ocorrem no litoral sul do Rio Grande do Sul.
- O perfil de contaminação na pele dos leões-marinhos *O. flavescens* do litoral sul do Rio Grande do Sul parece estar associado com as alterações ambientais observadas e descritas para regiões potencialmente impactadas por atividades antropogênicas, uma vez que os animais com maior concentração de metais na pele foram amostrados próximos a Barra do Chuí e nos molhes da Barra da Lagoa dos Patos.

4. Conclusão Geral

Os dados de diversidade haplotípica e as relações filogenéticas estabelecidas entre os leões-marinhos *Otaria flavescens* que utilizam a costa sul do Rio Grande do Sul para alimentação e repouso sugerem que estes indivíduos podem ser originários de distintas colônias reprodutivas. Além disso, indicam a necessidade de estudos genéticos mais específicos para confirmar os resultados apresentados. Por sua vez, os dados de contaminação da pele por metais indicam que, apesar das diferenças genéticas observadas, os leões-marinhos estudados estariam compartilhando habitats similares em termos de contaminação ambiental por estes elementos.

5. Referências Bibliográficas

- ALONSO, MK, EA CRESPO, SN PEDRAZA, NA GARCÍA, MA COSCARELLA. 2000. Food habits of the South American sea lion, *Otaria flavescens*, off Patagonia, Argentina. *Fish. Bull.*, 98: 250-263.
- ARNASON, U, A GULLBERG, A JANKE, M KULLBERG, N LEHMAN, EA PETROV, R VÄINÖLÄ. 2006. Pinniped phylogeny and a new hypothesis for their origin and dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Article in press.
- AVISE, JC, JL HAMRICK. 1996. Conservation Genetics: Case Histories From Nature. Chapman and Hall, New York. 512 p.
- BAKER, AR, TR LOUGHLIN, V BURKANOV, CW MATSON, RG TRUJILLO, DG CALKINS, JK WICKLIFFE, JW BICKHAM. 2005. Variation of Mitochondrial Control sequences of Steller sea lions: the three-stock hypothesis. *Journal of Mammalogy*, 86(6):1075–1084.
- BARGELLONI, L, JA ALARCON, MC ALVAREZ, E PENZO, A MAGOULAS, C REIS, & T PATARNELLO. 2003. Discord in the family Sparidae (Teleostei): divergent phylogeographical patterns across the Atlantic–Mediterranean divide. *Journal Evolution Biology*, 16:1149–1158.

- BECKER, PR. 2000. Concentration of Chlorinated Hydrocarbons and Heavy Metals in Alaska Arctic Marine Mammals. *Marine Pollution Bulletin*, 40: 819-829.
- BRUNNER, S, MM BRYDEN & PD SHAUGHNESSY. 2004. Cranial ontogeny of otariid seals. *Systematics and Biodiversity*, 2(1): 83–110.
- CAMPOS, CCR. 2002. Concentrações de metais no sangue, plasma e pêlo do elefante-marinho do sul *Mirounga leonina*, da Ilha Elefante (Ilhas Shetland do Sul - Antártica), no verão austral. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 120p.
- CARVALHO, ML, RA PEREIRA, J BRITO. 2002. Heavy metals in soft tissues of *Tursiops truncatus* and *Delphinus delphis* from west Atlantic Ocean by X-ray spectrometry. *The Science of the Total Environment*, 292: 247-254.
- CASTELLO, HP. 1984. Registros del elefante marino, *Mirounga leonina* (Carnívora, Phocidae), en las costas del Atlantico S. O. fuera del area de cria. *Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat., Zoologia*, tomo XIII, 24: 235-243.
- CLEMENT, M, J DERINGTON, S WOOLLEY, D POSADA. 2000. TCS: Phylogenetic network estimation using statistical parsimony. Current version is 1.21 (<http://darwin.uvigo.es/software/tcs>).
- CRESPO, EA, L REYES, M KOEN, N GARCÍA. 1990. Interacciones entre mamíferos marinos y pesquerías en el litoral patagonico. *4^o Reunion de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de America del Sur*, 89-94.
- DANS, SL, EA CRESPO, SN PEDRAZA, MK ALONSO. 2004. Recovery of the South American sea lion (*Otaria flavescens*) population in northern Patagonia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 61: 1681–1690.
- DAVIS, CS, I DELISLE, I STIRLING, DB SINIFF, C STROBECK. 2004. A phylogeny of the extant Phocidae inferred from complete mitochondrial DNA coding regions. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 33: 363–377.
- DELISLE, I, C STROBECK. 2005. A phylogeny of the Caniformia (order Carnivora) based on 12 complete protein-coding mitochondrial genes, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37: 192–201.
- FELSENSTEIN, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle., M.A.
- FIEDLER, PC. 2002. Environmental change in the eastern tropical Pacific Ocean: review of ENSO and decadal variability. *Marine Ecology Progress Series*, 244: 265–283.

FLYNN JJ, JA FINARELLI, S ZEHR, J HSU, MA NEDBAL. 2005. Molecular phylogeny of the Carnivora (Mammalia): assessing the impact of increased sampling on resolving enigmatic relationships. *Syst. Biol.*, 54: 317–337.

FOSSI, MC, L MARSILI A, G LAURIANO, C FORTUNA, S CANESE, S ANCORA, C LEONZIO, T ROMEO, R MERINO, E ABAD, B JIMENEZ. 2004. Assessment of toxicological status of a SW Mediterranean segment population of striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) using skin biopsy. *Marine Environmental Research*, 58: 269–274

FRODELLO, JP, D VIALE, B MARCHAND. 2002. Metal Levels in a Cuvier's Beaked Whale (*Ziphius cavirostris*) Found Stranded on a Mediterranean Coast, Corsica. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 69: 662–666.

FULTON, TL, C STROBECK. 2006. Molecular phylogeny of the Arctoidea (Carnivora): Effect of missing data on supertree and supermatrix analyses of multiple gene data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(1): 165-181.

GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.)

GOLDSWORTHY, S, J FRANCIS, D BONESS & R FLEISCHER. 2000. Variation in the Mitochondrial Control Region in the Juan Fernández Fur Seal (*Arctocephalus philippii*). *The American Genetic Association*, 91: 371-377.

GRÜBEL, KS. 2004. Os Pinípedes do Brasil: Ocorrências, Estimativas Populacionais e Conservação. Tese de Doutorado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 242 p.

HOELZEL, AR, J HALLEY, SJ O'BRIEN, C CAMPAGNA, T AMBOM, B LE BOEUF, K RAILS, GA DOVER. 1993. Elephant Seal Genetic Variation and the Use of Simulation Models to Investigate Historical Population Bottlenecks, *Journal of Heredity*, 84: 443-449.

HOELZEL, AR. 1994. Molecular Genetic Analysis of Populations. Oxford University Press, New York, 315 p.

IKEMOTO T, T KUNITO, I WATANABE, G YASUNAGA, N BABA, N MIYAZAKI, EA PETROV, S TANABE. 2004. Comparison of trace element accumulation in Baikal seals (*Pusa sibirica*), Caspian seals (*Pusa caspica*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Environmental Pollution*, 127: 83–97.

IUCN. 2006 IUCN Red List of Threatened Species (<http://www.iucn.org>).

KUNITO, T, I WATANABE, G YASUNAGA, Y FUJISE, S TANABE. 2002. Using trace elements in skin to discriminate the populations of minke whales in southern hemisphere. *Marine Environmental Research*, 53: 175-197.

MAJLUF, P, EA BABCOCK, JC RIVEROS, M ARIAS-SCHREIBER & W ALDERETE. 2002. Catch and Bycatch of Sea Birds and Marine Mammals in the Small-Scale Fishery of Punta San Juan, Peru. *Conservation Biology*, 16: 1333-1343.

MARCOVECCHIO, JE, MS GERPE, RO BASTIDA, DH RODRÍGUEZ, SG MORÓN. 1994. Environmental contamination and marine mammals in coastal waters from Argentina: an overview. *The Science of The Total Environment*, 154: 141-151.

MÁRQUEZ, JC, G YATACO, L ALZA, FV OORDT. 2006. International Conference on The Humboldt Current System: Climate, ocean dynamics, ecosystem processes, and fisheries. *National Library of Peru*, Lima, Peru, 193-194.

MIRANDA, KCF. 2004. Níveis Plasmáticos dos Hormônios Tireóideos e Esteróides e Concentrações de Compostos Organoclorados no Elefante-Marinho do Sul, *Mirounga leonina* (LINNAEUS, 1758), na Ilha Elefante-Antártida. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 242p.

MONACI, F, A BORREL, C LEONZIO, L MARSILI, N CALZADA. 1998. Trace elements in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the western Mediterranean. *Environmental Pollution*, 99: 61-68.

MORITZ, C. 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. *Trends Ecol. Evol.*, 9: 373-375.

NATOLI, A, VM PEDDEMORS & AR HOELZEL. 2004. Population structure and speciation in the genus *Tursiops* based on microsatellite and mitochondrial DNA analyses. *J. Evol. Biol.*, 17: 363-375.

NEI, M, F TAJIMA. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.

NIENCHESKI, LFH & G FILLMANN. 2006. Contaminantes: Metais, Hidrocarbonetos e Organoclorados, 63-67p. In: LANA, PC, A BIANCHINI, CAO RIBEIRO, LFH NIENCHESKI, G FILLMANN, CSG SANTOS (eds.). Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros: aspectos metodológicos. Projeto RECOS: Uso e Apropriação de Recursos Costeiros. Museu Nacional, Rio de Janeiro, 155 p.

NIENCHESKI, LFH, HL WINDOM, R SMITH. 1994. Distribution of particulate trace metal in Patos Lagoon estuary (Brazil). *Mar. Pollut. Bull* 28, 2: 98-102.

NIENCHESKI LF, MGZ BAUMGARTEN. 2000. Distribution of particulate trace metal in the southern part of the Patos Lagoon estuary. *Aquatic Ecosystem Health and Management Society*, 3: 515-520.

- OLIVEIRA, LR. 1999. Caracterização das ocorrências (Carnivora, Pinnipedia) no litoral norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, entre Abril de 1993 e Dezembro de 1998. Dissertação de Mestrado em Zoologia, Faculdade de Biociências Curso de Pós-Graduação em Biociências, 83 p.
- O’CORRY-CROWE, G, BL TAYLOR, T GELATT, TR LOUGHLIN, J BICKHAM, M BASTERRETCH, KW PITCHER, DP DEMASTER. 2006. Demographic independence along ecosystem boundaries in Steller sea lions revealed by mtDNA analysis: implications for management of an endangered species. *Can. J. Zool.*, 84: 1796-1809.
- O’SHEA, TJ, RR REEVES, AK LONG. 1999. Marine Mammals and Persistent Ocean Contaminants: Proceedings of the Marine Mammal Commission Workshop Keystone, Colorado. 150p.
- PARSONS, KM, JW DURBAN, DE CLARIDGE. 2006. Population Genetic Structure of coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Northern Bahamas. *Marine Mammal Science*, 22(2): 276–298.
- PAVES, HJ, RP SCHLATTER & CI ESPINOZA. 2005. Patrones reproductivos del lobo marino común, *Otaria flavescens* (Shaw 1800), en el centro-sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 78: 687-700.
- PINEDO, MC. 1986. Mortalidade de *Pontoporia blainvillei*, *Tursiops geophysus*, *Otaria flavescens* e *Arctocephalus australis* na costa do Rio Grande do Sul, Brasil, 1976-1983. *Actas I Reunión de Trabajo de Expertos en Mamíferos en Acuáticos de America del Sur*, Argentina, 187-199.
- PINEDO, MC, FCW ROSAS & M MARMONTEL. 1992. Cetáceos e Pinípedes do Brasil: uma revisão dos registros e guia para identificação das espécies. UNEP/FUA. Manaus, Brasil, 213 p.
- REIJNDERS, P, S BRASSEUR, JVD TOORN, PVD WOLF, I BOYD, J HARWOOD, D LAVIGNE, L LOWRY. 1993. Seals, Fur Seals, Sea Lions, and Walrus. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Seal Specialist Group, 88 p.
- RIEDMAN, ML. 1990. The Pinnipeds. Seals, sea lions and walruses. Berkeley, California: University of California Press, 345 p.
- RODRIGUEZ, DH, HD, RO BASTIDA. 1993. The Southern sea lion, *Otaria byronia* or *Otaria flavescens*? *Marine Mammal Science*, 9(4): 372–381.
- ROSAS, FCW. 1989. Aspectos da dinâmica populacional e interações com a pesca, do leão-marinho do sul, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800) (Pinnipedia, Otariidae), no litoral sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil, 88 p.

ROSAS, FCW, M HAIMOVICI & MC PINEDO. 1993. Age and growth of the South American sea lion, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800), in southern Brazil. *J. Mammal.*, 74: 141-147.

ROSAS, FCW, MC PINEDO, M MARMONTEL & M HAIMOVICI. 1994. Seasonal movements of the South American sea lion (*Otaria flavescens*, Shaw) off the Rio Grande do Sul coast, *Brazil. Mammalia*, 58: 51-59.

ROSEL PE, SC FRANCE, JY WANG, TD KOCHER. 1999. Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology*, 8:S41–S54.

ROZAS, J. 2003. DnaSP version 4.0 (<http://www.ub.es/dnasp/DnaSP400>).

SACCONI, C, C GISSI, C LANAVE, A LARIZZA, G PESOLE, A REYES. 2000. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene*, 261: 153-159.

SAEKI, K, M NAKAJIMA, TR LOUGHLIN, DC CALKINS, N BABA, M KIYOTA, R TATSUKAWA. 2001. Accumulation of silver in the liver of three species of pinnipeds. *Environmental Pollution*, 112: 19-25.

SAID, J. 2003. Concentração de metais nas fezes do leão-marinho do Sul *Otaria flavescens* (Shaw, 1800), no Molhe Leste da Barra do Rio Grande (Rio Grande do Sul, RS). Monografia de conclusão de curso, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil, 50 p.

SAMBROOK, J, EF FRITSCH & T MANIATIS. 1989. Analysis and Cloning of Eukaryotic Genomic DNA. In: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 9.16.

SAKAHIRA, F, M NIIMI. 2007. Ancient DNA analysis of the Japanese sea lion (*Zalophus californianus japonicus* Peters, 1866): Preliminary results using mitochondrial control-region sequences. *Zoological Science*, 24(1): 81-85.

SBISÁ, EL, F TANZARIELLO, A REYES, G PESOLE, C SACCONI. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205: 125-140.

SCHIAVINI, ACM, EA CRESPO, V SZAPKIEVICH. 2004. Status of the population of South American sea lion (*Otaria flavescens* Shaw, 1800) in southern Argentina. *Mammalian Biology*, 69: 108-118.

SCHNEIDER, S, D ROESSLI, L EXCOFFIER. 1999. Arlequin: A software for population genetics data analysis: Genetics and Biometry Laboratory - University of Geneva, Geneva, Switzerland.

SEELIGER, U, C ODEBRECHT, JP CASTELLO 1998. Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Rio Grande, Ecoscientia. 326 p.

SOTO, KH, AW TRITES, M ARIAS-SCHREIBER. 2004. The effects of prey availability on pup mortality and the timing of birth of South American sea lions (*Otaria flavescens*) in Peru. *J. Zool., Lond.*, 264: 419–428.

SOTO, KH, AW TRITES, M ARIAS-SCHREIBER. 2006. Changes in diet and maternal attendance of South American sea lions indicate changes in the marine environment and prey abundance. *Marine Ecology Progress Series*, 312: 277–290.

SZAPKIEVICH, VB, HL CAPPOZZO, EA CRESPO, RO BERNABEU, C COMAS, MD MUDRY. 1999. Genetic relatedness in two Southern sea lion (*Otaria flavescens*) rookeries in the southwestern Atlantic. *Zeitschrift Fur Säugetierkunde*, 64: 246-250.

THOMPSON, D, I STRANGE, M RIDDY, CD DUCK. 2005. The size and status of the population of southern sea lions *Otaria flavescens* in the Falkland Islands. *Biological Conservation*, 121: 357–367.

THOMPSON, JD, TJ GIBSON, F PLEWNIAK, F JEANMOUGIN, DG HIGGINS. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24: 4876-4882.

TRITES, AW & CP DONNELLY. 2003. The decline of Steller sea lions *Eumetopias jubatus* in Alaska: a review of the nutritional stress hypothesis. *Mammal Review*, 33: 3–28.

TUNEZ, JI, D CENTRON, HL CAPPOZZO, MH CASSINI. 2006. Geographic distribution and diversity of mitochondrial DNA haplotypes in South American sea lions (*Otaria flavescens*) and fur seals (*Arctocephalus australis*). *Mammalian Biology*, article in press, www.elsevier.de/mambio.

TURNER, J. 2004. The El Niño–Southern Oscillation and Antarctica. *International Journal of Climatology*, 24: 1–31.

VAZ-FERREIRA, R. 1981. South American sea lion, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). pp. 39-66. In: *Handbook of Marine Mammals*, Academic Press, vol.1, London, 235p.

VENEGAS, C, J GIBBONS, A AGUAYO, W SIELFELD, J ACEVEDO, N AMADO, J CAPELLA, G GUZMÁN & C VALENZUELA. 2002. Distribución y abundancia de lobos marinos (Pinnipedia: Otariidae) em la región de Magallanes, Chile. *Anales Instituto Patagonia*, Serie Cs. Nat., 30:67-82.

WANG, JY, LS CHOU, BN WHITE. 1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular Ecology*, 8:1603–1612.

WESTLAKE, RL, GM O’CORRY-CROWE. 2002. Macrogeographic structure and patterns of genetic diversity in harbor seals (*Phoca vitulina*) from Alaska to Japan. *Journal of Mammalogy*, 83(4):1111–1126.

WEBER, DS, BS STEWART, N LEHMAN. 2004. Genetic Consequences of a Severe Population Bottleneck in the Guadalupe Fur Seal (*Arctocephalus townsendi*). *Journal of Heredity*, 95(2):144–153.

WYNEN, LP, SD GOLDSWORTHY, SJ INSLEY, M ADAMS, JW BICKHAM, J FRANCIS, JP GALLO, AR HOELZEL, P MAJLUF, RWG WHITE, R SLADE. 2001. Phylogenetic Relationships within the Eared Seals (Otariidae: Carnivora): Implications for the Historical Biogeography of the Family. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21: 270–284.