



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E ZOOLOGIA

**COMPARAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
PRESENTES NO SANGUE DE *ARCTOCEPHALUS AUSTRALIS* E *MIROUNGA
LEONINA*, PINÍPEDES (sub-ordem Pinnipedia) COM DISTINTAS CAPACIDADES
DE MERGULHO**

Trabalho de Conclusão de Curso

Bárbara Pacheco Harrison Righetti

Orientador: Prof. Danilo Wilhelm Filho

Co-Orientador: Prof. Paulo César Simões-Lopes

Florianópolis, Junho de 2012

Resumo

Os pinípedes, mamíferos marinhos pertencentes à sub-ordem Pinnipedia, são mergulhadores hábeis, desenvolvendo grande parte de suas atividades, como alimentação e deslocamento, durante os mergulhos. Precisam, no entanto, voltar à superfície para respirar, expondo-se às transições bruscas de hipóxia/reperfusão rotineiramente, que podem acarretar em altas produções de espécies reativas de oxigênio (EROs). Desenvolveram, para tanto, inúmeras defesas metabólicas, fisiológicas e enzimáticas a fim de evitar o estresse oxidativo associado à produção elevada de EROs. O presente estudo avaliou o *status* antioxidante de *Arctocephalus australis* (Fam. Otariidae) e *Mirounga leonina* (Fam. Phocidae), espécies de pinípedes que apresentam comportamentos de mergulho, usuais e/ou extremos, distintos. Foram realizadas análises espectrofotométricas, a partir de amostras sanguíneas, para quantificação da atividade de antioxidantes enzimáticos, além de danos oxidativos. As análises evidenciaram diferenças bioquímicas que sustentam a hipótese de relação direta entre os biomarcadores de estresse oxidativo e as distintas capacidades de mergulho das espécies mergulhadoras.

Palavras-chave: Pinnipedia; capacidade de mergulho; estresse oxidativo; antioxidantes.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO..... | 4 |
| JUSTIFICATIVA..... | 9 |
| OBJETIVOS | |
| OBJETIVOS GERAIS..... | 11 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 11 |
| METODOLOGIA | |
| TESTES ESPECTROFOTOMÉTRICOS..... | 12 |
| Lipoperoxidação (TBARS)..... | 12 |
| Superóxido Dismutase (SOD)..... | 13 |
| Catalase (CAT)..... | 13 |
| Glutathione S-transferase (GST)..... | 13 |
| Glutathione Peroxidase (GPx)..... | 13 |
| Glutathione Redutase (GR)..... | 14 |
| TESTES ESTATÍSTICOS..... | 14 |
| RESULTADOS..... | 15 |
| DISCUSSÃO..... | 23 |
| CONCLUSÃO..... | 33 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 34 |

INTRODUÇÃO

Os pinípedes modernos, mamíferos aquáticos pertencentes à ordem Carnívora, compreendem mais de um quarto da diversidade de mamíferos marinhos (BERTA; SUMICHRS, 1999), ocorrendo em todos os oceanos, predominantemente ao longo da costa e sob clima polar ou temperado, sendo ocasionalmente encontrados em algumas áreas de clima tropical e em corpos d'água continentais (NOWAK, 1991).

A sub-ordem Pinnipedia pode ser subdividida em três famílias monofiléticas: Odobenidae, que inclui apenas a espécie *Odobenus rosmarus*; Otariidae, composta pelas 16 espécies de lobos e leões-marinhos; e Phocidae, o grupo representado pelas chamadas focas verdadeiras, com dezenove espécies (BERTA; SUMICHRS, 1999).

Em termos comparativos, os pinípedes são animais anatomicamente menos modificados para a vida em meio aquático que outros mamíferos aquáticos, como cetáceos e sirênios e, apesar de serem capazes de permanecer no ambiente aquático por meses, passam também longos períodos de suas vidas fora d'água (CROCKER; COSTA, 2008). Embora não sejam muito ágeis em terra firme, são mergulhadores extremamente hábeis e apresentam capacidade de mergulho bastante impressionantes (NOWAK, 1991 BERTA; SUMICHRS, 1999).

O comportamento de mergulho, para grande parte das espécies do grupo, está intimamente relacionado a atividades de forrageamento (BUTLER, 2001) e este comportamento “anfíbio” (e por vezes extremo) dos pinípedes, fez necessário o surgimento de um conjunto de adaptações fisiológicas que permitissem tais alternâncias (CROCKER; COSTA, 2008).

As adaptações que permitem o mergulho a grandes profundidades e por longos períodos são bastante complexas, compreendendo desde adaptações ao aumento de pressão hidrostática (e da embolia gasosa pelo nitrogênio), estocagem de oxigênio e adaptações metabólicas como bradicardia, hipometabolismo, hipoperfusão, entre outros (CROCKER; COSTA, 2008).

Com trinta e oito espécies, a sub-ordem apresenta uma grande variedade de características físicas e comportamentais, sendo o comportamento e/ou capacidade de mergulho um exemplo desta plasticidade. Consideramos neste estudo capacidade de mergulho como a profundidade máxima alcançada e/ou o período máximo de submersão, que está diretamente relacionada ao volume de oxigênio disponível para utilização (KOOYMAN; PONGANIS, 1998), à eficiência com que os animais utilizam tais reservas, e às defesas antioxidantes

correspondentes (WILHELM FILHO et al., 2000; 2002), de maneira a não sofrer danos cerebrais, circulatórios ou teciduais em decorrência do mergulho (NOWAK, 1991).

Ao contrário dos mamíferos terrestres, as principais reservas de oxigênio destes animais não são encontradas nos pulmões (HOCHACHKA et al., 1977). O volume deste é menor comparativamente aos terrestres, encontrando-se ainda mais reduzido durante o mergulho, nas espécies que permitem o colapso dos pulmões, a fim de evitar a formação de bolhas de N₂ no sangue durante a descompressão, e o rompimento de vasos em decorrência do aumento de pressão (cerca de 1atm a cada 10m de profundidade) (BUTLER, 2001; LEVETT; MILLAR, 2008). Em pinípedes, os tecidos musculares e o sangue concentram de 80 a 90% de todas as reservas de oxigênio e representam o principal fator no desenvolvimento da capacidade de submersão elevada do grupo (KOOYMAN; PONGANIS, 1998).

Durante o mergulho, os músculos esqueléticos locomotores são praticamente privados do aporte sanguíneo pela constrição dos vasos periféricos (HOCHACHKA; STOREY, 1975), mantendo, no entanto, grande parte de seu metabolismo para a produção energética. Este mecanismo é possibilitado, majoritariamente, devido à alta reserva de oxigênio intracelular apresentada por estes mamíferos marinhos, que atuam como uma fonte importante para o funcionamento das mitocôndrias (KANATOUS, 1999).

Além disso, os pinípedes apresentam grande concentração de mioglobina em seus músculos esqueléticos (KANATOUS, 1999), uma das características fisiológicas mais particulares dos mergulhadores de profundidade (KOOYMAN; PONGANIS, 1998). O oxigênio ligado à mioglobina só se torna disponível ao metabolismo aeróbico quando a pressão parcial de oxigênio nos músculos é muito baixa (em torno de 10mm Hg), atuando como uma importante fonte de oxigênio nas situações de hipóxia extrema a que se submetem constantemente os mamíferos mergulhadores (DAVIS et al., 2004).

No entanto, apesar de consideravelmente maiores quando comparadas às de animais terrestres, estas reservas de O₂ ainda assim não seriam suficientes para suportar as durações de mergulho observadas, considerando que o metabolismo mantido durante o mergulho fosse similar àquele observado durante períodos de descanso sobre a superfície (KOOYMAN, CASTELLINI; DAVIS, 1981). Torna-se evidente que o organismo, então, deve desenvolver variadas respostas ao mergulho, de maneira a otimizar suas reservas e

maximizar seu limite aeróbio de mergulho (ADL), o tempo máximo que podem permanecer em submersão utilizando somente metabolismo aeróbio (DAVIS et al. 2004), sem aumento na concentração de lactato durante ou após o mergulho (HINDELL et al. 1992).

As respostas vasculares complexas que ocorrem durante a submersão também atuam de forma a otimizar a utilização da escassa oferta de oxigênio. A mais óbvia destas respostas é a chamada bradicardia, a diminuição da frequência cardíaca durante o mergulho (KOOYMAN, CASTELLINI; DAVIS, 1981). Em *Eumetopias jubatus* observou-se que esta redução chega, em média, a 40% em relação à frequência anteriormente ao mergulho, independentemente do tipo de mergulho (único ou em série), de sua duração ou profundidade (HINDLE et al., 2010). Já elefantes marinhos, que podem permanecer submersos por até 119 min, chegam a reduzir sua frequência cardíaca durante a submersão em 50 a 80% em relação ao período em que se encontram sobre a superfície (ANDREWS et al., 1997).

Além deste mecanismo, também ocorre durante o mergulho a vasoconstrição seletiva, promovendo a realocação do fluxo sanguíneo, mecanismo-chave para estender o limite de submersão. A realocação promove o uso parcimonioso das reservas limitadas de oxigênio (KOOYMAN; CASTELLINI; DAVIS, 1981), disponibilizando-as apenas às porções vitais do corpo, como o coração, suprarenais e o cérebro, que continuam recebendo praticamente a mesma quantidade de oxigênio que recebiam antes do mergulho (HOCHACHKA et al., 1977). Outras áreas do organismo, como a musculatura locomotora e as vísceras têm seu aporte de sangue e oxigênio consideravelmente reduzido, resultando em hipóxia tecidual (KANATOUS, 1999; HOCHACHKA et al., 1977).

No comportamento metabólico usual de um mergulho, assim que o animal inicia a volta à superfície, sua frequência cardíaca passa a aumentar gradualmente, atingindo valores praticamente iguais àqueles observados anteriormente ao mergulho imediatamente antes de retornar a superfície (ANDREWS et al., 1997). O aumento gradual da frequência cardíaca antes do animal efetivamente atingir a superfície parece atuar de maneira a restaurar o fluxo sanguíneo a órgãos e tecidos sub-irrigados (THOMPSON; FEDAK, 1993). Ao atingir a superfície o consumo de oxigênio também atinge valores elevados, muitas vezes maiores que aqueles referentes ao período anterior ao mergulho. Em *Eumetopias jubatus* foram

observados picos de consumo de O_2 dentro do primeiro minuto após a volta à superfície (HASTIE; ROSEN; TRITES, 2007).

A reperusão sanguínea e, conseqüentemente, a reintrodução rápida de oxigênio a tecidos submetidos à hipóxia por períodos prolongados, como aqueles experimentados continuamente pelos pinípedes durante os mergulhos, reestabelece também a produção de ATP rapidamente (CANTÚ-MEDELLIN, 2011), podendo causar danos aos tecidos através da produção elevada de EROs (ZENTENO-SAVÍN; CLAYTON-HERNÁNDEZ; ELSNER, 2002). Estas são produtos naturais do metabolismo aeróbio capazes de reagir com macromoléculas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006), resultando em peroxidação dos lipídios e degenerações de membrana, inativação enzimática, mutagênese, carcinogênese, entre outros (MORENO et al., 1980).

Como as principais EROs, podemos citar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos lipídicos, óxido nítrico (\dot{NO}), o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (\dot{OH}), e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), uma espécie reativa de nitrogênio, sendo os último três os mais representativos em termos de dano oxidativo em sistemas biológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

Em decorrência dos efeitos deletérios associados à formação de EROs, todos os organismos aeróbios apresentam mecanismos de defesa a estas moléculas, chamadas de defesas antioxidantes (AD), capazes de retardar ou inibir a oxidação de macromoléculas e permitir a sobrevivência destes organismos face à necessidade de utilização do oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

Dentre estas defesas, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathione peroxidase (GPx) constituem a primeira barreira endógena de neutralização das EROs sendo, portanto, consideradas as principais enzimas antioxidantes de qualquer organismo aeróbio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A superóxido-dismutase tem o papel essencial de degradação de um dos principais fatores de toxicidade do oxigênio: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), através da dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O_2 e O_2 . Esta enzima é encontrada em praticamente todas as células eucarióticas, e em muitas outras células procarióticas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A catalase e a glutathione peroxidase são consideradas igualmente essenciais para a proteção contra a toxicidade do oxigênio. Através da dismutação de $O_2^{\cdot-}$ é formado H_2O_2 . Este, por

sua vez, é removido em organismos aeróbios por dois tipos de enzimas: as catalases, encontradas em quase todas as células aeróbias, e as peroxidases. Ambas decompõem H_2O_2 gerando H_2O (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). As enzimas peroxidases (GPx), entretanto, associam a redução de H_2O_2 com a conversão de glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG) (MEISTER; ANDERSON, 1983).

Outras enzimas coadjuvantes são importantes na ação antioxidante, dentre elas podemos citar a glutatona redutase (GR), e o conjunto das glutatona S-transferases. A família das glutatona S-transferases (GST) detoxificam xenobióticos e produtos oxidados das reações de EROs pela conjugação destes com GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). As enzimas GR atuam na reconversão de GSSG em GSH, mantendo a relação GSH: GSSG bastante elevada intracelularmente (MEISTER; ANDERSON, 1983).

Em geral, organismos que se submetem rotineiramente à produção elevada de EROs são capazes de aumentar a expressão de suas defesas antioxidantes, adaptando-se a esta situação crônica (WILHELM FILHO et al., 2000; HERMES-LIMA; ZENTENO-SÁVIN, 2002). Por se exporem continuamente a situações de isquemia/reoxigenação dos tecidos, decorrentes da constante alternância entre períodos de mergulho e na superfície, mamíferos mergulhadores têm uma alta produção metabólica de EROs (WILHELM FILHO et al., 2002; VÁZQUEZ-MEDINA; ZENTENO-SAVIN; ELSNER, 2006).

Estudos anteriores com mamíferos mergulhadores identificaram atividade aumentada em diversas enzimas antioxidantes, comparativamente àquela encontrada em mamíferos terrestres (WILHELM FILHO et al., 2002), evidenciando que este de fato é um dos mecanismos principais utilizados por estes animais para manutenção de concentrações celulares baixas de EROs e, conseqüentemente, de adaptação fisiológica ao seu hábito de vida particular (ELSNER et al., 1998; WILHELM FILHO et al., 2002; VÁZQUEZ-MEDINA; ZENTENO-SAVIN; ELSNER, 2007). Desta forma, a maior produção de EROs nestes organismos não é refletida em níveis também elevados de danos celulares e/ou teciduais por oxidação (WILHELM FILHO et al., 2002; ZENTENO-SAVÍN; CLAYTON-HERNÁNDEZ; ELSNER, 2002).

JUSTIFICATIVA

Existem diversas espécies de animais capazes de permanecer submersos por longos períodos de tempo e que utilizam o oxigênio como fonte energética para seus metabolismos (MORI, 1999). Dentre os mamíferos, a capacidade de mergulho, bem como o comportamento usual de mergulho, pode ser bastante distinta entre as espécies.

Entre pinípedes, a variação é especialmente grande. Membros da família Phocidae, também chamados de focas, costumam apresentar capacidades de submersão maiores que aquelas encontradas em espécies da família Otariidae, como lobos ou leões-marinhos (KOOYMAN; CASTELLINI; DAVIS, 1981). Exemplos extremos da família Phocidae, as espécies *Mirounga leonina* e *M. angustirostris*, conhecidos popularmente como elefantes-marinhos do sul e do norte respectivamente, passam cerca de 80% de seus ciclos anuais no mar (HINDELL & PERRIN, 2008), realizando migrações para áreas mais favoráveis de forrageamento, que podem durar meses (LE BOEUF et al., 1988). Consideradas modelo no quesito capacidade de mergulho, ambas as espécies passam quase 90% do tempo em ambiente aquático mergulhando, usualmente a profundidades que variam de 400 a 800m, permanecendo submersos, em média, 20 minutos. (HINDELL & PERRIN, 2008). No entanto, registros para *M. leonina* retratam mergulhos recorde a profundidades que excedem os 1600m (BENNETT; MCCONNELL; FEDAK, 2001) e com períodos de submersão de até duas horas (SLIP et al., 1994).

Além da relação direta com atividades de forrageamento, estes comportamentos extremos também representam vantagem ao evitar os predadores de superfície como as orcas (*Orcinus orca*) e tubarões (DE LONG; STEWART, 1991, apud TYACK et al., 2006), e podem, inclusive, estar relacionados à conservação energética através de redução metabólica extrema durante o mergulho, comportamento similar ao “dormir” de outros animais (LE BOEUF et al. 1988; SLIP et al. 1994).

No outro extremo encontramos *Arctocephalus australis* que, assim como outras espécies de lobos marinhos, alimentam-se a profundidades médias que variam de 26 a 175m (Kooyman and Gentry Apud LE BOEUF et al. 1988; TRILLMICH et al. 1986) e permanecem submersos, em média, por períodos menores do que dez minutos (TRILLMICH et al. 1986).

Esta grande variação de comportamentos leva ao desenvolvimento de distintas respostas fisiológicas. Existem poucos estudos buscando identificar estas possíveis relações. Os trabalhos desenvolvidos nesta área evidenciam respostas metabólicas mais intensas em mergulhos mais profundos (CASTELLINI; KOOYMAN; PONGANIS, 1992) e diferentes capacidades de mergulho em decorrências de volumes distintos de reservas de oxigênio (KUHN *et al.*, 2006). Mamíferos mergulhadores exibem DA maiores comparativamente àquelas encontradas em mamíferos terrestres (WILHELM FILHO *et al.*, 2002), existindo a sugestão de que, a capacidade de mergulho estaria diretamente relacionado com as DA de cada espécie. No entanto, a efetiva análise desta possível relação é ainda pouco explorada. Cantú-Medellín (2011) foi o primeiro a comparar espécies de cetáceos com diferentes comportamentos de mergulho (*Tursiops truncatus*, ou golfinho nariz-de-garrafa e *Kogia* spp.), e, embora tenha encontrado maior atividade enzimática em mergulhadores rasos, danos por oxidação foram mais baixos em mergulhadores de profundidade, sugerindo a existência de outros mecanismos antioxidantes atuantes nestes indivíduos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o *status* antioxidante de duas espécies pertencentes a duas famílias distintas (Otariidae e Phocidae), dentro da sub-ordem Pinnipedia: *Arctocephalus australis* e *Mirounga leonina*, de maneira a identificar possíveis relações entre as características/capacidades de mergulho e níveis dos diferentes biomarcadores de estresse oxidativo presentes no sangue das duas espécies.

Objetivos Específicos:

- 1) Avaliar os marcadores de estresse oxidativo enzimáticos, como a catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), e superóxido dismutase (SOD) nas duas espécies;
- 2) Avaliar os marcadores de dano oxidativo como a peroxidação lipídica (níveis de TBARS);
- 3) Tentar correlacionar estes marcadores com a capacidade de mergulho destas duas espécies;

METODOLOGIA

Foram coletadas amostras sanguíneas de *Arctocephalus australis*, resgatados e submetidos a reabilitação no Centro de reabilitação de animais marinhos (CRAM) da Universidade Federal da Rio Grande (FURG), localizada em Rio Grande/RS e de *Mirounga leonina*, coletadas em Punta Delgada (Península Valdes, Chubut, Argentina). Todas as coletas foram realizadas pela veia cubital e utilizaram seringas heparinizadas. O volume de sangue coletado de cada animal variou em decorrência de particularidades de cada animal (animais debilitados, de pequeno porte e/ou muito agressivos).

O sangue coletado foi fracamente centrifugado (aproximadamente 5000 g durante 3 min.), em seguida o plasma sobrenadante foi separado das hemácias em tubos criogênicos distintos e ambos foram imediatamente congelados. O material foi posteriormente encaminhado ao laboratório de Ecofisiologia Respiratória, da Universidade Federal de Santa Catarina e acondicionado em nitrogênio líquido para preservar a integridade das amostras até a realização das análises espectrofotométricas.

Foram realizadas análises para a quantificação dos antioxidantes enzimáticos: Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), glutatona-S-transferase (GST), além dos níveis de lipoperoxidação associados ao plasma sanguíneo (TBARS).

Testes Espectrofotométricos

Lipoperoxidação (TBARS)

O ensaio enzimático para quantificação de dano celular por TBARS foi realizado através do método espectrofotométrico baseado em Ohkawa (1979), cujo princípio se baseia na formação de um composto estável, complexo MDA/TBA, a partir da reação de peróxidos lipídicos encontradas no plasma sanguíneo com o ácido tiobarbirtúrico (TBA 0,73%) em comparação com um branco (preparação somente com reagentes, sem alíquota de plasma). A análise foi realizada em duplicatas, com leitura em absorbância 535. A quantificação foi realizada de acordo com a fórmula: $\mu\text{mol MDA g}^{-1} = A_{535} \times \text{dil}^* / 153$.

Superóxido dismutase (SOD)

Para a determinação da atividade da enzima SOD foi realizado ensaio enzimático através do método do adenocromo, formado através da oxidação da adrenalina. O princípio se baseia na diminuição da velocidade de formação deste pela enzima SOD (MISRA; FRIDOVICH, 1971). O ensaio foi realizado em triplicata, e com alíquotas crescentes de amostra sanguínea (20µl, 30µl e 40µl), em absorvância de 480nm. A quantificação foi realizada a partir do cálculo: $SOD (U_{sod}.ml^{-1}) = 1/\mu l \times 1000$. Neste cálculo, “µl” se refere ao valor de “x” encontrado para inibição de 50% da formação de adenocromo a partir do gráfico inibição x µl de amostra construído com os valores iniciais do ensaio.

Catalase (CAT)

O ensaio enzimático para a CAT seguiu o princípio de decaimento da queda da absorvância do H_2O_2 (A_{240}) pela metabolização deste pela catalase descrito por Aebi (1984). Utilizou-se para tal solução de peróxido de hidrogênio 10mM em tampão fosfato pH 7,0. As amostras foram analisadas em duplicatas e os valores expressos em $mmol \text{ min}^{-1}.ml^{-1}$ através do cálculo $CAT (mmol \text{ min}^{-1}.ml^{-1}) = Abs \times dil^*/40$.

Glutathione S-transferase (GST)

A análise e a quantificação da GST foram realizadas segundo Habig et al. (1974), de acordo com velocidade de detoxificação de componentes com terminação -SH, como a GSH, levando à formação de um complexo neutro (GS-DNB). Para o ensaio enzimático, realizado em duplicatas, foi calculada a velocidade “k” da variação de A_{340} , e a quantificação foi realizada a partir do cálculo: $GST = (k.dil^*) / 9,6 (\mu mol.min^{-1}.g^{-1})$.

Glutathione peroxidase (GPx)

O ensaio foi realizado através da metodologia aplicada por Flohé e Ötting (1984), que baseia-se no decréscimo de absorvância (340nm) promovido durante a redução de GSSG a partir de GSH, catalisada pela GR, em presença de NADPH. A velocidade de oxidação de NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Os valores são expressos em $\mu mol.min^{-1}.ml^{-1}$, e calculados como segue: $GPx = (k-k_i) \times dil^*/6,22$, onde k_i se refere a velocidade de queda de NADPH mensurado sem amostra (branco), de valor constante 0,0025.

Glutathione Redutase (GR)

O método utilizado para a análise desta atividade será o de Carlberg e Mannervick (1985), onde se verifica, em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à redução da glutathione oxidada (GSSG) pela glutathione redutase presente na amostra, em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; NADPH; glutathione oxidada (GSSG) e DPTA 5mM. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ e calculados como segue: $\text{GR} = \text{Abs} \times \text{dil} \times 6,22$.

*dil= diluição da amostra x diluição da cubeta.

Testes Estatísticos

Para todos os testes foi estabelecido limite de confiabilidade de 95% (i.e. $p=0,05$). Para análise de normalidade das distribuições foi realizado o teste de Shapiro-Wilk (ZAR, 1974). As médias obtidas para as duas espécies foram comparadas através do teste t para variáveis independentes (ZAR, 1974).

Para análise e visualização gráfica das diferenças e similaridades entre indivíduos foi realizada uma padronização dos valores obtidos para as variáveis, seguida de uma análise de agrupamento, a partir das distâncias euclidianas entre os valores. Todos os testes estatísticos foram realizados no software STATISTICA 7.0.

RESULTADOS

Foram realizadas coletas sanguíneas de um total de dezesseis indivíduos, sendo destes onze de *Arctocephalus australis* e cinco de *Mirounga leonina*. Os indivíduos de *Arctocephalus australis* eram todos machos, de idade variável, classificados como juvenis. Os indivíduos de *Mirounga leonina* eram fêmeas, de idade também variável, classificadas como adultas.

Os valores obtidos para quantificação de dano por oxidação lipídica (TBARS) e concentração e/ou atividade das enzimas catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona peroxidase (GPx), Glutaciona redutase (GR) e Superóxido Dismutase (SOD) foram sumarizados (Tab.1).

Todas as distribuições destes dados foram consideradas normais pelo teste de Shapiro-Wilk. *Arctocephalus australis*: TBARS – p= 0.46; GST – p= 0.16; CAT – p= 0.62; SOD – p= 0.19; GPx – p= 0.91 e GR – p= 0.97. *Mirounga leonina*: TBARS – p= 0.33; CAT – p= 0.72; GST – p= 0.99; GPx – p= 0.92; GR – p= 0.22; SOD – p= 0.64.

Em três casos (CAT, GST e SOD) para *Arctocephalus australis* os valores foram transformados através do cálculo de Log ou inversa para acomodação à normalidade (ZAR, 1974).

A partir dos resultados do teste *t* pudemos identificar que, para SOD, a média encontrada para *A. australis* (301,5±220,42 USOD/ml) foi significativamente menor do que a média da mesma enzima encontrada para *M. leonina* (1481,4±344,38 USOD/ml) (Fig.1) [t=8,35; g.l.=14; p<0,01] (Tab.2). Para a enzima GR, a média encontrada para *A. australis* (0,20±0,042 µmol.min-1.ml-1) também foi significativamente menor que aquela encontrada para *M. leonina* (0,63±0,286 µmol.min-1.ml-1) (Fig.2) [t=5,1; g.l.= 14; p<0,01] (Tab.2).

A média de atividade de CAT obtida para *A. australis* (13±11,2 mmol.min-1.ml-1) foi significativamente menor do que a média obtida para a atividade da mesma enzima em *M. leonina* (58,1±17,18 mmol.min-1.ml-1) (Fig.3) [t=6,34; g.l.= 14; p<0,01] (Tab.2). A atividade média de GST para *A. australis* (12,1±10,42 µmol.min-1.ml-1) também foi significativamente menor que a encontrada para *M. leonina* (26,7±7,27 µmol.min-1.ml-1) (Fig.4) [t=2,81; g.l.=14; p<0,05] (Tab.2).

Tabela 1: Valores individuais de dano por oxidação lipídica (TBARS), concentração e/ou atividade das enzimas catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona peroxidase (GPx), Glutaciona redutase (GR) e Superóxido Dismutase (SOD), referente a *ARCTOCEPHALUS AUSTRALIS* (n=11) e *MIROUNGA LEONINA*, (n=5) identificados através de números e/ou letras e classificados quanto ao sexo (M= machos; F= Fêmeas) e faixa etária (J= Juvenis; A= Adultos) a qual pertencem.

| Nº | Espécie | Sexo | Faixa Etária | TBARS ($\mu\text{mol.ml}^{-1}$) | CAT ($\text{mmol.min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$) | GST ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$) | GPx ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$) | GR ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$) | SOD (U SOD ml^{-1}) |
|------|---------------------|------|--------------|--------------------------------------|--|--|--|---|----------------------------------|
| 2365 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,03127451 | 6,214375 | 7,26516 | 58,81350482 | 0,167958199 | 405,107 |
| 2592 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,01627451 | 11,684375 | 12,762204 | 65,46945338 | 0,21244373 | 910,9899 |
| 2593 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,018627451 | 7,710625 | 3,366972 | 69,71382637 | 0,21692926 | 381,3538 |
| 2594 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,006706863 | 9,25375 | 8,114064 | 43,31189711 | 0,181254019 | 221,2503 |
| 2599 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,013039216 | 45,775 | 8,061984 | 49,99678457 | 0,228086817 | 202,2559 |
| 2600 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,018333333 | 16,725 | 6,343344 | 61,43729904 | 0,277524116 | 178,9345 |
| 2601 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,011764706 | 10,205625 | 42,051996 | 56,00643087 | 0,169437299 | 134,101 |
| 2606 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,01127451 | 10,0475 | 12,38202 | 53,08842444 | 0,221945338 | 293,1635 |
| 2607 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,020098039 | 8,179375 | 7,397964 | 60,93086817 | 0,186382637 | 170,5571 |
| 2609 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,028039216 | 9,515625 | 12,965316 | 51,4340836 | 0,123247588 | 165,6771 |
| 2611 | <i>A. australis</i> | M | J | 0,013529412 | 7,885 | 12,553884 | 34,98231511 | 0,248006431 | 253,7438 |
| M2a | <i>M. leonina</i> | F | A | 0,07239 | 52,6375 | 35,78125 | 200,9807074 | 1,11255627 | 1849,44 |
| M6a | <i>M. leonina</i> | F | A | 0,05978 | 32,8 | 26,875 | 258,8585209 | 0,458118971 | 972,7 |
| M4b | <i>M. leonina</i> | F | A | 0,03704 | 76,3 | 16,45833333 | 151,3987138 | 0,558745981 | 1748,82 |
| M19b | <i>M. leonina</i> | F | A | 0,0573 | 71,4625 | 23,85416667 | 212,5562701 | 0,652893891 | 1435,27 |
| M5b | <i>M. leonina</i> | F | A | 0,0371 | 57,475 | 30,67708333 | 189,3086817 | 0,385401929 | 1400,58 |

Tabela 2: Sumário dos valores médios, desvios-padrões, valor do teste *t*, graus de liberdade (g.l.), probabilidade do teste *t* e probabilidade do teste de homocedasticidade de Levene, para as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Glutaciona redutase (GR), Catalase (CAT), Glutaciona-S-Transferase (GST), Glutaciona Peroxidase (GPx) e para dano lipídico por oxidação (TBARS), nas duas espécies analisadas, *Arctocephalus australis* e *Mirounga leonina*.

| | Média (<i>A. australis</i>) | Desvio padrão. (<i>A. australis</i>) | Média (<i>M. leonina</i>) | Desvio padrão (<i>M. leonina</i>) | <i>t</i> | g.l. | P | p-Levene |
|--------------|----------------------------------|--|--------------------------------|---|----------|------|----------|----------|
| SOD | 301,5576 | 220,4239 | 1481,362 | 344,3844 | -8,35216 | 14 | 0,000001 | 0,252 |
| GR | 0,20302 | 0,042796 | 0,633543 | 0,286256 | -5,07681 | 14 | 0,000169 | 0,007 |
| CAT | 13,01784 | 11,20682 | 58,135 | 17,17636 | -6,3414 | 14 | 0,000018 | 0,244 |
| GST | 12,11499 | 10,41957 | 26,72917 | 7,268135 | -2,8151 | 14 | 0,013765 | 0,886 |
| GPx | 55,01681 | 9,98496 | 202,6206 | 38,93905 | -12,1848 | 14 | 0 | 0,029 |
| TBARS | 0,017178 | 0,0073 | 0,052722 | 0,015391 | -6,40663 | 14 | 0,000016 | 0,022 |

A média obtida de GPx para *A. australis* ($55,0 \pm 9,98 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$) seguiu o mesmo padrão das enzimas descritas anteriormente e também foi significativamente menor que a média encontrada para *M. leonina* ($202,6 \pm 38,94 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Fig.5) [$t=12,18$; g.l.=14; $p<0,01$] (Tab.2). Por fim, a média de TBARS encontrada para *A. australis* ($0,017 \pm 0,0073 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$) foi significativamente menor que a obtida para a espécie *M. leonina* ($0,053 \pm 0,0154 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Fig.6) [$t=6,41$; g.l.=14; $p<0,01$] (Tab.2).

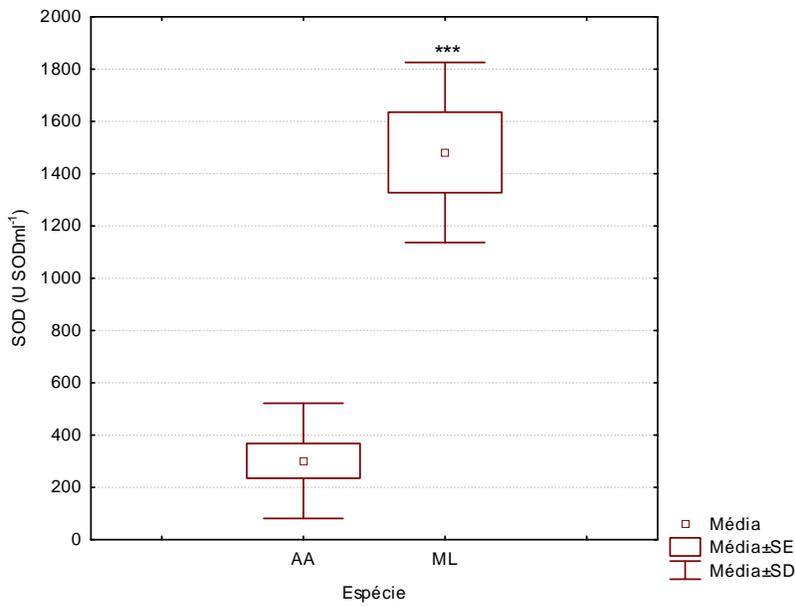


Fig.1: Diagrama de caixa mostrando os valores de concentração da enzima Superóxido Dismutase (SOD) de *A. australis* e *M. leonina*; *** = $p < 0,001$.

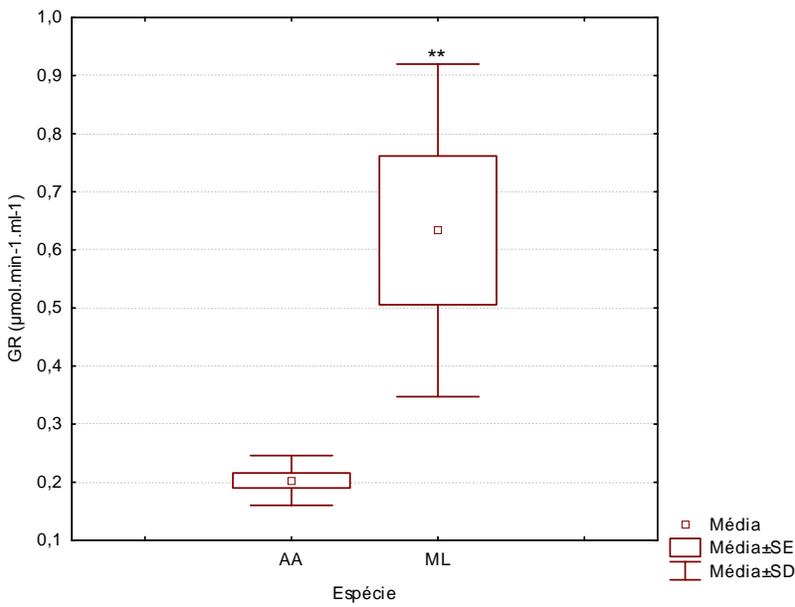


Fig.2: Diagrama de caixa mostrando os valores de atividade da enzima Glutaciona Redutase (GR) de *A. australis* e *M. leonina*, ** = $p < 0,01$.

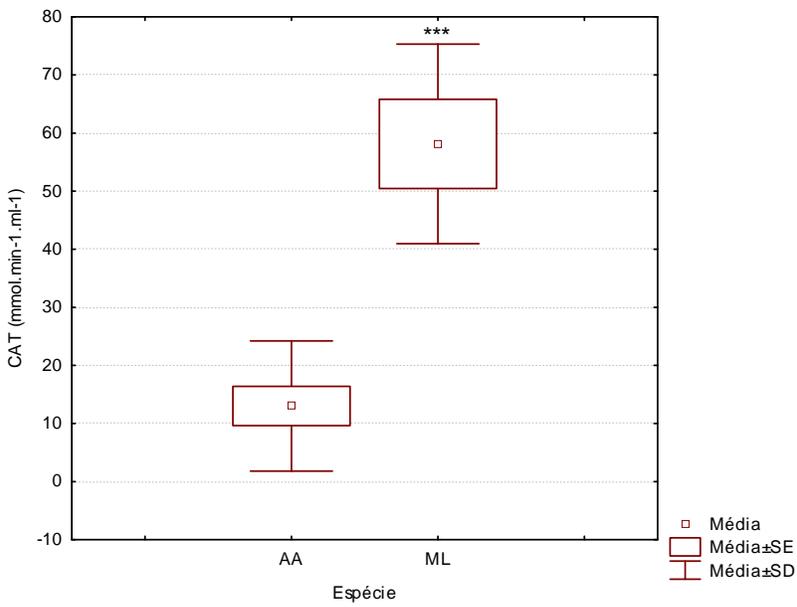


Fig.3: Diagrama de caixa mostrando os valores de atividade da enzima Catalase (CAT) de *A. australis* e *M. leonina*. *** = p < 0,001.

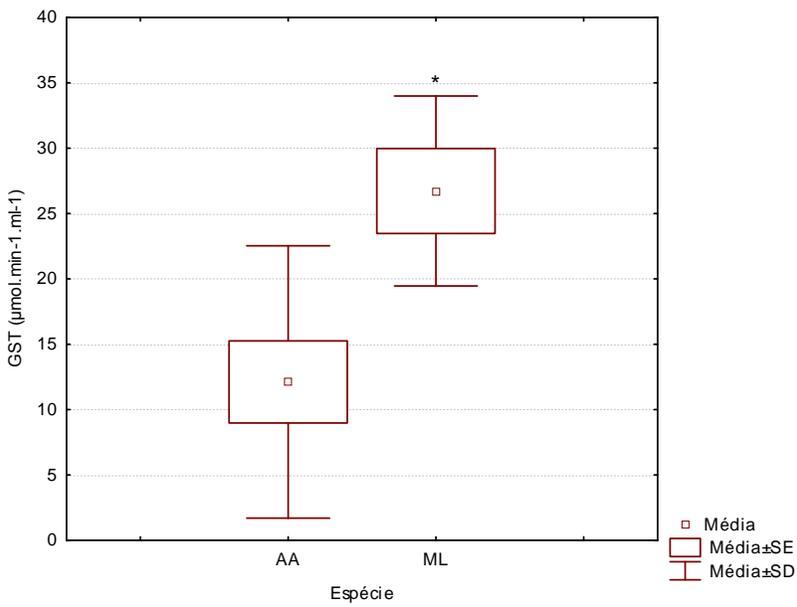


Fig.4: Diagrama de caixa mostrando os valores de atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST) de *A. australis* e *M. leonina*. * = p < 0,05.

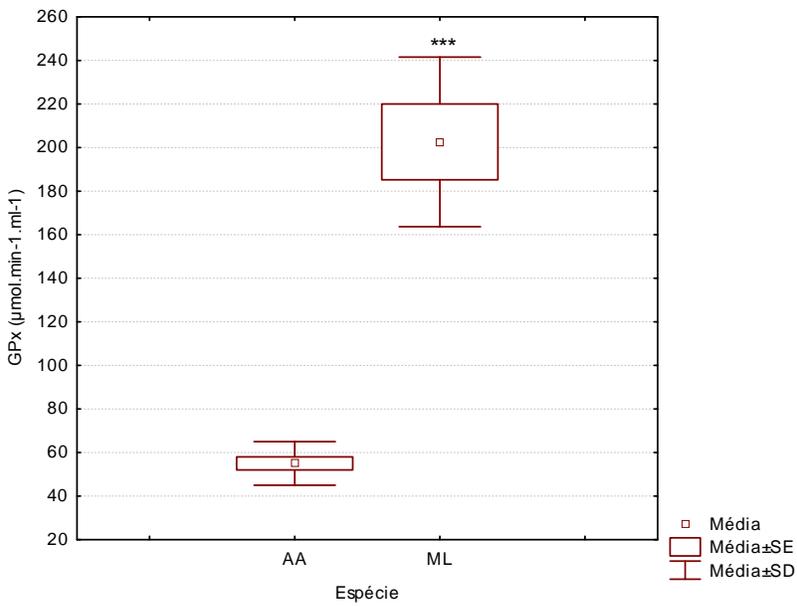


Fig.5: Diagrama de caixa mostrando os valores de atividade da enzima Glutaciona Peroxidase (GPx) de *A. australis* e *M. leonina*. *** = $p < 0,001$.

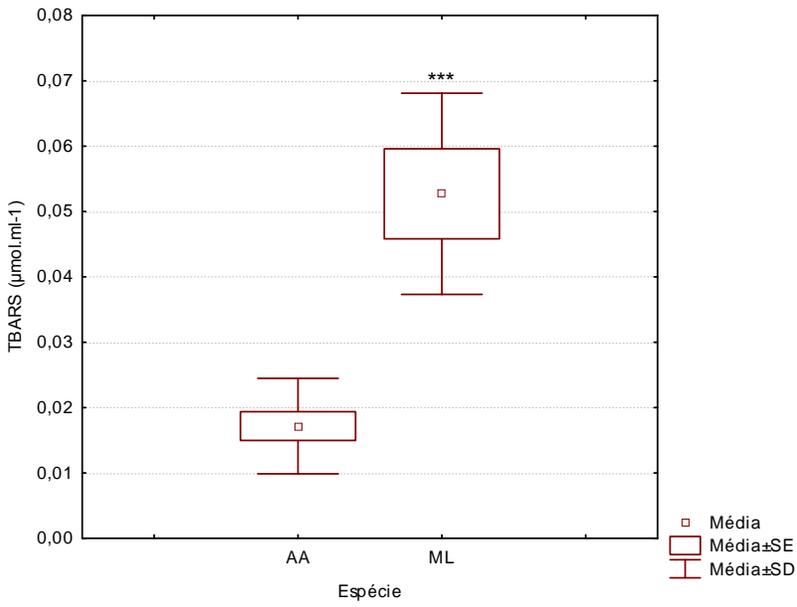


Fig.6: Diagrama de caixa mostrando os valores de concentração do composto TBARS, marcador de oxidação lipídica, de *A. australis* e *M. leonina*. *** = $p < 0,001$.

Os valores de distância euclidiana entre os indivíduos foram calculados em uma matriz de distâncias (Tab.3), a partir dos valores de concentração e/ou atividade das enzimas e deram origem a um dendrograma entre indivíduos mais similares (Fig.7).

Tab.3: Matriz de distâncias euclidianas entre os indivíduos amostrados, identificados de 2365 a M5b, com base nos valores referentes a **s**uperóxido dismutase (SOD), **c**atalase (CAT), **g**lutationa redutase (GR), **g**lutationa S-transferase (GST), **g**lutationa peroxidase (GPx) e TBARS.

| | 2365 | 2592 | 2593 | 2594 | 2599 | 2600 | 2601 | 2606 | 2607 | 2609 | 2611 | M2a | M6a | M4b | M19b | M5b |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 2365 | - | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2592 | 1,25 | - | | | | | | | | | | | | | | |
| 2593 | 0,77 | 1,19 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 2594 | 1,31 | 1,32 | 0,87 | - | | | | | | | | | | | | |
| 2599 | 1,88 | 1,84 | 1,64 | 1,51 | - | | | | | | | | | | | |
| 2600 | 0,97 | 1,35 | 0,61 | 0,82 | 1,22 | - | | | | | | | | | | |
| 2601 | 3,18 | 2,83 | 3,38 | 2,94 | 3,26 | 3,13 | - | | | | | | | | | |
| 2606 | 1,15 | 1,05 | 0,91 | 0,50 | 1,48 | 0,75 | 2,57 | - | | | | | | | | |
| 2607 | 0,69 | 1,31 | 0,52 | 0,73 | 1,56 | 0,51 | 3,01 | 0,68 | - | | | | | | | |
| 2609 | 0,69 | 1,40 | 1,11 | 1,19 | 1,74 | 1,02 | 2,64 | 0,96 | 0,69 | - | | | | | | |
| 2611 | 1,13 | 1,17 | 0,98 | 0,59 | 1,58 | 0,79 | 2,58 | 0,31 | 0,71 | 0,92 | - | | | | | |
| M2a | 6,05 | 5,72 | 6,28 | 6,67 | 6,17 | 6,12 | 6,14 | 6,24 | 6,34 | 6,19 | 6,26 | - | | | | |
| M6a | 3,94 | 3,85 | 4,22 | 4,68 | 4,34 | 4,15 | 4,37 | 4,27 | 4,22 | 4,02 | 4,38 | 3,28 | - | | | |
| M4b | 4,14 | 3,59 | 4,18 | 4,52 | 3,64 | 4,05 | 4,92 | 4,22 | 4,34 | 4,32 | 4,33 | 3,47 | 3,00 | - | | |
| M19b | 4,61 | 4,31 | 4,79 | 5,20 | 4,42 | 4,62 | 5,12 | 4,83 | 4,86 | 4,74 | 4,92 | 2,43 | 2,00 | 1,60 | - | |
| M5b | 3,84 | 3,27 | 4,01 | 4,24 | 3,63 | 3,87 | 3,78 | 3,84 | 4,02 | 3,83 | 3,98 | 3,47 | 1,96 | 1,76 | 1,70 | - |

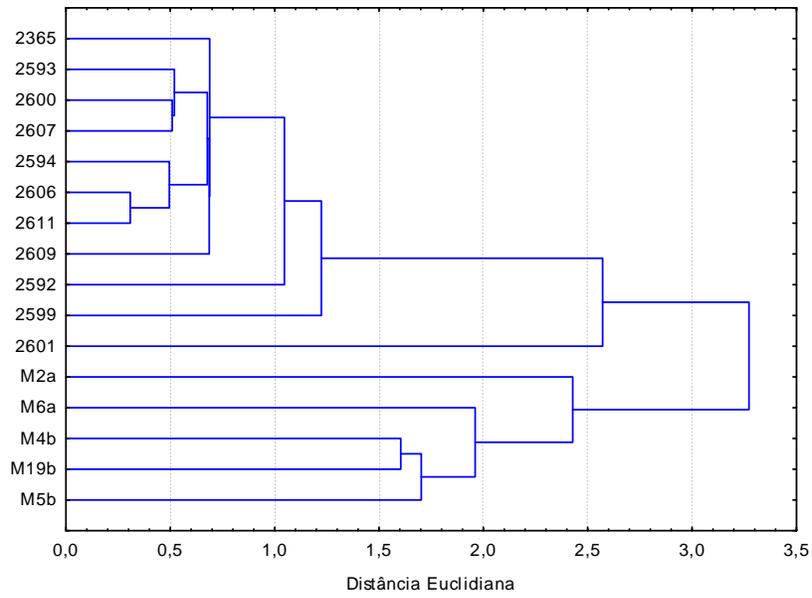


Fig. 7: Dendrograma da análise de agrupamento mostrando a semelhança entre indivíduos, *Arctocephalus australis* (numerados de 2365 a 2601) e *Mirounga leonina* (M2a a M5b), com base nos valores padronizados das variáveis enzimáticas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST), e níveis de TBARS.

DISCUSSÃO

Quando comparamos os valores dos biomarcadores de estresse oxidativo podemos verificar que estes são significativamente mais elevados em *M. leonina* para as mensurações de todas as atividades das enzimas antioxidantes examinadas, e também para danos decorrentes de oxidação lipídica (níveis de TBARS).

As atividades intraeritrocitárias da SOD e CAT mensuradas foram quase cinco vezes maiores em *M. leonina* ($p < 0,001$ para ambos os casos) (Tab.2), constituindo os biomarcadores mais representativos na comparação interespecífica. A enzima SOD, considerada a primeira barreira enzimática antioxidante do organismo, dismuta o radical superóxido, gerado diretamente a partir do uso metabólico do oxigênio nas cristas mitocondriais, gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em organismos cuja produção de **EROs** é aumentada, é natural que a atividade desta enzima seja proporcionalmente elevada.

A degradação do sub-produto da atividade de SOD (H_2O_2) é realizada, principalmente, pelas enzimas CAT e GPx. A CAT é uma das enzimas mais ativas em organismos aeróbios e, embora sua afinidade pelo H_2O_2 seja relativamente baixa (DI MEO; VENDITTI, 2000), seu *turn-over* é o mais elevado de todas as enzimas conhecidas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). As altas concentrações de H_2O_2 , potencialmente reflexo da atividade elevada de SOD, podem igualmente elevar a atividade da CAT, como o observado neste estudo.

Os valores de atividade da GPx foram significativamente mais altos em *M. leonina* ($p < 0,0001$), com média aproximadamente quatro vezes maior que a observada para *A. australis*, diferença esta bastante similar à observada para a CAT. Esta relação seria esperada, visto que ambas as enzimas catalisam a degradação de H_2O_2 , sendo

consideradas, em conjunto com a SOD, as enzimas antioxidantes mais ativas em organismos aeróbios (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

As enzimas GST e GR também apresentaram valores significativamente maiores em *M. leonina*. A GST ($p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente) foi a medida com a menor diferença entre as espécies, homogeneidade esta relacionada à função principal desta enzima, que é a degradação de xenobiontes através da conjugação com GSH, ainda que participe também da degradação de produtos da oxidação celular, como os hidroperóxidos (avaliados nos níveis de TBARS) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). No presente estudo, que não buscou verificar a influência de xenobiontes, esta é, possivelmente, uma variável irregularmente distribuída entre os indivíduos, sem participação na distinção dos dois grupos.

Excluído:

A GR (Fig.2), por sua vez, tem o papel importante de manutenção dos níveis de GSH intracelulares, reciclando continuamente a forma oxidada, a GSSG, à sua forma reduzida, a GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). O alto valor de atividade enzimática da GR em *M. leonina* poderia indicar a alta utilização da GSH para neutralização de processos de oxidação dos metabólitos celulares nesta espécie.

Neste sentido, os valores mais elevados de TBARS em *M. leonina* ($p < 0,0001$) também parecem indicar que processos oxidativos continuam ocorrendo em taxas elevadas, reforçando a hipótese de que, apesar de possuírem defesas antioxidantes mais elevadas, tempos maiores de mergulho acentuariam o processo de injúria relacionado às mudanças extremas entre estados de isquemia/reperfusão (IR) (e reoxigenação) a que se submete *M. leonina*, gerando ainda assim, maior dano lipídico em seus tecidos.

O processo de injúria acima referido ocorre pela privação de oxigênio, a qual gera acúmulo de substâncias, como a hipoxantina (HX) e a enzima xantina oxidase (XO), que tornam o panorama celular propício à geração de altas quantidades de ERO (GILLANI, 2012).

No momento de reperfusão, o oxigênio é restabelecido aos tecidos isquêmicos, fornecendo o substrato necessário para o desencadeamento de diversas reações oxidativas no interior das células (GILLANI, 2012). O metabolismo de ATP também retorna a valores “normais”, contribuindo para uma produção ainda maior de ERO, como sub-produtos naturais da cadeia respiratória celular (HALLIWELL & GUTTTERIDGE, 2006).

Dentre os processos oxidativos que ocorrerão no momento de reperfusão, a lipoperoxidação (dano lipídico) tem papel de destaque. Este processo ocorre devido à grande afinidade das EROs por ácidos graxos poliinsaturados, retirando elétrons de sua estrutura, e gerando degradação de porções vitais à célula, como a membrana celular, através da ativação de vias metabólicas das ciclooxigenases e lipoxigenases (GILLANI, 2012).

Embora sejam observadas evidências de oxidação lipídica mais acentuada em *M. leonina*, estas podem não representar, necessariamente, um quadro de estresse oxidativo, pois a espécie pode apresentar maior tolerância a moléculas oxidadas, como descrito para outros grupos animais (CRUZ, 2012), de maneira a adaptar-se à condição extrema a qual deve se submeter rotineiramente.

As diferenças quanto aos padrões antioxidantes descritos acima, obtidos para *Mirounga leonina* e *Arctocephalus australis*, podem estar relacionadas a diferenças específicas entre os dois grupos, como o comportamento de mergulho, e, em decorrência da amostragem realizada, podem estar também relacionadas às distinções quanto ao sexo e faixa etária dos indivíduos amostrados. Todos estes aspectos foram considerados na discussão sobre os possíveis fatores determinantes das diferenças em biomarcadores de estresse oxidativo encontradas entre os grupos

Mirounga leonina realiza mergulhos significativamente mais longos que *Arctocephalus australis* (HINDELL & PERRIN, 2008; BENNETT; MCCONNELL; FEDAK, 2001; RIEDMAN 1990; Kooyman and Gentry apud LE BOEUF et al. 1988; TRILLMICH et al. 1986). No entanto, mergulhos mais profundos não representam, necessariamente, períodos de submersão mais longos. Grandes profundidades impõem um aumento

exponencial de pressão sobre o organismo, que podem levar à distorção e compressão de órgãos e tecidos e mudanças na solubilidade tecidual de gases (KOOYMAN; PONGANIS, 1998). Apesar de importantes do ponto de vista adaptativo, grandes pressões (i.e. grandes profundidades), não se relacionam diretamente a mecanismos oxidativos e, portanto, não podem ser consideradas como fatores potencialmente explicativos às diferenças enzimáticas e no biomarcador de dano oxidativo encontrados no presente estudo. Períodos de submersão mais longos, por sua vez, estão diretamente relacionados à restrição de oxigênio ao organismo e, conseqüentemente, aos processos oxidativos e de sua proteção antioxidante.

Muitas espécies de vertebrados devem lidar com variações na disponibilidade de oxigênio esporadicamente, como resultado de processos de hibernação, ou rotineiramente, como em processos de torpor diário, mergulho, entre outros. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes durante os processos de hipóxia ou de maneira constitutiva no organismo, e não somente nos momentos em que o indivíduo é exposto à produção elevada de EROs, caracterizaria, nas situações descritas acima, um processo antecipatório ao momento de reoxigenação dos tecidos e de reexposição ao oxigênio (DI MEO; VENDITTI, 2000) e à elevada produção de EROs, ocorrendo de forma pontual em situações esporádicas de hipóxia, ou como adaptação constitutiva nos casos de exposição rotineira à este quadro.

Neste sentido, as diferenças constitutivas das atividades enzimáticas verificadas no presente estudo, para *Arctocephalus australis* e *Mirounga leonina*, poderiam, da mesma forma, representar processos antecipatórios de magnitude distinta, em resposta às diferenças de tempos de privação e reintrodução de oxigênio.

Espécies de focídeos são, em geral, exímios mergulhadores. Neste grupo, os mergulhos usualmente alcançam e, não raramente, excedem o ADL pré-estabelecido para a espécie (THOMPSON; FEDAK, 2001), sendo seguidos por períodos de recuperação bastante curtos e que independem do período em submersão (LE BOEUF et al., 1988). Os mergulhos de focídeos como *M. leonina*, que se aproximam ou excedem o ADL apresentam, inclusive,

velocidades de descida e volta à superfície bastante elevadas, resultando igualmente em um elevado consumo de oxigênio, o que significa que a reserva corporal de oxigênio, ainda que maior que a de espécies de otarídeos (KOOYMAN, 1995; KOOYMAN; CASTELLINI; DAVIS, 1986), é frequentemente exaurida durante os mergulhos (LE BOEUF et al., 1988). *M. leonina* (Phocidae) apresenta duração média dos mergulhos ($24,30 \pm 5,60$ min.) (SLIP et al., 1994), quase dez vezes maior que em *A. australis* (Otariidae) ($2,8 \pm 0,5$ min.) (TRILLMICH et al., 1986). Esta maior capacidade poderia ser explicada, em um primeiro momento pelo maior volume das reservas de O₂ corporal em focídeos (LENFANT, 1970; KOOYMAN, 1985). No entanto, embora inexistem dados espécie-específicos, as reservas de O₂ total do elefante marinho do hemisfério norte, *Mirounga angustirostris* (82,1 ml/Kg) (THORSON, 1993) e do lobo-marinho do norte, *Callorhinus ursinus* (52,1 ml/Kg) (LENFANT, 1970), considerados aqui “representantes” de *M. leonina* e *A. australis* respectivamente, são muito mais similares que as médias de mergulho desenvolvidas pelas duas últimas espécies, indicando que *M. leonina* deve apresentar, necessariamente, mudanças metabólicas também maiores, essenciais para que tais períodos de submersão sejam alcançados.

De fato, focídeos desenvolvem processos de bradicardia mais intensos durante o mergulho (IRVING Apud KOOYMAN; CASTELLINI; DAVIS, 1986) resultando em uma redução na disponibilidade de oxigênio aos tecidos muito maior que a observada para outras espécies de pinípedes. Decorrente destas mudanças metabólicas mais intensas, a reexposição ao oxigênio, para espécies como *M. leonina*, deve ser ainda mais impactante e desafiadora, uma vez que a reperfusão sanguínea representará o reestabelecimento de contato do oxigênio com tecidos em extremos de isquemia. O processo de injúria/reperfusão (I/R), associado à maior capacidade de mergulho desta espécie, deve, necessariamente, ser compensado com a dotação de uma melhor capacidade constitutiva de defesas antioxidantes (WILHELM FILHO et al., 2000), o que fica evidente nos valores significativamente maiores de todas as enzimas antioxidantes analisadas em *M. leonina*.

Espécies de otarídeos, por sua vez, não devem apresentar durante o mergulho mudanças metabólicas tão extremas. Apesar da inexistência de estudos que corroborem diretamente

Excluído: ¶

esta hipótese, sabe-se que as espécies mergulhadoras “rasas”, como *A. australis*, raramente atingem durante os mergulhos o ADL estabelecido para a espécie, possivelmente em decorrência de um benefício direto de “abandonar” o forrageamento que não será bem sucedido (THOMPSON; FEDAK, 2001).

Este encerramento “precoce” do mergulho, antes de atingir a limitação biológica, representa que estas espécies raramente submetem-se ao extremo de sua capacidade e, conseqüentemente, ao seu extremo de adaptação metabólica (KOOYMAN, 1985).

Kooyman e Campbell (1972) observaram, para a foca de Weddel (*Leptonychotes weddelli*), que em mergulhos curtos, abaixo do ADL da espécie, a frequência de batimentos cardíacos, uma das principais adaptações metabólicas a privação de oxigênio, era similar a frequência de repouso na superfície. Da mesma forma a atividade renal, função também reduzida em momentos de adaptação metabólica a privação de O₂, permanece igual em mergulhos abaixo de 13min, considerados curtos para a espécie (KOOYMAN, 1985).

Mergulhos quase sempre abaixo do seu ADL poderiam representar para *A. australis* mudanças metabólicas igualmente baixas. Mesmo em mergulhos próximos ou além do ADL para a espécie, o período de submersão significativamente menor representa menor tempo de privação ao oxigênio que aquele enfrentado rotineiramente por *M. leonina*, tornando necessárias adaptações metabólicas muito mais brandas, gerando uma menor produção de EROs no retorno à superfície e, conseqüentemente e comparativamente, uma menor necessidade de proteção antioxidante, observada nos resultados obtidos neste estudo (Fig 1 a Fig.6).

Em decorrência das amostragens neste estudo, no entanto, os indivíduos não foram diferenciados apenas em caráter de espécie, mas também quanto à faixa etária e o sexo. Todos os indivíduos de *M.leonina* foram fêmeas adultas, enquanto os de *A. australis* foram machos juvenis.

Neonatos tanto de cetáceos, quanto de pinípedes possuem concentrações musculares de mioglobina, uma das principais fontes de oxigênio durante o mergulho, insuficientes para mergulhos prolongados (representam apenas de 10 a 30% das concentrações

encontradas em adultos). Estas concentrações musculares de mioglobina atingem concentrações suficientes a mergulhos longos somente quando estes indivíduos já estão mais desenvolvidos fisicamente, quase ao mesmo tempo em que se iniciam atividades de forrageamento independente das mães (NOREN et al., 2001).

O exato intervalo de tempo necessário para que ocorra o amadurecimento desta e de outras fontes e/ou reservas de oxigênio, no entanto, varia entre as várias espécies de mamíferos mergulhadores. Filhotes de elefantes-marinhos, durante as dez primeiras semanas de vida, passam por mudanças bruscas no comportamento de mergulho (passam mais tempo submersos quando na água, realizam mergulhos mais longos e mais profundos). No entanto, com aproximadamente três meses e meio, tais comportamentos já são similares aos de adultos. Quando estão prontos para irem ao mar, suas reservas de oxigênio corpóreo já estão alcançam valores de 60.3ml/Kg, 73,5% daquela observada para adultos (82.1ml/Kg) (THORSON; LE BOEUF, 1994). De acordo com Le Boeuf (1994), indivíduos a partir de dois anos de idade já são exímios mergulhadores e desenvolvem o mesmo padrão de mergulho, com médias de profundidade e tempo de submersão comparáveis aqueles apresentados por indivíduos adultos (machos e/ou fêmeas).

A “maturação” das reservas de O₂ também acontece muito antes da transição à idade adulta para outros focídeos, como *Phoca vitulina* (BURNS et al., 2005).

Para Otarídeos, apesar do processo de independência das mães e início dos mergulhos mais longos para forrageamento ser mais lento, as reservas de oxigênio atingem valores similares aos de adultos em tempo parecido àquele observado para algumas espécies de focídeos. Em *Arctocephalus galapogoensis* (Otariidae, Arctocephalinae), o desenvolvimento de parâmetros sanguíneos (hematócrito – HCT, contagem de hemácias – RBC, hemoglobina – Hb) ocorre até os dois anos de idade, mas alcança valores similares aos de adultos entre apenas 6 meses e um ano de idade. Nesta idade ocorre também a transição de atividade primariamente terrestres para o forrageamento

Excluído: ¶

independente e os indivíduos apresentam, inclusive, padrões de mergulho similares aos de adultos (HORNING; TRILLMICH, 1997).

Nesta e em outras espécies de pinípedes, a “maturação” das reservas de oxigênio marca a transição de um comportamento apenas parcialmente aquático, com mergulhos rasos e curtos e, em grande parte dos casos, com dependência da mãe para obtenção de alimento, para um estágio independente, com mergulhos mais longos e profundos, que se assemelham em profundidade e duração aos desenvolvidos por adultos.

Estas semelhanças evidenciam que juvenis e adultos devem ser considerados iguais quando discutimos comportamentos de mergulho, processos isquêmicos referentes a estes e suas conseqüências metabólicas. Quaisquer diferenças encontradas em biomarcadores de estresse oxidativo entre os dois grupos não seriam, portanto, resultado da classificação etária distinta.

No que se refere ao sexo, esperaríamos que machos e fêmeas apresentassem distinções comportamentais proporcionais ao grande dimorfismo sexual morfológico encontrado tanto em *M. leonina* quanto em *A. australis*. De fato, por serem consideravelmente maiores, machos de *M. leonina* apresentam maior ADL teórico, o que, no entanto, não se reflete em maiores períodos de submersão e/ou mergulhos em profundidades mais elevadas. Hindell (1992) não verificou, para espécie, padrões diferenciados entre machos e fêmeas quanto à duração média de mergulho, nem tempo na superfície.

Estudos com outro focídeo, *Phoca vitulina* (Harbour Seal ou foca comum) também não identificaram diferenças significativas no padrão hematológico, e nas reservas totais de oxigênio entre machos e fêmeas, em diferentes faixas etárias (BURNS et al, 2005).

Para o gênero *Arctocephalus* sp., uma maior concentração de hemoglobina em fêmeas juvenis (HORNING; TRILLMICH, 1997) poderia estar relacionada a uma pequena (3%) porém significativa diferença na duração máxima dos mergulhos de machos e fêmeas juvenis de *Arctocephalus galapogoensis* (HORNING, 1992 apud HORNING; TRILLMICH,

1997). Este dado, no entanto, difere do observado para outras espécies do gênero (*Arctocephalus pusillus doriferus* e *Arctocephalus forsteri*), em que machos, em decorrência possivelmente do maior tamanho corporal, realizam mergulhos para forrageamento mais profundos que fêmeas (ARNOULD, J. P. Y., 2008). Apesar de aparentemente conflitantes, os trabalhos citados acima reforçam que o dimorfismo sexual, marcante para algumas espécies de pinípedes, se acentua conforme os indivíduos atingem a maturidade sexual. Em indivíduos juvenis, portanto, diferenças comportamentais de mergulho e forrageamento serão, se presentes, pequenas.

Devido à totalidade de indivíduos de *Arctocephalus australis* amostrados neste trabalho serem classificados como juvenis, consideramos que os valores obtidos podem representar fielmente o padrão de biomarcadores de estresse oxidativo tanto de machos quanto de fêmeas da espécie.

A ausência de diferenças significativas quanto ao comportamento de mergulho entre machos e fêmeas adultos de *M. leonina* e a pequena, se presente, diferença esperada entre juvenis de ambos os sexos de *A. australis* evidenciam que as grandes distinções entre os valores obtidos para as espécies não devem ser consideradas reflexo da classificação sexual dos indivíduos, reforçando que tais distinções decorrem, especialmente, da grande diferença comportamental interespecífica existente.

Por fim, a análise de agrupamento (Fig.7) nos permite visualizar espacialmente a separação das duas espécies amostradas com base em todas as variáveis mensuradas (atividades da CAT, SOD, GR, GPx, GST e níveis de TBARS), confirmando que o padrão de biomarcadores de estresse oxidativo considerados em conjunto, é distinto entre elas. Podemos observar também que indivíduos de *A. australis* são, aparentemente mais semelhantes entre si quanto a estes padrões do que os indivíduos de *M. leonina*, o que indicaria uma menor variação dentro desta espécie. Tal observação poderia, no entanto, ser decorrente de tamanhos amostrais diferentes, com onze indivíduos representantes de *A. australis* e cinco apenas de *M. leonina*.

No dendograma também podemos observar que, em *A. australis*, alguns indivíduos estão mais relacionados entre si. Estes agrupamentos internos podem ser decorrentes das diferentes colônias de origem dos animais amostrados. *A. australis* possui diversas colônias na costa do Uruguai e Argentina, e em costas mais distantes como Chile e Peru (VAZ-FERREIRA, 1979). Animais oriundos de uma mesma colônia possivelmente apresentarão maiores semelhanças entre si, inclusive quanto ao padrão de biomarcadores de estresse oxidativo, em decorrência de características ambientais e, potencialmente, de padrões comportamentais também distintos entre estes grupos.

O mesmo não ocorre para os indivíduos de *M. leonina*, que neste estudo foram amostrados todos a partir de uma mesma colônia, em Chubut – Argentina.

Ainda com base no dendograma, destaca-se um indivíduo de *A. australis*, identificado pelo número 2601, que difere consideravelmente dos demais, aparecendo externamente aos agrupamentos. Esta separação ocorreu como resultado do valor obtido para a enzima GST, quase quatro vezes mais elevado neste indivíduo que o encontrado para a média dos demais *A. australis*. A GST, como discutido anteriormente, possui um papel enzimático duplo. Embora participe também da degradação de produtos oxidados, participa ativamente da degradação de xenobiontes, através da conjugação destes compostos hidrofóbicos a GSH, reduzindo sua toxicidade e tornando-os mais hidrofílicos e, portanto, mais facilmente eliminados. Compostos como PAH e PCB, resíduos oriundos de atividade industrial, são exemplos dos compostos cuja degradação depende da atividade desta enzima. Um aumento nos valores deste pode estar indicando a presença de grande quantidade destes ou de outros xenobiontes no local de origem do animal, o que acarretaria em um aumento na atividade enzimática da GST de maneira a adaptar-se a exposição elevada a estes compostos.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam uma clara diferenciação entre as espécies *Mirounga leonina* e *Arctocephalus australis* quanto ao padrão de biomarcadores de estresse oxidativo. Embora as espécies difiram também quanto ao sexo e a faixa etária dos indivíduos amostrados, diversos trabalhos analisados reforçam a hipótese de que tais diferenças são resultado de uma adaptação constitutiva a intensidades de produção de EROS diferentes e proporcionais ao tempo médio de submersão durante os mergulhos.

Mirounga leonina apresenta, portanto, concentração e atividade antioxidante enzimática mais elevada, pois se submete, rotineiramente, a mergulhos mais longos, que exigem adaptações metabólicas extremas e resultam em altas taxas de produção de EROS no retorno à superfície. *Arctocephalus australis*, ao contrário, mergulha por períodos curtos, poupando o organismo de adaptações metabólicas intensas e, conseqüentemente, diminuindo a produção de EROS em decorrência da reexposição ao oxigênio. Este é o primeiro estudo comparativo a confirmar a hipótese de relação entre tempo de mergulho e as defesas antioxidantes constitutivas de mamíferos mergulhadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 204, p., 234-254, 1984.

ANDREWS, R. D. et al. Heart rates of northern elephant seals diving at sea and resting on the beach. **Journal of Experimental Biology** v.200, p.2083-2095. 1997.

Excluído: ¶



ARNOULD, J. P. Y Southern Fur Seals. In **Encyclopedia of marine mammals** 2nd ed (ed. W. F. Perrin, B. Wursig and J. G. M. Thewissen). P.1079-1084. USA. Academic Press, 2008.

BENNETT, K. A.; McCONNELL, B. J.; FEDAK, M. A. Diurnal and seasonal variations in the duration and depth of the longest dives in southern elephant seals (*Mirounga leonina*): Possible physiological and behavioural constraints. **Journal of Experimental Biology**. v.204, p.649-662. 2001.

BERTA, A.; SUMICH, J. L. **Marine Mammals : Evolutionary Biology**. Academic Press. San Diego/ California. 1999.

BLIX, A. S.; WALLOE, L.; MESSELT, E. B.; FOLKOW, L. P. Selective brain cooling and its vascular basis in diving seals. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 2610-2616, 2010.

BURNS, J. M. et al. Development of Body Oxygen Stores in Harbour Seals: Effects of age, mass and body composition. **Physiological and Biochemical Zoology**. v.78, n.6, p.1057-1068. 2005.

BUTLER, P. J. Diving beyond the limits. **News Physiological Science** v. 16, p. 222-227. October 2001.

CASTELLINI, M. A.; KOOYMAN, G. L.; PONGANIS, P. J. Metabolic rates of freely diving Weddell seals: Correlations with oxygen stores, swim velocity and diving duration. **Journal of Experimental Biology**, v.165, p. 181-194, 1992.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Methods in Enzymology** v 113, p. 484-490, 1985.

CANTÚ-MEPELLÍN, N. et al. Differential antioxidant protection in tissues from marine mammals with distinct diving capacities. Shallow/short vs. deep/long divers. **Comparative Biochemistry and Physiology (A)**, v.158, p.438-443. 2011

CROCKER, D. E.; COSTA, D. P. Pinniped physiology. In **Encyclopedia of marine mammals** 2nd ed (ed. W. F. Perrin, B. Wursig and J. G. M. Thewissen). p. 873-878 USA. Academic Press, 2008.

DAVIS, R. W. et al. The diving paradox : New insights into the role of the dive response in air breathing vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology (A)** v.138, p.263-268. 2004.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Protection against oxidative stress in vertebrate tissues. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 7, p. 101-111, 2000.

ELSNER, R. et al. Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen radicals. **Comparative Biochemistry and Physiology (A)**. v. 119, p. 975-980, 1998.

FLOHÉ L.; ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in Enzymology** vol.105, p.93-104, 1984.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione-S-Transferases : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry** v.249, n.22, p.7130-7139. November 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. Oxford Press. 1999.

HASTIE, G.D.; ROSEN, D. A. S.; TRITES, A. W. Reductions in oxygen consumption during dives and estimated submergence limitations of steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). **Marine Mammal Science**, v. 23, n.2, p. 272-286, April 2007.

HERMES-LIMA, M., ZENTENO-SÁVIN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and physiology Part C**, v.133, p. 537-556. 2002.

HINDELL, M. A.; SLIP, D. J.; BURTON, H. R.; BRYDEN, M. M. Physiological implications of continuous, prolonged and deep dives of the southern elephant seal (*Mirounga leonina*). **Canadian Journal of Zoology**, v.70, p. 370-379. 1992

HINDELL, M. A.; PERRIN, W. F. Elephant Seals In **Encyclopedia of marine mammals** 2nd ed (ed. W. F. Perrin, B. Wursig and J. G. M. Thewissen), p.364-367 USA. Academic Press, 2008.

HINDLE, A. G. et al. Dive response differs between shallow and deep-diving Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 394, p. 141-148. 2010.

HOCHACHKA, P. W.; STOREY, K. B. Metabolic consequences of diving in animals and man: The diving habits call for controlled oscillation between aerobic and anaerobic metabolism. **Science** v. 187, p. 613-621, February 1975.

HOCHACHKA, P. W. et al. Pulmonary metabolism during diving: Conditioning blood for the brain. **Science**, v. 198, p. 831-834. 1977.

HOCHACHKA, P. W. Brain, lung and heart functions during diving and recovery. **Science** v. 212, p. 509-514. May 1981.

HOCHACHKA, P. W. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proceedings Natural Academy of Science of USA**, v.93, p. 9493-9498, 1996.

HORNING, M.; TRILLMICH, F. Development of Hemoglobin, Hematocrit, and Erythrocyte values in Galapagos Fur Seals. **Marine Mammal Science**. V.13, n.1, p.100-113. 1997.

JEFFERSON, T. A.; WEBBER, M. A.; PITMAN, R. L. **Marine Mammals of the World: A comprehensive guide to their identification**. 1st edition. Academic Press. 592p. 2007.

KANATOUS, S. B. High aerobic capacities in the skeletal muscles of pinnipeds: adaptations to diving hypoxia. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, n.1, p.1283-1291, April 1999.

KOOYMAN, G. L. Physiology without restraint in diving mammals. **Marine Mammal Science**, v. 1, n.2, p. 166-178, 1985.

KOOYMAN, G. L.; CAMPBELL, B. Heart Rates in Freely Diving Weddell Seals *Leptonychotes weddelli*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 43, n.1, p. 31-36. 1972.

KOOYMAN, G. L.; CASTELLINI, M. A.; DAVIS, R. W. Physiology of diving in marine mammals. **Annual Review in Physiology**, v. 43, p. 343-356, 1981.

KOOYMAN, G. L.; PONGANIS, P. J. The physiological basis of diving to depth: Birds and mammals. **Annual Review in Physiology**, v. 60, p. 19-32. 1998.

KUHN, C. E. et al. Diving Physiology and winter foraging behaviour of a juvenile leopard seal (*Hydrurga leptoxia*). **Polar Biology**, v. 29, p. 303-307, 2006.

LENFANT, C.; JOHANSEN, K.; TORRANCE, J. D. Gas Transport and Oxygen Storage Capacity in some Pinnipeds and the sea otter. **Respiration Physiology**, v.9, p. 277-286. 1970.

LE BOEUF, B. J.; COSTA, D. P. ; HUNTLEY, A. C.; FELDKAMP, S. D. Continuous, deep diving in female northern elephant seals, *Mirounga Angustirostris*. **Canadian Journal of Zoology** v. 66, p.446-458. 1988.

LE BOEUF, B. J. Variation in the diving pattern of northern elephant seals with age, mass, sex and reproductive condition In: **Elephant Seals: Population Ecology, Behaviour and Physiology** (ed. Le Boeuf, B.J.; Laws, R. M.). p 237-251. University of California Press USA. 1994.

LEVETT, D. Z. H.; MILLAR, I. L. Bubble trouble: A review of diving physiology and disease. **Postgraduate Medical Journal** V. 84, p. 571-578. 2008.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review in Biochemistry**, v.52, p. 711-760. 1983

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, L. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **Journal of Biological Chemistry** v.246, n.22, p.6886-6890. November 1971.

MORENO, S.N.J. et al. Stimulation of lipid peroxidation and ultrastructural alterations induced by nifurtimox in mammalian tissues. **Medicina**. vol.40, p.553-559, 1980.

MORI, Y. The optical allocation of time and respiratory metabolism over the dive cycle. **Behavioural Ecology**, v.10, n.2, p.155-160. 1999

NOREN, S. R. et al. The development of diving in marine endotherms : preparing the skeletal muscles of dolphins, penguins and seals for activity during submergence. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 171, p.127-134. 2001.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of The World**. 5th ed. v.2 London. The John Hopkins University Press, 1991.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** v.95, n.2, p.351-358. June 1979.

RIEDMAN, M. **The pinnipeds: Seals, Sea Lions and Walruses**. Berkley, University of California Press. 1990.

SLIP, D. J.; HINDELL, M. A.; BURTON, H. R. Diving behaviour of southern elephant seals from Macquarie island: an overview. In **Elephant Seals: Population Ecology, Behaviour and Physiology** (ed. B. J. Le Boeuf and R. M. Laws) p.253-270. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press. 1994.

THOMPSON, D.; FEDAK, M. A. Cardiac response of grey seals during diving at sea. **Journal of Experimental Biology**, v. 174, p. 139-164. 1993.

THOMPSON, D.; FEDAK, M.A. How long should a dive last? A simple model of foraging decisions by breath hold divers in a patchy environment. **Animal behaviour**, v. 61, p. 287-296. 2001.

THORSON, P. H.; LE BOEUF, B. J. Developmental aspects of diving in Northern Elephant Seal pups In: **Elephant Seals: Population Ecology, Behaviour and Physiology** (ed. Le Boeuf, B.J.; Laws, R. M.). p. 271-289. University of California Press USA. 1994

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. **Analytical Biochemistry** vol.27, p.502-522, 1969.

TRILLMICH, F.; KOOYMAN, G. L.; MAJLUF, P.; SANCHEZ-GRIAN, M. Attendance and diving behaviour of south American fur seals during el niño in 1983 (1986) In: Ropert-Coudert Y, Kato A (2012) **The Penguin book. World Wide Web electronic publication** (<http://penguinessbook.scarmarbin.be/>), version 2.0, March 2012.

TYACK, P. L. et al. Extreme diving in beaked whales. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 4238-4853. August 2006.

VAZ-FERREIRA, R. South American Fur Seals. In: **Mammals In the Seas vol.II: Pinniped species summaries and report on sirenians** (FAO Advisory Committee on Marine Resources Research), p.497-508. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, 1979.

VAZQUEZ-MEDINA, J. P.; ZENTENO-SAVÍN, T.; ELSNER, R. Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: Potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. **Comparative Biochemistry and Physiology (C)**, v. 142, p. 198-204, 2006.

VAZQUEZ-MEDINA, J. P.; ZENTENO-SAVÍN, T.; ELSNER, R. Glutathione Protection against dive-associated ischemia/reperfusion in ringed seal tissues. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 345, p.110-118. 2007.

WILHELM FILHO, D. et al. Comparative antioxidant defenses in vertebrates -Emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**, v.7, p. 33-45. 2000.

Formatado: Fonte: Negrito

WILHELM-FILHO, D. et al. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology (A)**, v. 133, p. 885-892. 2002.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs,N.J. 1974.

ZENTENO-SAVÍN, T.; CLAYTON-HERNÁNDEZ, E.; ELSNER, R. Diving seals: Are they a model for coping with oxidative stress? **Comparative Biochemistry and Physiology (C)**, v. 133, p. 527-536. May 2002.