

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

MARJORIANE DE AMARAL

**ADAPTAÇÕES METABÓLICAS SAZONAIS EM ANUROS SUL-AMERICANOS:
TOLERANDO O FRIO**

Porto Alegre
2020

MARJORIANE DE AMARAL

**ADAPTAÇÕES METABÓLICAS SAZONAIS EM ANUROS SUL-AMERICANOS:
TOLERANDO O FRIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski

Coorientador: Dr. Patrick Colombo

Porto Alegre

2020

“Imagine o conhecimento científico representado como uma ilha, rodeado pelo vasto oceano do desconhecido: A Ilha do Conhecimento.

Conforme novas pesquisas, descobertas e invenções são realizadas por universidades e centros de pesquisa, a ilha do conhecimento da humanidade se expande...

..., porém, ao expandirmos a área dessa nossa ilha, enquanto humanidade ou indivíduos, aumentamos também o perímetro que a delimita, estendendo nossa fronteira com o oceano do desconhecido. Isto é, descobrir ou aprender algo novo não nos aproxima necessariamente de uma resposta definitiva ou universal. Mas sim nos leva a compreensão de que existem cada vez mais perguntas a serem feitas, novas e mais pertinentes.”

(Marcelo Gleiser)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador Luiz Kucharski. Desde a graduação, ele abraçou esse projeto comigo e desprendeu seu tempo e enorme conhecimento para executarmos esse trabalho. Obrigada pelo apoio, incentivo (mesmo quando voltava de campo sem nenhum animal) e discussões sobre anuros e sua fisiologia durante esses anos. Não imagino orientador melhor, obrigada!

Ao meu coorientador, ou 'cô', Patrick Colombo, pelos inúmeros campos realizados e pela amizade. Seu conhecimento indiscutível foi parte essencial para a execução desse trabalho. Mesmo se arriscando a adquirir doenças como da 'vaca-louca', investiu seu tempo e apoio entrando em banhados pelo Rio Grande do Sul. Tu és um pesquisador incrível e inspirador, obrigada por tudo.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela formação acadêmica e suporte financeiro. Ainda que em tempos difíceis, resistimos e lutamos por uma educação pública, de qualidade e com incentivo à pesquisa brasileira.

Aos colegas e professores do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) pela ajuda nos experimentos e discussões durante esse período, em especial a Maiza e Renata pelas noites dentro do laboratório auxiliando nas técnicas realizadas. Agradeço também à Isadora, Leonardo e Mariana que além de serem colegas de laboratório se tornaram grandes amigos dessa jornada e de vida, obrigada por dividirem os momentos e tornar o mestrado mais leve e divertido.

Aos parceiros da eterna Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB) Dener, Carol, Marina, Duda, Bibi, Pri e Deivid pelas risadas em campo, acusações de abigeato, et Bilu e vinhos de garrafão ao final de campo.

Aos meus amigos pela compreensão da minha ausência durante vários períodos do mestrado e por sempre me apoiarem acima de tudo. À Suhellen, deixo um agradecimento especial pelo apoio, amizade de longa data e jantas com conversas jogadas fora.

Ao José que foi meu parceiro e meu maior incentivo durante esse período. Obrigada por caminhar comigo e sempre apoiar minhas decisões. Um breve agradecimento não é suficiente por tudo que fizeste inclusive auxiliar no laboratório em plena sexta-feira à noite ou ir a campo atrás de *pulchellas* em um domingo.

Por fim, agradeço à minha família pelo suporte durante esse período. Agradecimento especial à minha mãe Marlouve por incentivar meus sonhos, compreender minha ausência e estar presente nos momentos que preciso. Seu auxílio constante durante esse mestrado foi fundamental para a conclusão do mesmo. Obrigada!

RESUMO

Animais ectotérmicos, especialmente anuros, habitam diversos lugares do nosso planeta e desenvolveram algumas estratégias para garantir essa ampla distribuição. Alguns anuros sobrevivem em ambientes frios com temperaturas muito baixas devido a alterações metabólicas, como mobilização de crioprotetores (glicose, glicerol e ureia), armazenamento de glicogênio hepático e alterações na expressão de transportadores de membrana. O Rio Grande do Sul, sul do Brasil, apresenta temperaturas muito baixas no inverno, mas não há estudos sobre a adaptação de anuros durante o inverno nessa região. Neste estudo, o objetivo foi avaliar as estratégias fisiológicas adaptativas entre as diferentes estações do ano da espécie Sul-Americana *Boana pulchella* a fim de identificar as possíveis vias metabólicas que estariam modificadas sazonalmente e fornecer dados para o entendimento da biologia desses animais e de possíveis estratégias para criopreservação de tecidos. Para realização desse trabalho, foram coletados 33 indivíduos machos de *B. pulchella*, durante as quatro estações, em três diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Imediatamente após a coleta, os animais foram conduzidos até o Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo Comparado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, eutanasiados e seus tecidos coletados. Foi realizada a dosagem de concentração de glicose, glicerol, lactato e ureia no plasma. No tecido hepático e muscular foi medida a concentração de glicogênio, concentração de lactato, oxidação de glicose à dióxido de carbono (CO₂) e síntese de glicogênio a partir de glicose. No fígado, foi determinada a concentração de glicerol, ureia e triglicerídeos e no tecido adiposo a concentração de triglicerídeos. As diferenças entre os grupos foram testadas pelo teste ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey nas variáveis paramétricas e pelo teste Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunn para as não paramétricas. Os resultados mostraram que houve diferenças na concentração plasmática de glicose entre o outono e inverno/primavera e de glicerol entre o inverno e verão bem como na concentração muscular de lactato entre o inverno e verão. No verão, a oxidação de glicose a CO₂ foi maior no verão no músculo e fígado e a síntese de glicogênio a partir de glicose foi maior no verão no tecido muscular.

Através dos resultados obtidos podemos concluir que provavelmente no inverno há uma maior glicólise anaeróbica com produção de lactato comparada ao verão e uma maior utilização de glicose tanto para síntese de glicogênio quanto para oxidação durante o verão no tecido muscular. No fígado, os estoques de glicogênio são mantidos constantes ao longo do ano. No músculo, há uma maior concentração de glicogênio no outono juntamente com a menor

concentração de glicose plasmática, indicando que há uma preparação para aumentar as reservas de glicogênio durante o outono, deixando-as disponíveis para o inverno. A ureia hepática parece estar ligada ao catabolismo proteico e a produção parece variar ao longo das estações, onde a menor concentração de ureia ocorre quando há maior gliconeogênese hepática a partir de lactato ou maior concentração de ureia quando é necessária a síntese de glicerol a partir de aminoácidos.

Palavras-chave: Metabolismo. Alterações metabólicas. Sazonal. Anuros. *Boana pulchella*.

ABSTRACT

Ectothermic animals, especially anurans, can survive in almost all environments and developed strategies to guarantee this wide distribution. Some anurans survive in cold environments with very low temperatures due to metabolic changes, such as cryoprotectant mobilization (glucose, glycerol and urea), hepatic glycogen storage and changes in the expression of membrane transporters. Rio Grande do Sul, southern state of Brazil, show very low temperatures in winter and, however, haven't have studies on the adaptation of anurans during winter in this region. In this study, the aim was to verify if the South American tree frog *B. pulchella* have adaptive physiological strategies between the different seasons of the year. In order to identify the possible metabolic pathways that would be seasonally modified and provide data for understanding the biology of these animals and possible strategies for tissue cryopreservation. To carry out this study, 33 males of *B. pulchella* were collected, during the four seasons of the year, in three different cities in the state of Rio Grande do Sul. Immediately after the capture, animals were brought to the Laboratory of Endocrinology and Compared Metabolism at the Federal University of Rio Grande do Sul for biochemical analysis. Plasma glucose, glycerol, lactate and urea were measured in plasma. In the liver and muscle tissue were measured glycogen concentration, lactate concentration, glucose oxidation to CO₂ and glycogen synthesis from glucose. In the liver was determined the concentration of glycerol, urea and triglycerides and in the adipose tissue the concentration of triglycerides. Differences between groups were tested by one-way ANOVA test followed by Tukey post-test on the parametric variables and Kruskal Wallis test followed by Dunn post-test for the non-parametric ones. The results showed differences in the plasma concentration of glucose between autumn and winter/spring, of glycerol between winter and summer and in the lactate muscle concentration between winter and summer. In summer, glucose oxidation to carbon dioxide (CO₂) was higher in muscle and liver and glycogen synthesis from glucose was higher in summer in muscle tissue.

We can conclude by these results that probably in winter there is a higher anaerobic glycolysis with lactate production compared to summer and a higher use of glucose for glycogen synthesis and oxidation during summer in muscle tissue. In the liver, glycogen stores are kept constant throughout the year. In the muscle, the highest concentration of glycogen in the autumn was observed together with the lowest concentration of plasma glucose, which may indicate that there is a preparation to increase the glycogen reserves during the autumn, making them

available for the winter. Liver urea appears to be linked to protein catabolism and production appears to vary over the year. This variation suggests that the lowest concentration of urea occurs when there is a higher hepatic gluconeogenesis from lactate and a higher concentration of urea when glycerol synthesis from amino acids is necessary.

Keywords: Metabolism. Metabolic changes. Seasonal. Anurans. *Boana pulchella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representantes das ordens dos Anfíbios.

Figura 2 Mapa da riqueza de espécies de anfíbios no mundo.

Figura 3 Foto de dois morfos de *B. pulchella* ilustrando o polimorfismo de coloração na espécie.

Figura 4 Mapa da distribuição de *Boana pulchella* (polígono alaranjado).

Figura 5 Curva de sensibilidade térmica.

Figura 6 A) Mapa Distribuição de *Lithobates sylvaticus* em laranja.

B) Imagens da rã-da-madeira *Lithobates sylvaticus* (cima) em estado descongelado e (baixo) no estado congelado (Fotos de J. M. Storey).

Figura 7 Resumo das adaptações moleculares que suportam tolerância ao congelamento.

Figura 8 Via de biossíntese da glicose e glicerol.

Figura 9 Mapa com os três locais onde ocorreu a coleta dos animais desse estudo: Eldorado do Sul (ES), São Francisco de Paula (SFP) e Osório (O).

Figura 10 Dosagens metabólicas e bioquímicas realizados durante os experimentos.

Figura 11 Concentração de glicogênio no fígado (mg/g).

Figura 12 Concentração de glicerol no fígado (mg/g).

Figura 13 Concentração de lactato no fígado (mg/g).

Figura 14 Concentração de triglicerídeos no fígado (mg%).

Figura 15 Concentração de ureia no fígado (mg/g).

Figura 16 Oxidação de glicose a CO₂ no fígado (mmol/g/h).

Figura 17 Conversão de glicose a glicogênio no fígado (mmol/g/h).

Figura 18 A) Concentração de glicogênio no músculo (mg/g).

B) Concentração de lactato no músculo (mg/g).

Figura 19 Oxidação de glicose a CO₂ no músculo (mmol/g/h).

Figura 20 Conversão de glicose a glicogênio no músculo (mmol/g/h).

Figura 21 Concentração de triglicerídeos no tecido adiposo (mg%).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros climáticos e meteorológicos entre as estações do ano.

Tabela 2. Variação dos parâmetros morfométricos entre as estações do ano.

Tabela 3. Variações sobre os parâmetros séricos dos animais entre as estações do ano.

LISTA DE ABREVIATURAS

[U-¹⁴C]-glicose: Glicose uniformemente marcada com carbono 14 (metabolizável)

2-deoxi-D-[³H]-glicose-triciada: Glicose marcada no terceiro hidrogênio (não metabolizável)

AFGPs: Glicoproteínas anticongelantes

AFPs: Proteínas anticongelante

ANOVA: Análise de Variância

AQP3: Aquaporina da classe 3

CAT: Catalase

CEUA: Comissão de Ética e Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CRC: Comprimento rostro-cloacal

Ctmax: Temperatura máxima crítica

CTmin: Temperatura mínima crítica

DHAP: Dihidroxiacetona-fosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EEA/UFRGS: Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies reativas de oxigênio

Flona: Floresta Nacional de São Francisco de Paula

G3P: Glicerol-3-fosfato

G3PDH: Glicerol-3-fosfato desidrogenase

G3Pase: Glicerol-3-fosfatase

G6P: Glicose-6-fosfato

G6Pase: Glicose-6-fosfatase

GK: Glicerol quinase

GP: Glicogênio fosforilase

GPDH: Glicerol-3-fosfato desidrogenase

GPox: Glutational peroxidase

GLUT: Transportador de Glicose

GLUT1: Transportador de glicose tipo 1

GLUT2: Transportador de glicose tipo 2

GLUT3: Transportador de glicose tipo 3

GLUT4: Transportador de glicose tipo 4

GK: Glicoquinase

HK: Hexoquinase

IIQ: Intervalo interquartil

KW: Teste de Kruskal Wallis

LDH: Lactato desidrogenase

LaMEC: Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada

LC: Estado de conservação pouco preocupante

Pc: Ponto de congelamento

PCT: Peso Corporal Total

PEP: Fosfoenolpiruvato

PEPCK: PEP carboxiquinase

PFK1: Fosfofrutoquinase-1

PGM: Fosfoglicomutase

PNRS: Política Nacional de Resíduos Sólidos

SBCAL: Sociedade Brasileira de Animais de Ciência em Animais de Laboratório

SOD: Superóxido dismutase

Tc: Temperatura corporal

TCA: Ácido tricloroacético

Ta: Temperatura ambiente

To: Temperatura ótima

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Anfíbios	1
1.1.1 A Classe Amphibia	1
1.1.2 <i>Boana pulchella</i>	4
1.2 A vida em ambientes extremos	6
1.2.1 Temperatura corporal (Tc) x Temperatura ambiente (Ta)	7
1.3 Sobrevivendo ao frio	8
1.3.1 <i>Lithobates sylvaticus</i>	9
1.4 A vida no estado congelado	10
1.5 Estratégias fisiológicas e metabólicas para tolerar/suportar o congelamento em anuros..	12
1.5.1 Os danos do gelo no organismo.....	12
1.5.2 Crioprotetores.....	13
1.5.3 Alterações enzimáticas	15
1.5.4 Transportadores de membrana.....	16
1.6 Tolerância ao frio em anuros e a viabilidade celular no congelamento.....	17
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	18
2.1 Hipótese.....	18
2.2 Objetivo geral.....	19
2.3 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.1.1 Locais de coleta dos animais	20
3.1.2 Método de coleta em campo dos animais	21
3.1.3 Condições meteorológicas de coleta.....	21
3.2 Transporte dos animais e chegada ao local dos experimentos	22
3.3 Local e realização dos experimentos	22

3.4	Peso e comprimento dos animais	22
3.5	Coleta de sangue e processamento dos tecidos... ..	23
3.6	Descrição das técnicas realizadas.....	24
3.6.1	Morfometria e relação tecido/peso corporal total	24
3.6.2	Dosagens séricas	24
3.6.3	Determinação da concentração de glicogênio no fígado e no músculo.....	24
3.6.4	Oxidação de glicose (produção de $^{14}\text{CO}_2$) no fígado e músculo.....	25
3.6.5	Síntese de glicogênio a partir de glicose no fígado e no músculo	26
3.6.6	Determinação da concentração de glicerol no tecido hepático.....	26
3.6.7	Determinação da concentração de ureia no tecido hepático	27
3.6.8	Determinação da concentração de lactato no tecido hepático	27
3.6.9	Determinação da concentração de lactato muscular	27
3.6.10	Determinação da concentração de triglicerídeos no tecido hepático.....	28
3.6.11	Determinação da concentração de triglicerídeos no tecido adiposo subcutâneo ...	28
3.7	Análise estatística	28
3.8	Descarte de resíduos.....	29
4	RESULTADOS	29
4.1	Condições meteorológicas e climáticas de coleta.....	29
4.2	Morfometria e relação tecido/peso corporal total	30
4.3	Parâmetros séricos	31
4.4	Metabolismo no tecido hepático.....	32
4.4.1	Glicogênio.....	32
4.4.2	Glicerol	33
4.4.3	Lactato.....	33
4.4.4	Triglicerídeos	34
4.4.5	Ureia	34
4.4.6	Oxidação de glicose a CO_2	35
4.4.7	Síntese de glicogênio a partir de glicose	35

4.5 Metabolismo no tecido muscular.....	36
4.5.1 Glicogênio e lactato	36
4.5.2 Oxidação de glicose a CO ₂	37
4.5.3 Síntese de glicogênio a partir de glicose	37
4.6 Triglicerídeos no tecido adiposo	38
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICE A – Manutenção de <i>B. pulchella</i> em cativeiro	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anfíbios

1.1.1 A Classe Amphibia

A palavra anfíbia é derivada do grego *amphi* (dos dois lados) e *bios* (vida), indicando uma característica marcante desse grupo: possuem duas fases distintas de vida, uma larval aquática/úmida e outra fase de vida terrestre, pós-metamórfica (DUELLMAN & TRUEB, 1986). Apesar de muitas espécies de anfíbios viverem fora do ambiente aquático, a dependência da água durante a fase reprodutiva é indispensável para esses animais, pois seus ovos são desprovidos de casca e para manterem-se viáveis necessitam de umidade constante (DUELLMAN & TRUEB, 1986). No desenvolvimento indireto, os girinos, fase larval dos anfíbios subsequente à fase do ovo, possuem brânquias que facilitam a troca gasosa na água durante o período inicial de desenvolvimento (POUGH et al., 2008). Ao longo desse período de crescimento e metamorfose, os indivíduos assumem a troca gasosa através dos pulmões para fazer a transição de habitat e conseguir colonizar o ambiente terrestre (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Respirar o ar atmosférico, proteger-se da desidratação e adquirir uma forma de locomoção terrestre foram as novas adaptações adquiridas por esses animais (THOMSON, 1985) necessárias para habitar o ambiente terrestre (POUGH et al., 2008). Esse grande passo evolutivo fez com que os anfíbios desenvolvessem uma série de modificações morfológicas e comportamentais que permitiram a ocupação do novo ambiente.

Os anfíbios atuais pertencem a três ordens: Anura, Caudata e Gymnophiona (FROST, 2019). A ordem Anura abrange os sapos, rãs e pererecas. Os anfíbios dessa ordem não possuem cauda e apresentam pernas traseiras alongadas. Esses membros posteriores longos estão associados à sua capacidade de saltar, mas em algumas espécies, estão adaptados também para o nado, caminhada, corrida e escalada. Sua estrutura corporal é interligada com seu nicho e atividade ecológica. Alguns animais deste grupo são totalmente aquáticos, outros semiaquáticos ou, ainda, totalmente terrestres. As espécies arbóreas, por exemplo, normalmente têm membros longos e em algumas espécies observaram-se expansões nas pontas das patas que os ajudam a aderir a superfícies lisas. Já nas espécies terrestres, a

anatomia corporal é caracterizada por um corpo mais robusto e cabeça maior, com membros curtos adaptados para caminhadas ou corridas (POUGH, 2007). Uma das principais características dos anuros é a capacidade de emitir sons, a chamada vocalização. Cada espécie possui um canto ou vocalização própria, sendo o canto uma das principais formas de diferenciar uma espécie da outra. Somente os machos emitem cantos nupciais e esses cantos são essenciais para reproduzir-se, defender território, intimidar predadores e alertar sobre ameaças próximas (COLOMBO & ZANK, 2008). Na época reprodutiva, quando atraídas pelos machos, as fêmeas elegem o seu par e ocorre o amplexo (abraço nupcial) para a fertilização dos ovos (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

A ordem Caudata, por sua vez, é representada pelas salamandras e tritões que são anfíbios com quatro membros e cauda longa. A ordem Gymnophiona é representada pelas cecílias ou cobras-cegas e são os anfíbios sem membros, possuindo um corpo alongado de formato vermiforme e com grande número de anéis corporais (POUGH, 2007), **figura 1**.

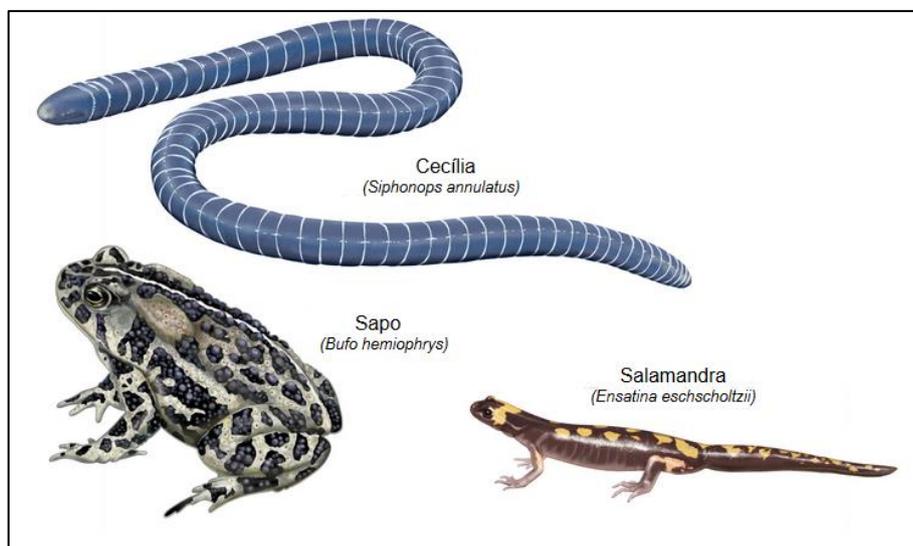


Figura 1. Representantes das ordens dos Anfíbios. Ordem Gymnophiona: Cecília (*Siphonops annulatus*), ordem Anura: Sapo (*Bufo hemiophrys*) e ordem Caudata: Salamandra (*Ensatina eschscholtzii*). (Adaptado de Enciclopédia Britânica, 2012).

A classe Anfíbia apresenta uma riqueza de 8120 espécies (FROST, 2019) e o Brasil é o país com a maior riqueza do mundo (SBH, 2019), abrangendo 1136 espécies (FROST, 2019). Os anuros são o maior grupo dentro dos anfíbios, com aproximadamente 5200 espécies (FROST, 2019). Esses animais estão distribuídos por todos os continentes, exceto na Antártida, como ilustrado na **figura 2** (PIMM,

2014). Dada a grande diversidade de espécies encontradas em praticamente todos os habitats do planeta e modos de vida extremamente diversificados, é quase inegável que os anfíbios constituem um grupo ainda pouco explorado (BOVO, 2015), entretanto, com enorme potencial para estudos em várias áreas da ciência como a Embriologia, Fisiologia e Ecologia.

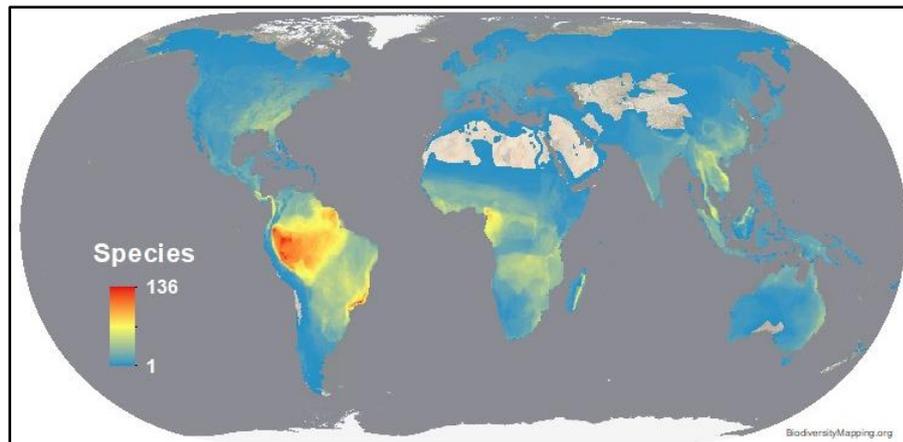


Figura 2. Mapa da riqueza de espécies de anfíbios no mundo. O gradiente de cores indica em uma escala de menor (1) a maior riqueza (136) (Adaptado de PIMM, 2014).

Por ser um grupo diverso, os anfíbios apresentam muitos contrastes ecológicos. Eles incluem algumas das mais bem sucedidas espécies invasoras (HILLMAN et al., 2008), bem como algumas das linhagens mais suscetíveis à distúrbios ambientais comparado a outros animais silvestres (ROWE et al., 2003). Dados publicados nos últimos anos sugerem que os anfíbios são considerados os vertebrados mais ameaçados de extinção, com relatos de declínios populacionais em todo o mundo (STUART et al., 2004; STUART et al., 2008; HOFFMAN et al., 2010). As causas dos declínios são múltiplas, mas os principais fatores são perda e fragmentação de habitat, poluentes, presença de espécies exóticas e mudanças climáticas (NAVAS & OTANI, 2007; LI et al., 2013).

Diversos fatores influenciam a distribuição e a atividade de reprodução/vocalização dos anuros dentro de uma comunidade, em função de sua dependência da água. Nos Neotrópicos, a distribuição de anuros pode estar relacionada a características topográficas, clima e vegetação (DUELLMAN, 1999). A chuva, por exemplo, é um componente fundamental na atividade dos anuros devido a sua dependência da água. A variação sazonal na estrutura da comunidade tem relação direta com a precipitação e o consequente aumento da umidade,

propiciando ambientes de reprodução ideais para certas espécies (ROSSA-FERES & JIM, 1994; JIM, 2002).

Em termos de reprodução, os anfíbios podem ser classificados de acordo com a extensão do seu período reprodutivo. Os reprodutores contínuos possuem o período de reprodução prolongado ao longo do ano com fêmeas grávidas durante a maior parte do ano. Já os reprodutores prolongados apresentam uma reprodução que se prolonga por vários meses, porém sem fêmeas grávidas nos meses de baixas temperaturas - outono e inverno. Temos ainda os reprodutores tipo explosivos, quando a reprodução ocorre somente por alguns dias ao longo do ano (CRUMP, 1974; WELLS, 1977). A fecundação, com algumas raras exceções, é majoritariamente externa na maioria dos anuros (HILLMAN, 2008).

1.1.2 *Boana pulchella*

A espécie *Boana pulchella* (DUMÉRIL & BIBRON, 1841) é um anuro pertencente à família Hylidae (FROST, 2019). Segundo a IUCN, seu estado de conservação é pouco preocupante – LC (do inglês, *Least Concern*) (KWET, 2004), categoria mais baixa de risco de extinção. Comumente conhecida como perereca-do-banhado, esse pequeno animal possui um polimorfismo de coloração (dicromatismo) que pode variar do marrom escuro, podendo apresentar grandes manchas escuras no dorso, até um verde intenso, conforme ilustrado na **figura 3**.



Figura 3. Foto de dois morfos de *B. pulchella* ilustrando o polimorfismo de coloração na espécie. (Foto de KWET & DI-BERNARDO, 1999)

A parte interna das coxas apresenta coloração clara com pontos ou barras roxo-escuras (GARCIA et al., 2003). O saco vocal dos machos é amarelado ou alaranjado, com pequenos pontos mais claros, sendo bastante chamativo quando os indivíduos estão vocalmente ativos. O comprimento rostro-cloacal (CRC) dos

gaúchas (KWET et al., 2004). Nessas áreas de planície, inclusive, é evidenciada a queda de neve (SOUZA, 2002).

Sendo insetívoros quando adultos, a dieta de *B. pulchella* consiste principalmente de aranhas, dípteros e coleópteros (MANEYRO & DA ROSA, 2004). Diferentemente de animais simpátricos, como por exemplo *Dendropsophus nanus*, durante o período frio do ano esses animais continuam a se alimentar em alta velocidade e não dependem de suas reservas de gordura para sustentar energeticamente suas atividades (ANTONIAZZI, 2013). Mudanças sazonais nos parâmetros metabólicos dentro do grupo dos anuros parecem ser comuns, especialmente pelo fato de serem animais ectotérmicos (ex. KISS et al., 2009) e terem sua reprodução dependente dos estoques energéticos armazenados pelo indivíduo (ex. BORAH et al., 2019).

Quanto ao período reprodutivo, sabe-se que os machos de *B. pulchella* emitem vocalização ao longo do ano todo (PELTZER & LAJMANOVICH, 2007) e que as gônadas também são desenvolvidas durante todo esse período (ANTONIAZZI, 2019). Assim, assume-se que essa espécie apresenta reprodução contínua ao longo de todo ano (PELTZER & LAJMANOVICH, 2007), inclusive nos meses frios, fato esse que não é comum já que a maioria das espécies se reproduz na estação quente e chuvosa (HUANG et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2007; LÓPEZ et al., 2011). Devido essa particularidade, essa espécie é um modelo animal interessante nos estudos que envolvem adaptações fisiológicas para, no mesmo período, conseguir suportar o frio e reproduzir-se.

1.2 A vida em ambientes extremos

Os anfíbios colonizaram praticamente todos os ambientes existentes em nosso planeta (PIMM, 2014). Contudo, devido a suas características fisiológicas e comportamentais como ectotermia e complexo ciclo de vida (metamorfose), eles tendem a se concentrar em regiões mais próximas ao Equador (mais de 80% das espécies estão concentradas nessas regiões) que apresentam um clima tropical (DUELLMAN, 1999; WELLS, 2007) com alta umidade e chuvas regulares. No entanto, algumas espécies podem desenvolver adaptações que lhes permitem viver em regiões frias (ex. STOREY, 1984a), em grandes altitudes (ex. HUTCHISON et

al., 1976) e em desertos (ex. VAN BEURDEN, 1980). Sobreviver em ambientes não convencionais, para essas espécies, requer que esses organismos sofram mudanças do ponto de vista bioquímico e fisiológico para lidar com a diminuição dos recursos disponíveis como alimento, acesso à água e oxigênio e com mudanças dos parâmetros ambientais, como temperatura, salinidade e umidade (NGUYEN, 2017).

1.2.1 *Temperatura corporal (T_c) x Temperatura ambiente (T_a)*

Como todos os anfíbios, os anuros possuem uma característica muito marcante em sua fisiologia: são animais ectotérmicos. Os animais ectotérmicos não possuem a capacidade de regular a sua temperatura corporal (T_c) pela produção e retenção de calor metabólico e mantê-la constante como os animais endotérmicos (MOYES & SCHULTE, 2010). Sua temperatura corporal, normalmente, varia de acordo com a temperatura ambiente (T_a). Estes animais de “sangue frio” como popularmente são chamados, usam, portanto, fontes externas de calor e ajustes comportamentais, anatômicos e/ou fisiológicos para sua regulação térmica (WELLS, 2007). Devido a isso, a temperatura ambiental também tem um importante papel na atividade dos anuros, sendo que algumas espécies iniciam sua atividade reprodutiva de acordo com a variação térmica (JIM, 2002; PRADO & POMBAL JR., 2005). Locais que apresentam períodos secos e/ou frios, a reprodução é concentrada no período mais favorável (DUELLMAN & TRUEB, 1994) e os animais utilizam algumas estratégias adaptativas para essas condições desfavoráveis (STOREY & STOREY, 2017).

Devido a ectotermia, suas funções fisiológicas básicas, seu desenvolvimento e seu comportamento são afetados pela temperatura (CAMACHO, 2012). Sabe-se que o tempo de atividade anual dos anfíbios é influenciado em parte pela temperatura ambiental. Para os hilídeos, a fenologia reprodutiva é parcialmente restrita por sua sensibilidade térmica (JOHN-ALDER et al., 1988).

Como a maioria dos processos fisiológicos nestes organismos varia conforme a temperatura corporal, pode-se definir uma curva de desempenho térmico (TPCs, do inglês *thermal performance curves*) para eles (HUEY & STEVENSON, 1979). Esta curva, que demonstra o desempenho relativo em relação a temperatura, inicia-se em uma temperatura mínima crítica (CT_{min}), tem seu pico

em uma temperatura ótima (T_o) e, em temperaturas maiores, o desempenho decai abruptamente até a temperatura máxima crítica (CT_{max}), conforme **figura 5**.

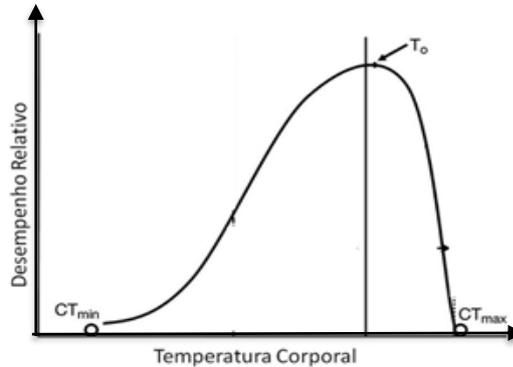


Figura 5. Curva de sensibilidade térmica hipotética, onde T_o representa a Temperatura ótima, CT_{min} a temperatura mínima crítica e CT_{max} a temperatura máxima crítica (Modificado de HUEY & KINGSOLVER, 1989).

Esses limites térmicos críticos determinam a escala de tolerância térmica de um organismo. Portanto, todas as temperaturas acima do CT_{max} ou abaixo do CT_{min} trazem consequências fisiológicas (HILLMAN et. al., 2008) ou mesmo a morte ao organismo.

1.3 Sobrevivendo ao frio

Para habitar ambientes frios até mesmo com possibilidade de neve, os ectotérmicos desenvolveram três estratégias principais: tolerar o congelamento, realizar um super-resfriamento ou buscar refúgios. Buscar refúgio é a estratégia mais fácil e largamente utilizada por esses animais, pois não necessita de grandes alterações fisiológicas e sim de um abrigo, normalmente abaixo do solo, para não ficarem expostos a real temperatura do ambiente. O super-resfriamento, por sua vez, é mais utilizado entre artrópodes terrestres e consiste em não congelar mesmo quando exposto a temperaturas abaixo do ponto de congelamento (P_c) de seus fluidos corporais (o P_c para os animais terrestres é em torno de $-0,5^{\circ}C$) (STOREY & STOREY, 1996). Essa estratégia só é possível devido à produção sazonal de mecanismos anticongelantes que estabilizam o estado líquido e/ou impedem a inoculação por gelo, mantendo o animal em um estado super-resfriado (DUMAN, 2015; STOREY & STOREY, 1988). Por fim, a tolerância ao congelamento possui

vários componentes que a tornam uma estratégia muito eficaz e sempre se refere à formação de gelo em espaços extracelulares.

Nos anfíbios, alguns estudos vêm investigando as estratégias e as adaptações desses animais a esse tipo de ambiente gelado, principalmente pelo fato de não ser comum a existência desses animais em ambientes extremos. Como exemplo, pode-se citar os trabalhos com as pererecas *Dryophytes chrysoscelis* e *Dryophytes versicolor* (IRWIN & LEE, 2003), *Pseudacris crucifer* (CHURCHILL & STOREY, 1996), *Pseudacris triseriata* (JENKINS & SWANSON, 2005) e *Litoria ewingii* (KALINKA, 2011). Esta última encontrada na Nova Zelândia e Austrália e um dos poucos anuros descrito até agora do Hemisfério Sul que consegue sobreviver ao congelamento (KALINKA, 2011). Ainda há poucos estudos com espécies de anfíbios subtropicais que vivem em ambientes com invernos rigorosos, sendo um campo com muitas possibilidades para novas pesquisas.

Assim, os principais trabalhos sobre os anuros e sua estratégia de sobrevivência ao frio são com a espécie *Lithobates sylvaticus* (STOREY & STOREY, 1984a) e devido a isso, essa espécie será a base para o desenvolvimento teórico dos próximos tópicos.

1.3.1 *Lithobates sylvaticus*

Essa espécie de anuro pertencente à família Ranidae e popularmente conhecida como rã da madeira (ou ainda por *Rana sylvatica*) tem uma distribuição sobre uma vasta área da América do Norte, ocorrendo das montanhas Apalaches do sul dos Estados Unidos, entre as florestas decíduas do leste dos Estados Unidos e do Canadá, nas florestas boreais do norte do Canadá e na maior parte do Alasca (LEE et al., 1992), **figura 6A**. Por habitar regiões de frio intenso e permanecer nessas regiões no período de inverno, esses anfíbios são capazes de tolerar o congelamento e sobreviver dias ou semanas com até 65% de sua água corporal total retida em gelo extracelular (STOREY, 1990). A rã-da-madeira passa o inverno congelada entre as folhas no chão da floresta boreal e depois desse período, quando as condições climáticas tornam-se favoráveis, ela retorna à atividade normal, **figura 6B**. No período do inverno, essas rãs conseguem suportar

temperaturas em média de -6°C e, experimentalmente, os indivíduos do Alasca conseguiram tolerar temperaturas de até -16°C (COSTANZO et. al, 2013). Para realizar essa incrível estratégia de sobrevivência, *L. sylvaticus* utiliza múltiplos mecanismos adaptativos desencadeados pelo início da nucleação do gelo corporal como localização da formação extracelular de gelo (KNIGHT & DUMAN, 1986), osmorregulação do volume celular (NEUFELD & LEADER, 1998), estabilização da composição subcelular (CROWE et al., 1987) e tolerância à isquemia (STOREY & STOREY, 2017).

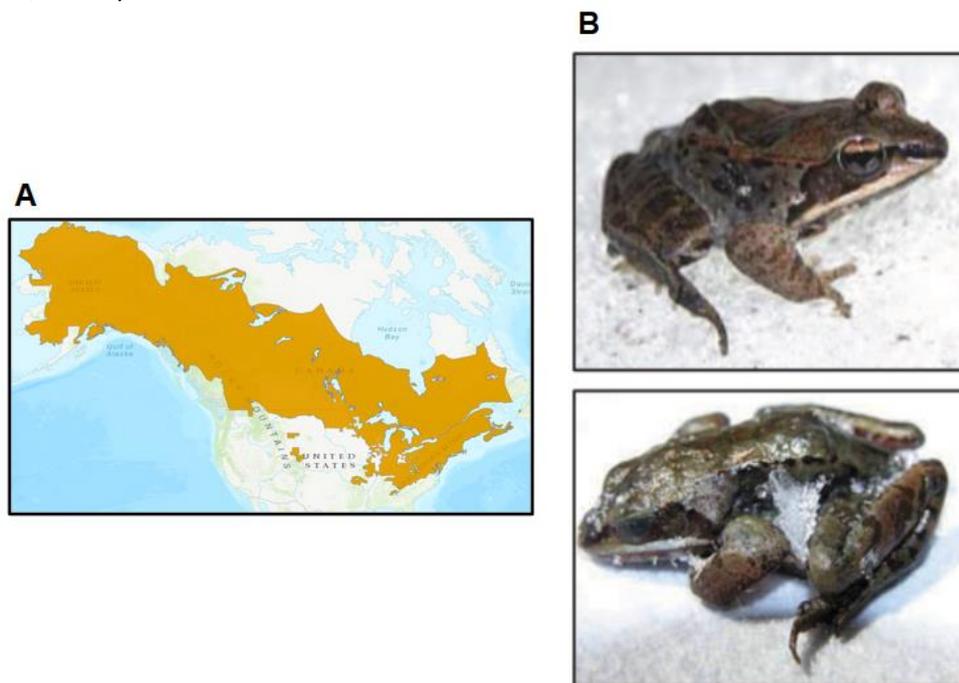


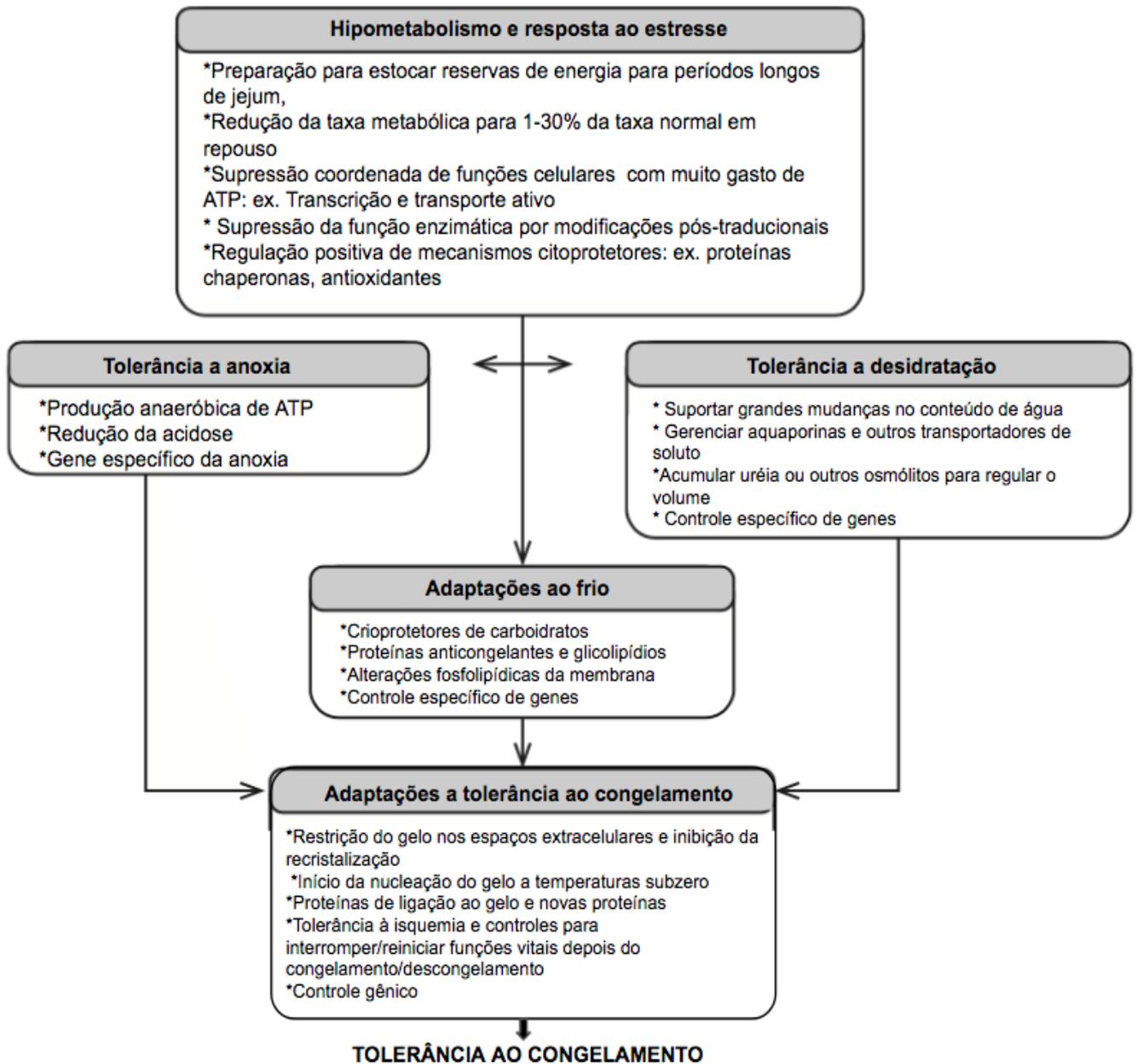
Figura 6. Distribuição de *Lithobates sylvaticus* em laranja (A) (IUCN, 2015). Imagens da rã-da-madeira *Lithobates sylvaticus* (cima) em estado descongelado e (baixo) no estado congelado. (B) (Fotos de J. M. Storey).

1.4A vida no estado congelado

A vida no estado congelado faz cessar os sinais vitais mais básicos que sustentam os organismos. O coração para de bater, a ventilação é interrompida e o sangue deixa de ser bombeado. A maioria das adaptações que ocorrem durante esse período parecem ter sido derivadas (e otimizadas) de outros recursos preexistentes encontrados nos anfíbios. Tolerância à anoxia, tolerância à desidratação e resistência ao frio parecem estar sobrepostas em uma base conservada tanto da resposta ao estresse desses vertebrados quanto aos princípios

comuns de depressão da taxa metabólica (hipometabolismo) (STOREY & STOREY, 2017), conforme ilustrado na **figura 7**.

Figura 7. Resumo das adaptações moleculares que suportam tolerância ao congelamento. Muitas adaptações que suportam a tolerância ao congelamento derivam de outras capacidades preexistentes como o



hipometabolismo, resposta ao estresse, tolerância a anoxia, desidratação e adaptações ao frio (Adaptado de STOREY & STOREY, 2017).

1.5 Estratégias fisiológicas e metabólicas para tolerar/suportar o congelamento em anuros

1.5.1 Os danos do gelo no organismo

É necessário sabermos, primeiramente, quais são os problemas que o gelo causa em organismos não tolerantes ao congelamento para compreendermos as estratégias que foram necessárias para a sobrevivência dos organismos tolerantes ao gelo.

O congelamento intracelular é, aparentemente, letal para todos os organismos devido ao dano físico que o crescimento dos cristais de gelo pode causar na arquitetura subcelular. Além disso, o gelo também pode causar danos físicos em espaços extracelulares, pois a expansão da água quando a mesma cristaliza pode danificar capilares delicados. Esse dano é evidenciado em tentativas criomédicas de congelamento de órgãos: quando descongelado, o órgão perde sua integridade vascular, tornando-se inviável (STOREY & STOREY, 1996).

Além da consequência da estrutura física do gelo, a sua rápida taxa de formação também é prejudicial ao organismo porque causa às células um estresse osmótico. Esse rápido e repentino estresse osmótico não permite que as células realizem possíveis ajustes metabólicos antes que ocorra o dano celular. À medida que o gelo extracelular se forma, concomitantemente, aumenta a osmolaridade dos fluidos extracelulares provocando um efluxo de água das células e uma redução do volume celular. Se o processo de formação de gelo continua, as células continuam a desidratar e encolher, até que a osmolaridade dos fluidos remanescentes atinja um nível em que seu ponto de fusão seja igual a zero nos tecidos provocando um choque osmótico e um colapso do volume celular (STOREY & STOREY, 1996).

O gelo, ainda, interrompe a circulação do sangue cessando completamente a função cardíaca, resultando em uma isquemia associada a depressão metabólica e mudança para o metabolismo anaeróbico (RUBINSKY et. al, 1990; STOREY, 1990). Quando o organismo sofre descongelamento, uma rápida reintrodução do oxigênio pode iniciar uma série de danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (STOREY & STOREY, 2004a).

O congelamento traz muitos estresses para as células e órgãos: hipóxia/anóxia, isquemia, desidratação, desequilíbrios osmóticos/iônicos e danos físicos causados pelo gelo (STOREY & STOREY, 2017). Devido a isso, a tolerância ao congelamento integra um conjunto de ajustes bioquímicos conservados ao longo

da evolução para lidar com o estresse celular que perturbam a homeostase. Nessa resposta ao estresse incluem a atuação de defesas antioxidantes, regulação redox, reparo de danos no DNA e alterações em proteínas/enzimas envolvidas no metabolismo energético central (KULTZ, 2005).

1.5.2 Crioprotetores

Crioprotetores são moléculas encontradas em organismos tolerantes ao congelamento que os protegem contra o frio. Os crioprotetores podem ser de dois tipos: coligativos ou não coligativos (VOELKEL, 2010). Os crioprotetores não coligativos agem protegendo a membrana celular, reduzindo o ponto de congelamento e impedindo a formação dos cristais de gelo (STOREY & SYOREY, 2017). As proteínas responsáveis por isso são conhecidas como proteínas anticongelantes (AFPs, do inglês *antifreeze proteins*) e glicoproteínas anticongelantes (AFGPs, do inglês *antifreeze glycoproteins*) (BANG et. al, 2013).

Os crioprotetores coligativos, por sua vez, requerem concentrações mais altas que os não coligativos para funcionar bem. Eles trabalham acumulando fluidos intra e extracelulares e limitando a quantidade de transferência de água entre eles (STOREY & STOREY, 1996).

Os crioprotetores mais comuns são carboidratos e polióis (álcoois) e eles têm o benefício de não serem tóxicos, altamente solúveis e metabolicamente inertes (VOELKEL, 2010). Os principais crioprotetores coligativos são a glicose, glicerol (IRWEN & LEE, 2003) e, em alguns casos, a ureia (COSTANZO & LEE, 2005). Esses crioprotetores de baixo peso molecular se acumulam em altas concentrações e é uma característica da tolerância ao frio em ectotérmicos, sendo que cada crioprotetor apresenta seu padrão de acumulação. A produção de glicose é diretamente desencadeada pelo início do congelamento, o glicerol pode-se acumular sazonalmente, mas também pode ser responsivo ao congelamento e a síntese de ureia responde principalmente a uma redução no conteúdo de água corporal (desidratação) que geralmente é independente do congelamento (STOREY & STOREY, 2017).

A glicose e o glicerol são os crioprotetores mais evidenciados nos processos

de congelamento, sendo a glicose o principal crioprotetor dos anuros (STOREY, 1990). Quando esses animais são expostos ao congelamento, a glicose é rapidamente produzida pelo fígado, pelo catabolismo de glicogênio, disponibilizada ao sangue em altas concentrações e redistribuída a outros órgãos (STOREY & STOREY, 1988). Essa produção de glicose em resposta ao congelamento é desencadeada pela nucleação de gelo na pele do animal e provém de um sinal β -adrenérgico (STOREY & STOREY, 1996). A quantidade de crioprotetor (glicose ou glicerol) durante o congelamento é limitada, em parte, pela quantidade de glicogênio no fígado (COSTANZO & LEE, 1993), sendo o fígado o órgão-fonte dos crioprotetores devido à capacidade de armazenar grande quantidade de glicogênio e realizar glicogenólise (degradação do glicogênio).

Em *Lithobates sylvaticus*, por exemplo, indivíduos com as maiores reservas de glicogênio hepático apresentaram mais síntese de crioprotetores do que os indivíduos com baixas reservas, evidenciando a importância dessa reserva para o sucesso na tolerância ao congelamento (COSTANZO & LEE, 1993). Esses animais acumulam altas concentrações de glicogênio no corpo durante o período de outono, que antecede o congelamento, para que no inverno essa grande fonte de glicose esteja disponível (ROY & GOSWAMI, 2019). Após o período de congelamento, a glicose remanescente é removida do sangue e a maioria é restaurada em reservas de glicogênio hepático (STOREY & STOREY, 1986).

A glicose é largamente mais utilizada do que o glicerol como principal molécula crioprotetora. O glicerol apresenta a vantagem de originar duas moléculas ativas de apenas uma molécula de glicose-6-fosfato (G6P), ao contrário da glicose que origina apenas uma molécula ativa a partir de uma G6P. O glicerol ainda apresenta pouco ou nenhum efeito sobre macromoléculas, enquanto a glicose pode ocasionar a glicação com outras biomoléculas. Apesar das vantagens, a produção de glicerol e a reconversão de glicerol em glicogênio são mais caras energeticamente e utilizam uma via mais complexa do que a glicose (STOREY & STOREY, 2017), por isso a escolha preferencial é pela glicose.

1.5.3 Alterações enzimáticas

A via de ativação da glicogenólise e a síntese de glicose é curta e simples, independente do ATP (diferente da síntese de glicerol ou ureia) e envolve apenas três enzimas: glicogênio fosforilase (GP), fosfoglicomutase (PGM) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) (AIRES, 2011), sendo GP a enzima responsável pela conversão de glicogênio em glicose-1-fosfato, PGM de glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato e G6Pase finalizando a conversão de glicose-6-fosfato em glicose. Nessa mesma via, a partir de intermediários triose fosfato da glicólise, pode-se sintetizar outro crioprotetor: glicerol. Diiidroxicetona fosfato (DHAP) é convertida em glicerol-3-fosfato (G3P), sendo a enzima chave dessa reação a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) (**Figura 8**) (STOREY, 2004b).

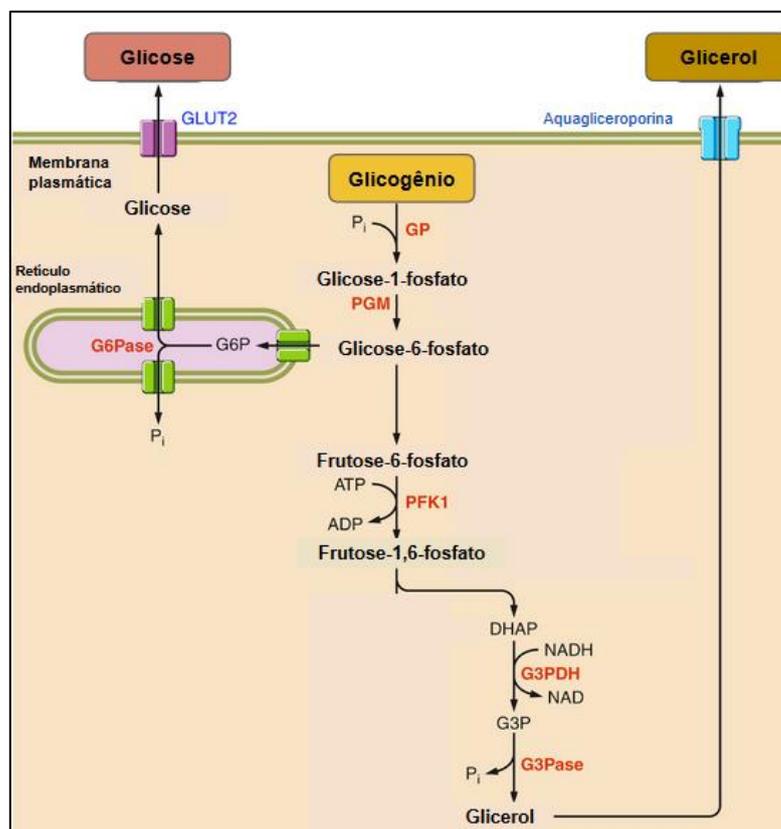


Figura 8. Via de biossíntese da glicose e glicerol. No fígado, a produção de crioprotetores deriva do glicogênio como fonte de carbono. A síntese de glicose é regulada principalmente pelo controle da atividade da glicogênio fosforilase (GP). A glicose-6-fosfato é desviada para o retículo endoplasmático, onde é hidrolisada pela glicose-6-fosfatase (G6Pase) e, em seguida, a glicose é exportada através do transportador GLUT2 bidirecional da membrana plasmática. A síntese de glicerol envolve a conversão de G6P em trioses-fosfato com a ação subsequente do glicerol-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) (Adaptado de STOREY & STOREY, 2017).

Sabe-se que a exposição ao congelamento aumenta as atividades

enzimáticas no fígado (ROY & GOSWAMI, 2019). Em um experimento realizado com *Lithobates sylvaticus*, observou-se que quando expostas ao congelamento, o conteúdo total de fosforilase hepática (glicogênio fosforilase) aumentava 520% e a sua forma ativa, glicogênio fosforilase A, aumentava de 37% para 80% (STOREY & STOREY, 1984b). As enzimas glicogênio fosforilase e glicose-6-fosfatase estão diretamente envolvidas na via glicogenolítica, conseqüentemente, sua hiperatividade aumenta a taxa de glicogenólise, aumentando assim a produção de moléculas de glicose (VOET & VOET, 2011). A glicose produzida durante esse período de frio, entretanto, precisa ser mantida durante todo o congelamento sendo necessário impedir a sua reconversão em glicose-6-fosfato. Portanto, é necessário um controle de duas enzimas-chave dessa reconversão: hexoquinase (HK), na maioria dos órgãos, e a glicoquinase (GK) no fígado. A glicoquinase hepática possui pouca afinidade pela glicose, facilitando a sua exportação do fígado e minimizando um ciclo fútil de glicogenólise e glicogênese. Nos outros órgãos, a hexoquinase possui uma alta afinidade pela glicose o que garante sua captação do plasma e conversão em glicose-6-fosfato no tecido para uso em reações metabólicas ou conversão em glicogênio (STOREY & STOREY, 2017). Devido a isso, a afinidade da hexoquinase pela glicose nos períodos frios nos animais que toleraram o congelamento deve ser reduzida. Estudos com *L. sylvaticus* demonstraram que no músculo esquelético dos animais congelados, eles exibiam uma reduzida afinidade da enzima pela glicose em comparação com as rãs controle (DIENI & STOREY, 2011).

1.5.4 Transportadores de membrana

Para ser liberada do hepatócito ou captada pelos demais tecidos, a glicose necessita de um transportador de membrana. Essa captação de glicose nos vertebrados é mediada por membros de uma grande família de transportadores de glicose - os GLUTs (LONG & CHEESEMAN, 2015). Os membros mais conhecidos dessa família são o GLUT1 e GLUT3 que mediam a captação unidirecional independente de insulina de glicose nas células, GLUT4 que medeia à captação de glicose sensível à insulina nas células e GLUT2, um transportador bidirecional encontrado quase exclusivamente no fígado e intestino (MUECKLER & THORENS,

2013.

Os crioprotetores, como a glicose, necessitam, portanto de transportadores para manter o fluxo celular para fora e dentro das células. O GLUT2, no fígado, apresenta um papel importante como meio exportador de glicose do fígado para os outros tecidos (STOREY & STOREY, 2017). Em *L. sylvaticus*, observou-se uma super expressão dos transportadores de glicose na superfície das células hepáticas nos períodos de frio, aumentando para 8,5 vezes mais a capacidade de transferência de glicose no outono quando comparada a capacidade no verão (CONLON et al., 1998). A natureza bidirecional do GLUT2 do fígado desempenha um papel crucial na recuperação da glicose após o congelamento, quando a mesma é restaurada em glicogênio hepático (STOREY & STOREY, 1986), pois os indivíduos necessitam desse estoque para o próximo evento de congelamento ou para atividades que iniciam na primavera, como a reprodução (STOREY & STOREY, 2017). O GLUT4 também se apresentou aumentado no coração dessas rãs nos estágios iniciais do congelamento, sugerindo sua importância para a rápida captação de glicose nesse tecido (STOREY, 2004a).

Os transportadores de glicerol, por sua vez, estão dentro da família das aquaporinas. As aquaporinas da classe 3 (AQP3), presente em anuros, transportam além de água o glicerol (SUZUKI et al., 2015). Estudos realizados com a rã *Hyla chrysoscelis* que usa glicerol como crioprotetor, mostraram que os níveis de aquagliceroporinas foram 2,3 vezes maiores nos eritrócitos das *H. chrysoscelis* expostas ao frio (4°C) do que nas rãs em um período mais quente (20°C) (MUTYAM et al., 2011).

1.6 Tolerância ao frio em anuros e a viabilidade celular no congelamento

Devido a importância do transplante de órgãos para a saúde pública, é importante realizar pesquisas sobre crioprotetores e maneiras que podemos otimizar e viabilizar, de fato, esse processo. Os processos de fertilização assistida e criopreservação de células germinativas tiveram um enfoque enorme nos últimos anos e diversas técnicas foram aplicadas para melhorar a criopreservação e a viabilidade da criopreservação dessas células (WONG et al., 2014; GOSDEN et al.,

2010; DITTRICH et al., 2006). Porém, quando se tenta congelar tecidos ou órgãos (estruturas bem maiores comparadas com uma única célula), a água entre as células congela causando uma diferença entre a pressão osmótica intra e extracelular, destruindo a estrutura celular e inviabilizando o tecido ou órgão (STOREY & STOREY, 1996), conforme apresentado nos tópicos anteriores desta introdução.

De acordo com o registro científico dos receptores de transplantes (SRTR, do inglês *scientific registry of transplant recipients*), em abril de 2019 havia mais de 12 mil pessoas na lista de espera para o transplante de fígado nos Estados Unidos, com uma média de 11 meses para encontrar e realizar o transplante de fato (SRTR, 2019). Na pesquisa realizada pelo mesmo instituto em 2017, havia mais de 100 mil pacientes na lista de espera para órgãos, sendo que a cada 10 minutos outro paciente entrava nessa fila e a cada dia, dez pessoas morriam esperando pelo transplante.

Atualmente, um coração pode ser preservado por no máximo 4 horas antes de ser reimplantado em um receptor (VASCONCELOS, 2000). Se os órgãos pudessem ser preservados por mais tempo, mais tempo estaria disponível para encontrar um receptor para esse órgão, levando a melhores taxas de sucesso do transplante. Como os anfíbios exibem características fisiológicas em comum com todos os vertebrados, incluindo mamíferos (BURGGREN & WARBURTON, 2007) e algumas espécies na natureza conseguem tolerar o congelamento (STOREY 1984a) e tornar viável essa estratégia, torna-se essencial os estudos relacionados a esse tema para uma possível aplicabilidade na criopreservação e prolongamento da vida útil dos órgãos para transplantes em humanos.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

A espécie *Boana pulchella*, existente no sul da América do Sul, desenvolveu alterações fisiológicas para manter-se ativa durante o período mais frio do ano: o inverno. Essas alterações incluem o acúmulo de crioprotetores (glicose, glicerol, lactato, ureia) durante o inverno, manejo do metabolismo energético entre as

estações do ano bem como alterações sazonais nos estoques desses substratos ao longo do ano.

2.2 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi avaliar os padrões fisiológicos e mudanças sazonais da perereca sul-americana, *Boana pulchella*, para tolerar o frio, identificando as possíveis vias metabólicas que estariam modificadas sazonalmente e fornecer dados para o entendimento da biologia desses animais.

2.3 Objetivos específicos

Realizar experimentos com *B. pulchella* coletados em diferentes estações do ano para:

- I. Determinar os parâmetros morfométricos teciduais (fígado).
- II. Determinar os níveis plasmáticos de glicose, glicerol, lactato e ureia.
- III. Determinar a concentração de glicogênio hepático e muscular.
- IV. Determinar a concentração de glicerol, lactato, triglicerídeos e ureia no tecido hepático.
- V. Avaliar a oxidação de glicose e síntese de glicogênio no tecido hepático e muscular.
- VI. Determinar a concentração de lactato muscular.
- VII. Determinar a concentração de triglicerídeos no tecido adiposo.
- VIII. Realizar, também, um teste de manutenção de *B. pulchella* em cativeiro para viabilizar essa técnica para estudos futuros, visando testes experimentais com esses animais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizadas 33 pererecas-do-banhado (*Boana pulchella*), machos (identificados pela presença de saco vocal), adultos, provenientes de três locais de coleta descritos em 3.1.2. Dos 33 animais, doze foram coletados no período de inverno, cinco durante a primavera, dez durante o verão e seis durante

o período do outono. O turno de coleta para esses animais foi sempre noturno, com tempo de busca entre 4 a 6 horas (19 horas até, aproximadamente, 00 hora). Depois de coletados, os animais foram acondicionados em sacos de coleta atóxicos, inflados com ar e com substratos do ambiente (terra ou folhiços úmidos), e os sacos colocados em uma caixa térmica grande e escura até a chegada dos mesmos no laboratório. Além dos animais coletados para a análise sazonal, quatro foram coletados no inverno (n=2) e na primavera (n=2) e mantidos em cativeiro para teste de viabilidade de manutenção dos mesmos. Esse teste de manutenção está descrito no **apêndice A** desta dissertação. A licença para as atividades de coleta com finalidade científica está autorizada sob o **número 63115-1** registrada no sistema de autorização e informação em biodiversidade - SISBIO.

3.1.1 Locais de coleta dos animais

Os animais foram coletados em três diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Osório, São Francisco de Paula e Eldorado do Sul. Os animais do período de inverno (n=12) foram coletados em dois locais distintos, sendo que dos doze animais, cinco foram em Osório (29°51'15.4"S 50°13'47.7"W) e sete foram em São Francisco de Paula (29°23'28.3"S 50°23'10.9"W), próximos da Floresta Nacional de São Francisco de Paula - FLONA). No período da primavera (n=5) e do verão (n=10), todos os animais foram provenientes de São Francisco de Paula, no mesmo ponto da coleta de inverno (29°23'28.3"S 50°23'10.9"W). Já no outono, os animais foram coletados em um terceiro ponto localizado na cidade de Eldorado do Sul, dentro da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - EEA/UFRGS (30°06'02.9"S 51°40'35.0"W), **figura 9**.

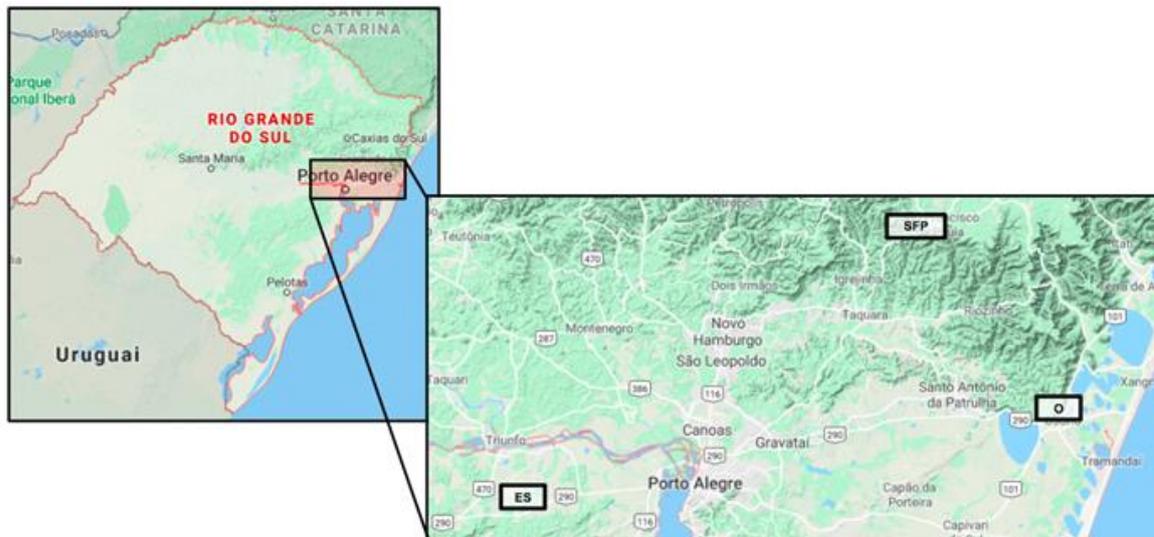


Figura 9. Mapa com os três locais onde ocorreu a coleta dos animais desse estudo: Eldorado do Sul (ES), São Francisco de Paula (SFP) e Osório (O).

3.1.2 *Método de coleta em campo dos animais*

O método de coleta para anuros utilizado neste trabalho foi o de busca ativa auditiva, a pé, com auxílio de lanternas. Esse método baseia-se em permanecer por um período no sítio pré-determinado de ocorrência da espécie de interesse e, a partir da vocalização do anuro (canto), iniciar a busca para capturá-lo. Essa busca, após a percepção do canto, deve ser minuciosa e depende da prática do coletor. Quando o animal é avistado, a captura do mesmo é feita por uma aproximação e um movimento rápido com a mão para agarrar o animal, segurando-o firme, mas sem apertá-lo. Depois de coletado, ele é imediatamente transferido para o saco de coleta. Esse tipo de metodologia de coleta é mais seletiva para os indivíduos machos, visto que eles apresentam, diferentemente dos indivíduos fêmeas, saco vocal e capacidade de vocalização.

3.1.3 *Condições meteorológicas de coleta*

Ao final da expedição a campo, já com os indivíduos coletados, foi mensurada a temperatura do ambiente e a umidade relativa do ar com a estação meteorológica portátil da marca Kestrel®, modelo 3500 Delta T. A condição climática relacionada à precipitação também foi registrada na hora da coleta. O fotoperíodo, por sua vez, foi registrado como a média para cada estação e para o paralelo 30° ao sul segundo VAREJÃO-SILVA (2006).

3.2 Transporte dos animais e chegada ao local dos experimentos

Na manhã seguinte a coleta, os animais foram levados até o Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os animais coletados passaram pelo mesmo processo de coleta (como descrito em 3.1.2) e transporte até o laboratório na tentativa de obter uma 'padronização do estresse'. O tempo entre a coleta em campo e a eutanásia dos animais não passaram de 15 horas para todos os indivíduos utilizados neste estudo. Assim, podemos fazer uma comparação entre os grupos sem que o fator estresse possa ter uma influência significativa nesses dados, pois esse fator foi o mesmo entre eles.

Até o início dos procedimentos, cada animal foi mantido dentro do seu saco de coleta em um ambiente escuro e silencioso.

3.3 Local e realização dos experimentos

As técnicas apresentadas a seguir foram realizadas no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os procedimentos experimentais laboratoriais deste estudo seguem as normas da Lei Arouca (Lei n. 11.794, 2008) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UFRGS e está registrado no sistema desta universidade sob o **número 35562**.

3.4 Peso e comprimento dos animais

Logo que esses animais chegaram ao laboratório, o animal era retirado do saco de coleta e iniciado o processo de pesagem e medida do comprimento rostro-cloacal de cada indivíduo. Para a pesagem, o animal era acondicionado em um pote com tampa e colocado na balança analítica BEL®, modelo Mark M214A. Os resultados foram expressos em gramas (g). Após a pesagem, foi realizada a medida

do comprimento de cada indivíduo com um paquímetro. No grupo dos anuros, o comprimento é medido do seu rostro até sua cloaca - comprimento rostro-cloacal ou CRC. Esses resultados foram expressos em centímetros (cm). Após realizada a pesagem e medição, os animais foram eutanasiados com anestésico lidocaína (gel, 5%) de forma tópica, aplicada por pincelamento no interior da boca, na barriga e região inguinal, método de eutanásia recomendado para anfíbios conforme publicado na diretriz de prática de eutanásia do CONCEA - Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal em 2015 (CONCEA, 2015)

3.5 Coleta de sangue e processamento dos tecidos

Assim que confirmada a eutanásia, foi realizada a coleta de sangue do animal. O método de coleta sanguínea adotado foi o de punção cardíaca. Para esse método de coleta, utilizou-se seringas heparinizadas de 1 mL (mililitro). O sangue das pererecas utilizadas para análise sazonal foi coletado para a realização de dosagens séricas de glicose, glicerol e lactato.

Após o procedimento de coleta sanguínea, realizou-se a dissecação e coleta dos tecidos. Para realização da análise sazonal, o fígado, músculo das patas traseiras e tecido adiposo foram coletados para morfometria e realização de análises metabólicas e bioquímicas, conforme descritas na **figura 10**.

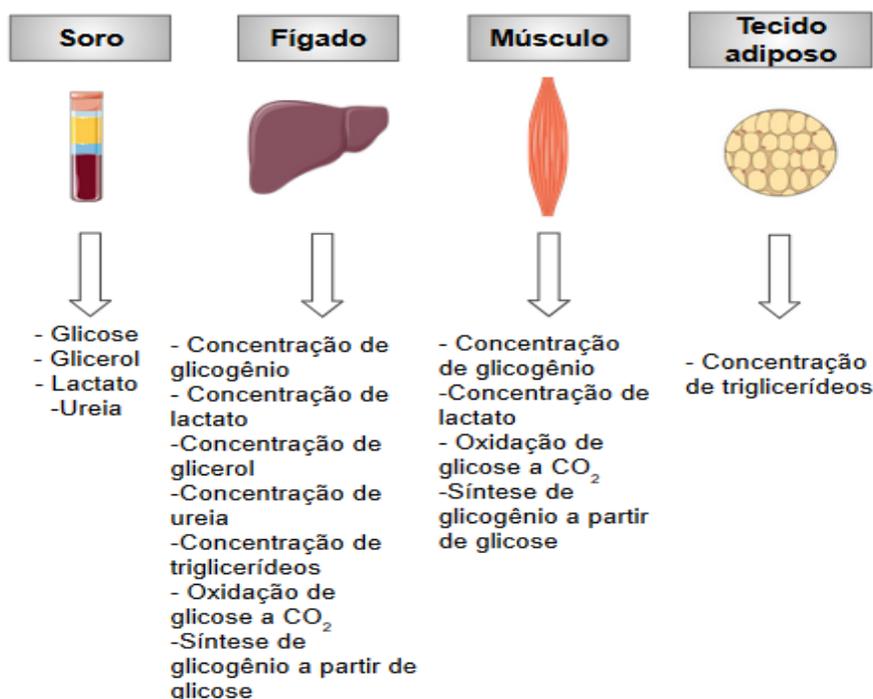


Figura 10. Dosagens metabólicas e bioquímicas realizados durante os experimentos.

3.6 Descrição das técnicas realizadas

3.6.1 Morfometria e relação tecido/peso corporal total

O fígado foi retirado, seco em papel filtro e pesado. A relação entre o peso do tecido e o peso corporal total (PCT) foi utilizada para a comparação entre as estações do ano. A massa do tecido hepático está representada como índice F (fígado/PCT).

3.6.2 Dosagens séricas

O sangue coletado pelo método descrito no item 3.4 foi armazenado em tubos de Eppendorf® de 0,2 mL. Em seguida, foi realizada a centrifugação para separação do conteúdo sorológico dos elementos figurados do sangue. Para esse procedimento, utilizou-se a Centrífuga Eppendorf® modelo 5415C a 5000 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos. Após a primeira centrifugação, retirou-se o sobrenadante (soro) e transferiu-o para novos Eppendorf® de 0,2 mL e realizou-se uma segunda centrifugação a 5000 rpm mas agora por 5 minutos. Através dessa técnica obtém-se entre 15 e 20 µL de soro.

O perfil bioquímico dos animais foi então avaliado através da análise das concentrações séricas de glicose, lactato e ureia. Estes parâmetros foram determinados utilizando kits enzimáticos comerciais (LABTEST Diagnóstica®, Brasil), e a leitura espectrofotométrica (comprimento de onda em nanômetros - glicose: 505 nm, lactato: 550 nm e ureia: 600 nm) foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK).

A análise das concentrações séricas de glicerol foi realizada através do kit enzimático comercial (Enzytec™ Fluid Glycerol - R-Biopharm AG, Alemanha) e a leitura espectrofotométrica Ultravioleta-UV (comprimento de onda 340 nm) foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). As concentrações séricas foram expressas em mmol por litro de sangue (mmol/L).

3.6.3 Determinação da concentração de glicogênio no fígado e no músculo

Para determinar a concentração de glicogênio hepático e muscular, as amostras dos tecidos foram colocadas em tubos de plástico contendo 1 mL de KOH 30% e fervidas em banho de água quente a 100°C durante 60 minutos. Após a

fervura, foram adicionados aos tubos 1 mL de etanol 96°G e 50 µL de Na₂SO₄ 35% para a precipitação do glicogênio. As amostras foram centrifugadas a 1510 xg por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de água destilada. Para a hidrólise do glicogênio, foi acrescentado aos tubos 300 µL de HCl 4N e as amostras foram fervidas novamente em banho de água quente a 100°C durante 60 minutos. Após foi acrescentado aos tubos 300 µL de Na₂CO₃ 2M para restabelecer o pH. A concentração de glicose das amostras foi determinada através de kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica, Brasil). A quantidade de glicogênio no fígado está expressa em mg de glicogênio por grama de tecido (mg/g) (VAN HANDEL, 1965).

3.6.4 Oxidação de glicose (produção de ¹⁴CO₂) no fígado e músculo

Para determinação da quantidade de [U-¹⁴C]-glicose convertida a ¹⁴CO₂ amostras frescas de tecido hepático e muscular foram fatiadas e colocadas em frascos de vidro fechados com tampas de borracha contendo 1 mL de KREBS (Krebs-Ringer-Buffer: NaCl 114 mM, KCl 2,25 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, Na₂HPO₄ 0,33 mM, MgSO₄ 1 mM, NaHCO₃ 13 mM, Hepes 10 mM, albumina 0,1%, PMSF 100 mM, coquetel inibidor de protease - Sigma-Aldrich® 0,1%; pH 7,63), 0,1 µCi [U-¹⁴C] glicose 55 mCi/mmol (Amersham, USA) e solução de glicose 5 mM. Os frascos foram aerados com carbogênio (5% de CO₂ e 95% de O₂) por 20 segundos e lacrados com tampa de borracha e parafilme. Após aeração, os frascos foram incubados em um agitador metabólico (60 ciclos por minuto) a 25°C por 60 minutos. A reação ocorreu em pequenos poços dentro dos frascos de vidro contendo tiras de papel Whatman de 3 mm colocados acima do nível do meio de incubação. Após a incubação, a reação de oxidação foi interrompida com a injeção de 0,25 mL de solução ácido tricloroacético (TCA) a 50% (v/v) no meio de incubação e 0,25mL de solução NaOH 2N diretamente nos poços através das tampas de borracha dos frascos. Os frascos foram mantidos durante 24 horas a temperatura ambiente a fim de capturar o ¹⁴CO₂ formado. Após esse período, as tiras de papel foram retiradas dos poços e transferidas para flaconetes contendo 2,5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi mensurada utilizando um contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A quantidade de ¹⁴CO₂ produzido foi expressa em nmol de ¹⁴C de glicose incorporada ao CO₂ por grama de tecido, por

hora (MERSMANN & HU, 1987; TORRES et al., 2001). Esse parâmetro não foi determinado para as amostras de inverno devido à indisponibilidade dos reagentes no momento da coleta dos tecidos dos animais.

3.6.5 Síntese de glicogênio a partir de glicose no fígado e no músculo

As amostras de fígado e músculo que passaram pelo protocolo de oxidação descrito em 3.7.4 foram transferidas para tubos de vidro contendo 1 mL de KOH 30% e fervidas em banho de água quente a 100°C durante 60 minutos. Após a fervura, foram adicionados aos tubos 1 mL de etanol 96°G e 50 µL de Na₂SO₄ 35% para a precipitação do glicogênio. As amostras foram centrifugadas a 1510 xg por 10 minutos, tendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 0,2 mL de água destilada. Essa solução foi transferida para outros frascos contendo 2,5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi mensurada utilizando um contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A quantidade de glicogênio produzido a partir de glicose foi expressa em nmol ou µmol de ¹⁴C de glicose incorporada a glicogênio por grama de tecido por hora (WRENDENBERG et al., 2006).

3.6.6 Determinação da concentração de glicerol no tecido hepático

Para a determinação da concentração de glicerol no tecido hepático, amostras do tecido foram homogeneizadas em 400 µL (microlitros) de PBS 1x (NaCl 136,9 mM; KCl 2,7 mM; NaH₂PO₄ 8,1 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,4).

Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas em centrífuga a 4°C, 20.000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e utilizado para a determinação da concentração deste substrato. Para determinar a concentração de glicerol, utilizou-se o kit enzimático comercial (Enzytec™ Fluid Glycerol-R-Biopharm AG, Alemanha) e a leitura espectrofotométrica Ultravioleta-UV (comprimento de onda 340 nm) foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). A quantidade de glicerol no fígado está expressa em miligrama de glicerol por grama de tecido (mg/g).

3.6.7 Determinação da concentração de ureia no tecido hepático

Para a determinação da concentração de ureia no tecido hepático, amostras do tecido foram homogeneizadas em 400 uL de PBS 1x (NaCl 136,9 mM; KCl 2,7 mM; NaH₂PO₄ 8,1 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,4).

Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas em centrífuga a 4°C, 20.000xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e utilizado para a determinação da concentração deste substrato. Para a dosagem, foi utilizado o kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica, Brasil). A leitura espectrofotométrica (comprimento de onda: 600 nm) foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). A quantidade de ureia no fígado está expressa em miligrama de ureia por grama de tecido (mg/g).

3.6.8 Determinação da concentração de lactato hepático

Para a determinação da concentração de lactato no tecido hepático, amostras do tecido foram homogeneizadas em 400 uL de PBS 1x (NaCl 136,9 mM; KCl 2,7 mM; NaH₂PO₄ 8,1 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,4) em tubos contaminados com NaF 0,1 mM. Após homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas em centrífuga a 4°C, 2.500 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo. Esse sobrenadante, então, foi utilizado para a determinação da concentração de lactato muscular através do kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica®, Brasil) e a leitura espectrofotométrica (comprimento de onda: 550 nm) realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). A concentração de lactato no fígado está expressa em miligrama de lactato por grama de tecido (mg/g).

3.7.9 Determinação da concentração de lactato muscular

Para a determinação da concentração de lactato no tecido muscular, amostras do tecido foram homogeneizadas em 1 mL de salina 0,9% em tubos contaminados com NaF 0,1 mM. Após homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas em centrífuga a 4 °C, 2.500 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante é retirado e colocado em um novo tubo. Esse sobrenadante, então, é utilizado para a determinação da concentração de lactato muscular através do kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica®, Brasil) e a leitura

espectrofotométrica (comprimento de onda: 550 nm) realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). A concentração de lactato no tecido está expressa em miligrama de lactato por grama de tecido (mg/g).

3.6.10 Determinação da concentração de triglicerídeos no tecido hepático

Para a determinação da concentração de triglicerídeos no tecido hepático, amostras do tecido foram homogeneizadas em 400 uL de PBS 1x (NaCl 136,9 mM; KCl 2,7 mM; NaH₂PO₄ 8,1 KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,4). Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas em centrífuga a 4°C, 20.000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo e utilizado para a determinação da concentração deste substrato. Para a dosagem, foi utilizado o kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica, Brasil). A leitura espectrofotométrica (comprimento de onda: 505 nm) foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). A quantidade de triglicerídeos no fígado está expressa em miligrama de triglicerídeos por 100 gramas de tecido (mg%)

3.6.11 Determinação da concentração de triglicerídeos no tecido adiposo subcutâneo

Para a determinação da concentração de triglicerídeos no tecido adiposo, amostras do tecido foram homogeneizadas em salina 0,9% na proporção 1:10 e a concentração deste substrato foi dosada através de kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica, Brasil). A leitura espectrofotométrica (comprimento de onda: 505 nm) foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). A quantidade de triglicerídeos no tecido adiposo está expressa em miligrama de triglicerídeos por 100 gramas de tecido (mg%).

3.7 Análise estatística

Os *outliers* (valor atípico) foram identificados e excluídos através do método de ROUT, com o Q determinado como 1%. (MOTULSKY e BROWN, 2016). A avaliação da distribuição normal (gaussiana) foi realizada pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov.

Para variáveis paramétricas (distribuição normal), os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (EPM) e as diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Quando as variáveis foram não paramétricas (sem distribuição normal), os resultados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IIQ) 25/75, sendo aplicado o teste de Kruskal Wallis (KW) seguido de pós-teste de Dunn.

Em todas as análises deste estudo foi utilizado o programa GraphPad Prism® versão 6.01 e estabelecido a significância de 0,05 e o poder estatístico de 95%.

3.8 Descarte de resíduos

Os materiais e insumos utilizados foram reduzidos ao máximo para que não houvesse excesso de resíduos para descarte. Os resíduos encaminhados para o descarte seguiram a Lei 12.305 de 2010 que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS). Todos os resíduos biológicos gerados no experimento foram descartados em sacos de lixo brancos específicos para esse tipo de material e, posteriormente, encaminhados para recipientes próprios de acordo com as normas vigentes de biossegurança da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde. Os resíduos químicos não tóxicos foram descartados no sistema de esgoto comum enquanto os tóxicos foram separados em embalagem e encaminhados para o Centro de Tratamento de Gestão de Resíduos Químicos da UFRGS. Os resíduos radioativos, por sua vez, foram descartados conforme a norma para gerência de rejeitos radioativos de baixos e médios níveis de radiação (Resolução CNEN 167). Já as seringas descartáveis e agulhas lancetas com material biológico foram acondicionadas em recipientes de paredes rígidas para posterior coleta e tratamento adequado.

4. RESULTADOS

4.1 Condições meteorológicas e climáticas de coleta

Durante as coletas, observou-se que a maior temperatura foi registrada no outono (17°C) e as menores no inverno. A umidade relativa do ar se manteve praticamente constante em todas as estações do ano. A condição climática durante

as coletas variou de uma precipitação leve no inverno e primavera a céu claro no verão e outono. Quanto ao fotoperíodo, este varia de acordo com a posição do paralelo 30° em relação ao sol, com maior fotoperíodo no verão e menor no inverno. Os resultados dos parâmetros metabólicos dos animais coletados durante o inverno em São Francisco de Paula (SFP) e em Osório (O) foram comparados entre si e não houve diferença estatística significativa entre eles bem como a temperatura foi similar entre as duas regiões, variando apenas 1,6 °C. Portanto, assumimos que a diferença de localidade não interfere nos parâmetros que aqui obtivemos e comparamos resultados de acordo com a estação do ano e não localidade (**Tabela 1**).

Tabela 1. Parâmetros climáticos e meteorológicos entre as estações do ano.

Parâmetros	Grupos			
	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO	OUTONO
Temperatura (graus celsius)	10°C (O) 11,6°C (SFP)	13,9°C	15,5°C	17°C
Umidade relativa do ar (%)	97	92	95	98
Condição climática	Precipitação leve	Precipitação leve	Céu claro	Céu claro
Fotoperíodo (Claro/Escuro em horas)	10/14	12/12	14/10	12/12

Município de Osório indicado pela letra 'O' e São Francisco de Paula pela sigla 'SFP'

4.2 Morfometria e relação tecido/peso corporal total

A relação entre o PCT e o peso do tecido está indicada como índice F para o fígado. Esse índice serve para indicar as variações nas massas de tecido nas diferentes estações do ano.

O PCT foi significativamente diferente entre o inverno e a primavera, sendo maior no período de inverno (3,45 g) e menor na primavera (2,64 g). Entre as outras estações, não houve diferenças significativas e a média dos pesos permaneceu a mesma.

Quanto ao comprimento rostro-cloacal (CRC), houve diferença significativa entre a primavera e o verão, com o maior comprimento no verão. O menor comprimento foi registrado na primavera (3,6 cm).

O índice F, isto é, a relação da massa do fígado com o PCT do animal, não apresentou diferença significativa ao longo das estações (**Tabela 2**).

Tabela 2. Variação dos parâmetros morfométricos entre as estações do ano.

Parâmetros	Grupos				ANOVA
	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO	OUTONO	
PCT (g)	3,45 (3,24/5,24) ^a	2,64 (2,57/2,99) ^b	3,32 (2,87/3,641) ^{a,b}	3,04 (2,48/3,55) ^{a,b}	P<0,05
CRC (cm)	3,85 (3,7/4,37) ^{a,b}	3,6 (3,475/3,8) ^a	4,0 (4,0/4,150) ^b	3,87 (3,738/4,1) ^{a,b}	P<0,05
Índice F (mg/g)	2,62 (2,39/3,075)	2,486 (1,95/2,95)	2,69 (2,38/3,12)	2,22 (1,376/3,17)	NS

Os resultados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para dados não paramétricos. Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Os grupos com diferença significativa estão indicados por letras diferentes. NS: Não significativo. N=12 no inverno, n=5 na primavera, n=10 no verão e n=6 no outono. PCT: Peso corporal total. CRC: Comprimento rostro-cloacal. Índice F: Peso do fígado/PCT*100.

4.3 Parâmetros séricos

A concentração de glicose plasmática apresentou variação entre as estações, observando-se uma transição de outono para inverno com um aumento da concentração de glicose plasmática. Esse substrato foi significativamente diferente entre o inverno e outono, bem como entre as estações primavera e outono. O outono apresentou a menor média de concentração de glicose plasmática e a primavera a maior entre as estações do ano.

Quanto ao glicerol, a concentração do conteúdo plasmático do mesmo apresentou variação entre duas estações do ano. Foi significativamente diferente a concentração entre a estação mais fria, inverno, e a mais quente, verão.

Quando analisada a concentração de lactato no plasma, não se observou diferença significativa entre nenhuma estação ao longo do ano (**Tabela 3**).

Tabela 3. Variações sobre os parâmetros séricos dos animais entre as estações do ano.

Parâmetros	Grupos				ANOVA
	INVERNO	PRIMAVERA	VERÃO	OUTONO	
Glicose (mmol/L)	10,39 ± 1,56 ^a	12,64 ± 1,31 ^a	10,16 ± 1,51 ^{a,b}	4,087 ± 0,30 ^b	P<0,05
Glicerol (mmol/L)	0,32 ± 0,03 ^a	0,619 ± 0,13 ^{a,b}	0,618 ± 0,09 ^b	0,53 ± 0,14 ^{a,b}	P<0,05
Lactato (mmol/L)	4,14 ± 1,61	4,94 ± 1,35	4,12 ± 1,97	4,99 ± 1,95	NS
Ureia (mmol/L)	x	18,39 (12,66/36,97)	20,15 (16,68/38,77)	27,64 (22,44/42,63)	NS

Os dados de glicose, glicerol e lactato foram avaliados pela ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Os valores estão representados como média ± EPM. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Os dados de Ureia foram avaliados pelo teste para dados não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn e apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). As diferenças foram

consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Os grupos com diferença significativa estão indicados por letras diferentes. NS: Não significativo. Glicose e lactato $n=12$ no inverno, $n=5$ na primavera, $n=10$ no verão e $n=6$ no outono. Glicerol: $n=12$ no inverno, $n=5$ na primavera, $n=10$ no verão e $n=5$ no outono. Ureia: $n=4$ na primavera, $n=4$ no verão e $n=5$ no outono.

4.4 Metabolismo no tecido hepático

4.4.1 Glicogênio

A determinação da concentração do glicogênio hepático indicou que não houve variação significativa entre as diferentes estações. A menor média de concentração entre as estações foi de 2,65 mg/g encontrada no verão que é aproximadamente 25% menor quando comparado as outras estações (**Figura 11**).

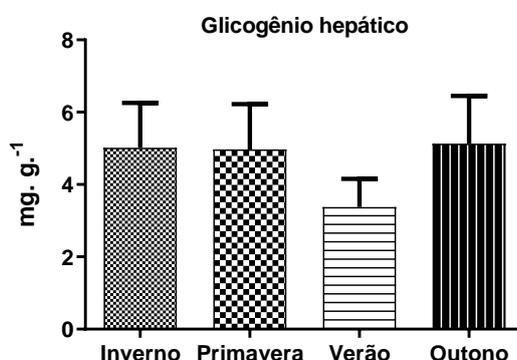


Figura 11. Concentração de glicogênio no fígado (mg/g). Os dados são apresentados como média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre as estações quando realizado o teste da ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Inverno $n=12$, primavera $n=5$, verão $n=10$ e outono $n=6$.

4.4.2 Glicerol

A concentração de glicerol no tecido hepático não apresentou diferença significativa entre as diferentes estações (**Figura 12**). A estação que obteve a maior concentração foi o outono (4,26 mg/g).

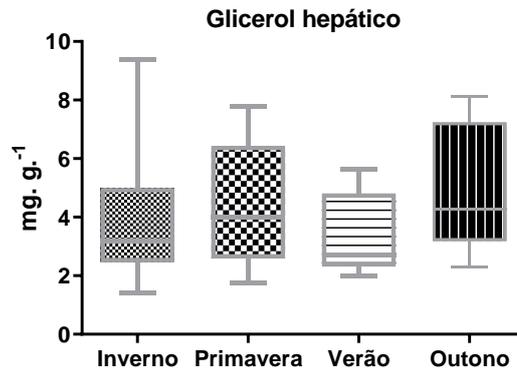


Figura 12. Concentração de glicerol no fígado (mg/g). Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). Não houve diferença significativa entre as estações quando realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn ($P \leq 0.05$). Inverno $n=11$, primavera $n=5$, verão $n=10$ e outono $n=5$.

4.4.3 Lactato

A concentração de lactato no tecido hepático não foi estatisticamente diferente entre as estações do ano (**Figura 13**). Apesar de encontrarmos na primavera um aumento de aproximadamente 45% nos valores de lactato comparado ao verão.

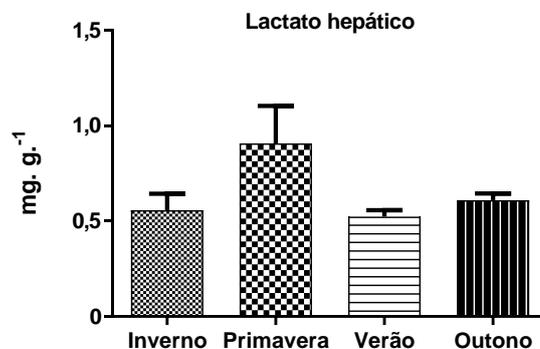


Figura 13. Concentração de lactato no fígado (mg/g). Os dados são apresentados como média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre as estações quando realizado o teste da ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey ($P \leq 0.05$). Inverno $n=9$, primavera $n=5$, verão $n=8$ e outono $n=5$.

4.4.4 Triglicerídeos

A primavera e verão apresentaram os menores valores de triglicerídeos entre as estações ainda que esse parâmetro não tenha apresentado diferença significativa (**Figura 14**).

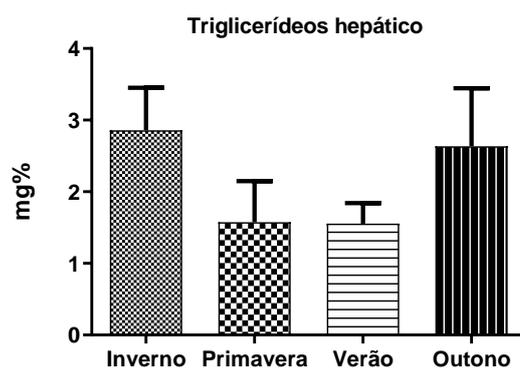


Figura 14. Concentração de triglicerídeos no fígado (mg%). Os dados são apresentados como média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre as estações quando realizado o teste da ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey ($P \leq 0.05$). Inverno $n=11$, primavera $n=5$, verão $n=9$ e outono $n=5$.

4.4.5 Ureia

A concentração de ureia no tecido hepático não apresentou diferença estatística entre as estações, apesar de o inverno apresentar uma concentração aproximadamente 1,5x menor comparada à primavera e ao outono (**Figura 15**).

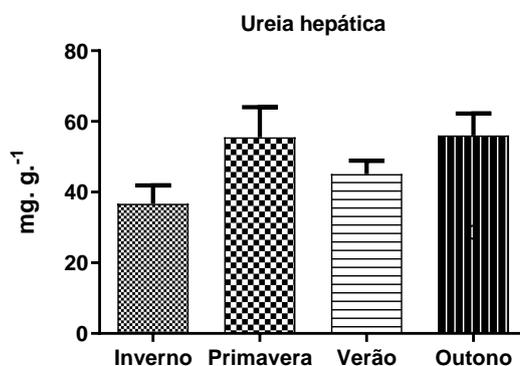


Figura 15. Concentração de ureia no fígado (mg/g). Os dados são apresentados como média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre as estações quando realizado o teste da ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey ($P \leq 0.05$). Inverno $n=9$, primavera $n=5$, verão $n=10$ e outono $n=5$.

4.4.6 Oxidação de glicose a CO₂

Nesse experimento, foram utilizados somente animais das estações: primavera, verão e outono. Essa técnica é realizada com o tecido fresco e no momento da coleta de inverno os reagentes não estavam disponíveis, portanto, esse parâmetro não pôde ser determinado nas amostras de tecidos dos animais de

inverno. A análise estatística indicou uma diferença de CO₂ formado pela oxidação de glicose entre a primavera e verão, indicando um aumento na formação de CO₂ da primavera para o verão, com a primavera apresentando o menor valor entre as estações (**Figura 16**).

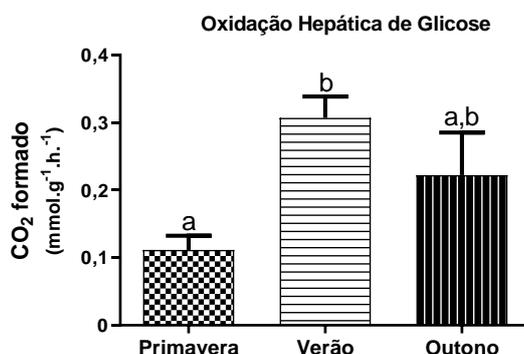


Figura 16. Oxidação de glicose a CO₂ no fígado (mmol/g/h). Os dados são apresentados como média ± EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas quando aplicado o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey (P≤0,05). Primavera n=5, verão n=10 e outono n=6.

4.4.7 Síntese de glicogênio a partir de glicose

Quanto à conversão hepática de glicose em glicogênio (**figura 17**), não foi observada diferenças significativas desse parâmetro entre as estações. Nesse experimento, foram utilizados somente animais das estações: primavera, verão e outono. Essa técnica foi realizada com o tecido fresco utilizado na técnica descrita de oxidação de glicose a CO₂ e, devido a isso, esse parâmetro não pôde ser determinado nas amostras de tecidos dos animais de inverno.

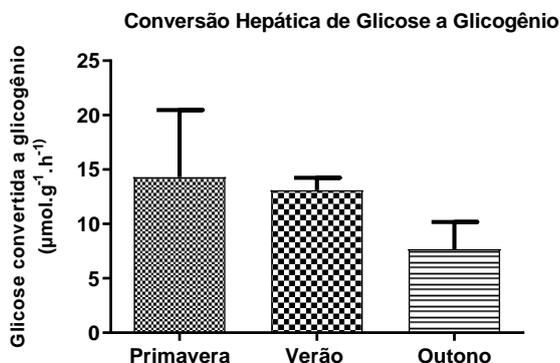


Figura 17. Conversão de glicose a glicogênio no fígado (µmol/g/h). Os dados são apresentados como média ± EPM. Não houve diferença significativa entre as estações quando realizado o teste da ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey (P≤0,05). Primavera n=5, verão n=10 e outono n=6.

4.5 Metabolismo no tecido muscular

4.5.1 Glicogênio e lactato

O outono apresentou valores significativamente maiores de glicogênio no músculo quando comparado à primavera e ao verão, onde se observou os menores valores de glicogênio muscular (**Figura 18A**). Deve haver, portanto, um aumento do glicogênio muscular na transição do verão para outono. Quanto a concentração de lactato muscular, houve diferença significativa na concentração entre inverno e verão, com valores mais baixos encontrados na primavera e verão (**Figura 18B**).

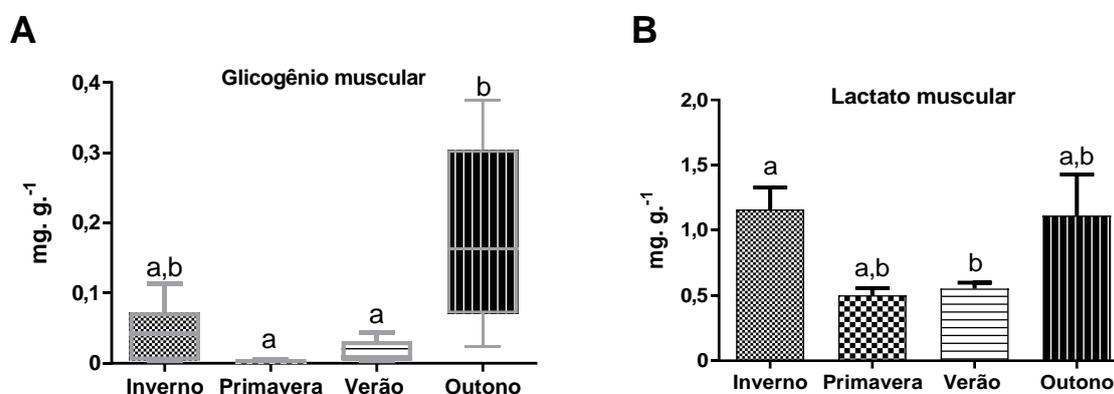


Figura 18. A) Concentração de glicogênio no músculo (mg/g). Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). Letras diferentes representam diferenças significativas quando aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn ($P \leq 0,05$). Inverno $n=12$, primavera $n=5$, verão $n=9$ e outono $n=6$. **B)** Concentração de lactato no músculo (mg/g). Os dados são apresentados como média \pm EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas quando aplicado o teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Inverno $n = 12$, primavera $n=5$, verão $n=9$ e outono $n=6$.

4.5.2 Oxidação de glicose a CO_2

Nesse experimento, foram utilizados somente animais das estações: primavera, verão e outono. Essa técnica é realizada com o tecido fresco e no momento da coleta de inverno os reagentes não estavam disponíveis, portanto, esse parâmetro não pôde ser determinado nas amostras de tecidos dos animais de inverno. A análise estatística indicou uma diferença significativa de CO_2 formado pela oxidação de glicose entre o verão e as demais estações (primavera e inverno). O verão apresentou a maior produção de CO_2 a partir da oxidação de glicose (**Figura 19**).

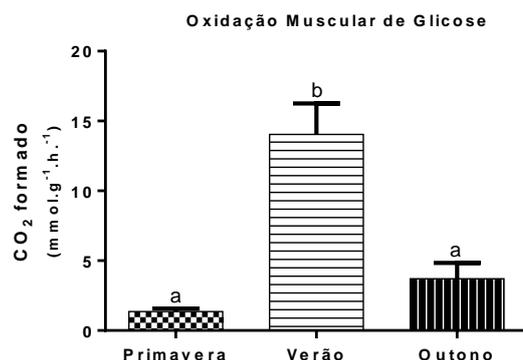


Figura 19. Oxidação de glicose a CO₂ no músculo (mmol/g/h). Os dados são apresentados como média ± EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas quando aplicado o teste ANOVA de uma vida seguido de pós-teste de Tukey (P<0,05). Primavera n=5, verão n=10 e outono n=6.

4.5.3 Síntese de glicogênio a partir de glicose

Essa técnica foi realizada com o tecido fresco utilizado na técnica descrita de oxidação de glicose a CO₂ e, devido a isso, esse parâmetro não pôde ser determinado nas amostras de tecidos dos animais de inverno. O período do verão apresentou maiores valores de síntese de glicogênio a glicose do que a primavera e outono, apresentando os maiores valores de concentração (**Figura 20**).

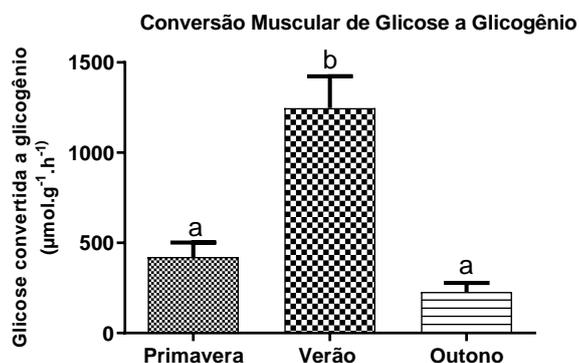


Figura 20. Conversão de glicose a glicogênio no músculo (µmol/g/h). Os dados são apresentados como média ± EPM. Letras diferentes representam diferenças significativas quando aplicado o teste ANOVA de uma vida seguido de pós-teste de Tukey (P<0,05). Primavera n=5, verão n=10 e outono n=6.

4.6 Triglicerídeos no tecido adiposo

A avaliação da concentração de triglicerídeos no tecido adiposo não apresentou diferenças significativas entre as diferentes estações do ano (**figura 21**). O inverno apresentou as concentrações mais elevadas de triglicerídeos (4,07 mg%).

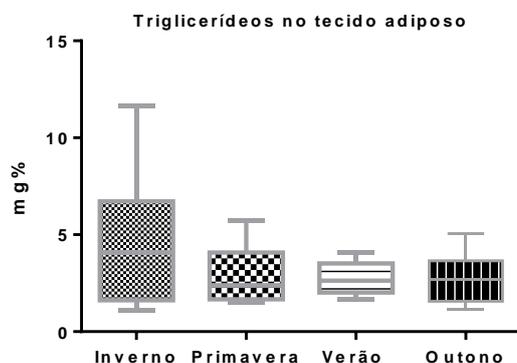


Figura 21. Concentração de triglicerídeos no tecido adiposo (mg%). Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). Não houve diferença significativa entre as estações quando realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn ($P \leq 0.05$). Inverno $n=12$, primavera $n=4$, verão $n=10$ e outono $n=6$.

5 DISCUSSÃO

Podemos evidenciar, através dos resultados obtidos nesse estudo, que a perereca Sul-Americana *B. pulchella* possui alterações na fisiologia metabólica durante as diferentes estações. Entre essas alterações destacamos a diferença na concentração plasmática de glicose e glicerol e, também, na oxidação hepática de glicose a CO_2 . No metabolismo muscular, evidenciamos diferenças na concentração de glicogênio e lactato, oxidação de glicose a CO_2 e síntese de glicogênio a partir de glicose. Porém, ao contrário do que levantado pela nossa hipótese, *B. pulchella* não apresentou uma maior concentração de crioprotetores durante o inverno, tampouco, um maior acúmulo de glicogênio hepático na estação que antecede o inverno associado ao manejo desses crioprotetores. Esses resultados, de certa forma, condizem com a ecologia e estratégia de vida da espécie estudada, visto que ela não hiberna/congela durante os meses frios e necessita de grande aporte energético durante esse período para suas atividades de reprodução, já que continua ativa durante todo ano (PELTZER & LAJMANOVICH, 2007).

Em relação aos parâmetros metabólicos investigados nesse estudo e a disponibilização de energia em *B. pulchella*, podemos avaliar no fígado a

capacidade de oxidação de glicose a CO₂, onde foi maior no verão quando comparado à primavera em *B. pulchella*. O produto da via glicolítica são duas moléculas de piruvato e nas células aeróbicas, o piruvato formado na glicólise é transportado para as mitocôndrias, onde é oxidado a CO₂ e H₂O (LODISH et. al, 2000). Essa maior capacidade glicolítica e oxidativa de glicose durante o verão sugere que nesse período o fígado utiliza mais glicose como principal substrato energético para produção de ATP comparado a primavera. A síntese de glicogênio hepático a partir de glicose, por sua vez, não apresentou diferenças significativas entre as estações analisadas, indicando que esse parâmetro permanece constante durante as estações.

A concentração hepática de glicogênio, glicerol, lactato, ureia e triglicerídeos não apresentaram diferenças significativas entre as estações. A concentração de glicogênio sem diferenças entre as estações condiz com o resultado obtido da síntese de glicogênio a partir de glicose que também não apresentou diferenças significativas entre as estações, indicando que o fígado mantém seus estoques de glicogênio em concentrações estáveis e a glicogênese a partir de glicose contínua ao longo do ano. Como *B. pulchella* vive em uma região de clima temperado e durante as coletas, em nenhum dia, a temperatura estava igual ou menor que 0°C, esse resultado para população analisada condiz pelo fato dessa espécie não hibernar ou congelar durante os meses mais frios. Portanto, pode-se esperar que o fígado não apresentasse alterações em seu conteúdo de glicogênio na mesma intensidade observada nas populações em hibernação (VALENZUELA-SÁNCHEZ et. al, 2015) ou congelamento (STOREY, 1984a). Como as condições climáticas durante as coletas não foram severas esses animais, provavelmente, continuam ativos durante os meses de frio e se alimentam durante esse período. Assim, interligam a estratégia de aumentar o conteúdo de glicogênio no período que antecede o inverno ao período que seria de realimentação na primavera nas espécies que congelam, como *L. sylvaticus*. Dessa forma, seus estoques energéticos hepáticos se mantêm contínuos durante todo ano para sua estratégia reprodutiva que é do tipo contínua, contrariamente das espécies com reprodução do tipo explosiva que depledam rapidamente seu glicogênio hepático para fornecer energia durante o breve evento de reprodução (WELLS, 2007). Todavia, mesmo que não significativa, a menor média de concentração de glicogênio hepático foi no

verão enquanto a maior oxidação hepática de glicose foi nessa mesma estação. Isso sugere que ocorre, nesses animais, uma maior depleção de glicogênio no verão para direcionar a glicose originária desse glicogênio para produção de ATP via oxidação fosforilativa.

Quando feita a análise plasmática da glicose, observou-se uma menor concentração no outono em relação ao inverno e primavera. O inverno e a primavera apresentaram as maiores concentrações de glicose plasmática, indicando que nesses animais a glicemia varia ao longo do ano. O fígado funciona como o principal regulador da glicemia, produzindo glicose pela degradação das reservas de glicogênio (glicogenólise) e por precursores gliconeogênicos (como lactato, alanina e glicerol) (NEWGARD et. al, 1983). No entanto, apesar da diferença encontrada na glicemia plasmática entre as estações, essa diferença não foi observada na concentração de glicogênio hepático nas estações. Esse resultado pode indicar que provavelmente a principal fonte de glicose nesses animais pode não ser da glicogenólise hepática.

Estudos anteriores demonstraram que a capacidade de tolerar o congelamento em anuros está associada à alta capacidade de estocar glicogênio e disponibilizar glicose, através da glicogenólise, para o sangue e demais tecidos (STOREY, 1984b). No período de descongelamento, essa glicose é novamente armazenada em glicogênio hepático (STOREY, 1987). A glicose, além de ser o principal crioprotetor de algumas espécies de anuros (STOREY, 1984a), também é acumulada no sangue e tecidos em resposta a desidratação, sugerindo que a mobilização da glicose pode ser uma resposta fundamental ao estresse em anuros (CHURCHILL & STOREY, 1996; COSTANZO et al., 1993) e, provavelmente, essa seja uma característica primitiva desse grupo (EDWARDS, 2004). Como em nossos animais não é evidenciada, pelo menos nas condições de coleta realizadas, congelamento ou desidratação, essa flutuação na glicemia pode ser explicada como um manejo energético entre os substratos devido a uma diferença sazonal na composição da dieta ou ainda a uma variação sazonal relacionada a fatores abióticos (como fotoperíodo). Não descartando, contudo, a possibilidade de *B. pulchella* tolerarem situações extremas (desidratação e congelamento) realizando alterações metabólicas quando expostas a essas condições. Devido a esse resultado da glicemia, mais estudos devem ser realizados para confirmar a causa

dessa variação sazonalmente e, experimentalmente, verificar se esses animais são realmente tolerantes ao congelamento.

Para se estabelecer relações entre os metabólitos energéticos e seu manejo é importante conhecer também a composição da dieta e quais macromoléculas são fornecidas majoritariamente ao organismo em questão. Anuros adultos são insetívoros, sendo aranhas e dípteros as presas mais importantes da sua dieta (MANEYRO & DA ROSA, 2004). Por esse motivo, comparações podem ser feitas, em termos de fornecimento energético, com outros carnívoros estritos. (BRENES-SOTO et al., 2018). Brenes-Soto e colaboradores (2018) verificaram que na rã *Xenopus laevis*, mesmo quando administrada uma dieta com alto teor de carboidratos, esses anuros preferiram metabolizar aminoácidos para produzir propionil-CoA e/ou metilmalonil-CoA que podem entrar no ciclo do ácido cítrico através de succinil-CoA em vez de acetil-CoA (via mais comum). Esse comportamento metabólico se assemelha ao dos demais carnívoros estritos, onde proteínas e gorduras são as principais fontes de energia e não os carboidratos. Assim, durante a variação sazonal, talvez os carboidratos não sejam realmente uma fonte importante energética em anuros e devido a isso não sofra um manejo tão evidente. Assim, a maior importância dos carboidratos para os anuros, provavelmente, está relacionada a tolerância ao congelamento como evidenciado em *L. sylvaticus* (STOREY 1984b).

A concentração de glicerol plasmático, assim como a glicose, também apresentou diferença significativa entre as estações. Esse parâmetro diferiu entre o verão e o inverno, sendo a menor concentração encontrada no inverno. O glicerol também é um crioprotetor relatado em algumas espécies de anuros, como em *Hyla versicolor*, onde é um importante redutor do conteúdo de gelo e apresenta concentrações até cinco vezes maiores do que a glicose no plasma desses animais (LAYNE, 1999). Neste trabalho, no entanto, a concentração de glicose foi maior do que a de glicerol indicando que provavelmente, o glicerol não seja o principal agente crioprotetor em uma situação experimental de congelamento. Layne (1999) observou uma mobilização moderada de glicerol em alguns *H. versicolor* após uma breve exposição ao frio. Ao contrário dos achados em *H. versicolor*, em *B. pulchella* a maior concentração de glicerol foi no verão, período considerado com as temperaturas maiores, e a menor concentração no inverno, onde ocorrem as

menores temperaturas, confirmando a pouca relação entre o glicerol e baixas temperaturas nessa espécie. Em *Hyla versicolor*, a glicogenólise hepática mantém o *pool* de carboidratos para produção de glicerol, crioprotetor durante o congelamento (STOREY & STOREY, 1985). O glicerol pode ser sintetizado a partir de intermediários da glicólise, como dihidroxicetona fosfato (DHAP) (STOREY & STOREY, 2004b). Como relatado anteriormente, o glicogênio hepático não apresentou diferença entre as estações de coleta ressaltando que ele não é a fonte principal de fornecimento de glicose e de glicerol nesses animais. Caso fosse, observaríamos nele também uma diferença na concentração entre as estações como observada nos elementos plasmáticos.

Uma possível origem do glicerol plasmático, além do glicogênio hepático, e que poderia explicar a sua diferença entre as estações é a origem através dos esqueletos de carbonos dos aminoácidos (RAYMOND & DRIEDZIC, 1997). Em estudos realizados com o peixe aclimatado ao inverno *Osmerus mordax* (RAYMOND, 1995; RAYMOND & DRIEDZIC, 1997; DRIEDZIC & SHORT, 2007), foi demonstrado que os esqueletos de carbono de alanina e glutamato são amplamente convertidos em glicose e glicerol. A alanina pode ser convertida em piruvato e depois em oxaloacetato, um intermediário essencial da gliconeogênese. Já o glutamato pode ser convertido a α -cetogluturato, que é então convertido em oxaloacetato, no ciclo do ácido cítrico. Finalmente, o oxaloacetato pode então ser convertido em PEP (fosfoenolpiruvato) via PEP carboxiquinase (PEPCK). Parte do PEP pode ser convertido à glicose via gliceraldeído-3-fosfato ou a glicerol via dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) e glicerol-3-fosfato (G3P). Acredita-se que a principal fonte dos aminoácidos para a conversão a glicerol seja as proteínas da dieta ou proteínas musculares em períodos de inanição (RAYMOND & DRIEDZIC, 1997).

Ainda que relatado a origem de glicerol a partir de aminoácidos em *Osmerus mordax* (RAYMOND, 1995), essa não é uma via comum de síntese para esse substrato. A via mais comum de síntese de glicerol na maioria dos animais é através da quebra dos triglicerídeos (HIBUSE et. al, 2006; LAFONTAN, 2008; ALVES-BEZERRA & COHEN, 2017). Os triglicerídeos podem sofrer lipólise intracelular nos tecidos ou ainda ação extracelular da lipoproteína lipase no triglicerídeos circulantes (WATFORD, 2000), originando ácidos graxos e glicerol (LAFONTAN & LANGIN, 2009). Portanto, no caso de *B. pulchella*, é necessário realizar um estudo com os

aminoácidos alanina e glutamato e a enzima PEPCK para confirmar se esses são potenciais precursores do glicerol desses animais e assim, presumir qual a origem do glicerol e porque esse substrato varia sazonalmente.

O fígado é um local ativo da síntese de glicerol e uma fonte de carbono para o glicerol em alguns animais é, como relatado anteriormente, os aminoácidos da dieta e as proteínas do organismo (RAYMOND & DRIEDZIC, 1997). Além dos esqueletos de carbono, o catabolismo dos aminoácidos gera também NH_4^+ (grupos aminos). O grupo amina (amônia) é tóxica para os organismos, por isso, é convertida no fígado a ureia através do ciclo da ureia para ser eliminada (NELSON & COX, 2014). Portanto, uma alta taxa de catabolismo proteico pode culminar em altas taxas de ureia. *B. pulchella* apresentou a menor concentração de ureia no fígado e menor concentração de glicerol no plasma no inverno. Portanto, podemos sugerir, que o catabolismo proteico hepático durante o inverno pode estar menor quando comparado às outras estações. Conseqüentemente, a produção de glicerol a partir de aminoácidos (como alanina e glutamato) também pode estar diminuída. Relembrando que as reservas hepáticas de glicogênio não apresentaram diferenças significativas entre as estações, e se essa fosse a outra fonte de glicerol, provavelmente, estaria mais baixa também no inverno.

Ainda que as concentrações plasmáticas de glicose e glicerol ao longo das estações não se comportaram como esperado, elas foram mais altas comparadas a outros trabalhos realizados com anuros. Em um estudo realizado por Niu et al. (2018), por exemplo, com a rã *Nanorana pleskei* foi analisado alguns parâmetros metabólicos durante o verão e outono. Eles encontraram valores baixos de concentração tanto de glicose quanto de glicerol comparados aos valores encontrados nesse trabalho em *B. pulchella* nessas mesmas estações. No verão, época reprodutiva dessa espécie (FEI et al. 2009), a concentração de glicose plasmática em *N. pleskei* teve como média 1,7 mM enquanto em *B. pulchella* a concentração para a mesma estação foi de 10,0 mM (seis vezes maior). Em *N. pleskei* a concentração média de glicerol durante o verão foi 0,15 mM e em *B. pulchella* o valor foi em média 0,62 mM (quatro vezes maior). Já no trabalho realizado por Do Amaral et al. (2018), anuros da espécie *Dryophytes chrysoscelis* (tolerantes ao congelamento) foram aclimatados a 5°C e tiveram seus parâmetros fisiológicos avaliados. Foi obtido, assim, uma concentração média de glicose

plasmática de 1,8 mM, valor novamente mais baixo quando comparados com *B. pulchella* no inverno. A média da concentração plasmática de glicose nos animais do inverno foi de 10,4 mM (quase seis vezes maior ao valor encontrado em *D. chrysoscelis*). Esses resultados indicam que *B. pulchella* apresenta valores médios de glicose e glicerol plasmático maiores em comparação a outros anuros. Devido ao fato dessa espécie ser ativa e ter a reprodução contínua, é evidenciada uma dependência da oxidação da glicose nas diferentes estações do ano para suprir as demandas energéticas e para isso é necessário valores maiores de glicose. Obviamente, um estudo futuro expondo esses animais a condições de congelamento faz-se necessário para analisar sua capacidade de tolerar o frio e como ele responde a concentração desses dois substratos (glicose e glicerol) nessas condições.

No músculo das patas, a oxidação de glicose a CO₂ e a glicogênese a partir de glicose apresentaram diferenças significativas entre as estações. Esses parâmetros foram maiores no verão quando comparados ao outono e primavera. É importante ressaltar que os valores obtidos na síntese de glicogênio a partir de glicose foram muito baixos sendo até não detectado na primavera e outono. Nesse tecido, no verão encontramos uma alta taxa de oxidação (similar ao fígado) e uma maior capacidade de sintetizar glicogênio a partir de glicose. No entanto, quando analisada a concentração de glicogênio no músculo, não foi o verão que apresentou maior valor e sim o outono. No outono, a concentração de glicogênio muscular foi maior quando comparada ao verão e a primavera. No estudo de Niu et al. (2018), eles também relataram uma maior concentração de glicogênio no músculo durante o outono comparado ao verão. Em outra espécie de anuro tolerante ao congelamento - *Pseudacris maculata*, a concentração de glicogênio também foi maior no outono comparado à concentração no verão e primavera (HIGGINS & SWANSON, 2013), similar aos resultados encontrados em nosso estudo. Esse padrão de acúmulo de glicogênio muscular durante o outono pode indicar uma característica primitiva dentro desse grupo. A maior concentração de glicogênio no músculo durante o outono e a menor concentração de glicose no plasma nessa mesma época podem indicar, também, que esses animais direcionam a glicose plasmática para o músculo e fazem um estoque desse substrato na forma de glicogênio no outono.

Esse estoque de glicogênio pode ser uma estratégia antecipatória para acumular glicogênio muscular durante o outono, já que o período que o sucede é o inverno. Assim, caso necessite de uma grande quantidade de glicose, esse animal pode disponibilizar esse substrato através da glicogenólise na estação mais fria onde as atividades reprodutivas não param e o animal fica exposto a temperaturas mais baixas. Para a reprodução, é interessante que os animais estejam com seus estoques energéticos altos para a utilização dele no músculo durante a atividade física envolvida nesse período. Além disso, *B. pulchella* habita locais onde ocorre períodos de frio intenso e vento, como São Francisco de Paula e Osório, respectivamente. Devido a essas questões, fica claro que essa alteração no estoque de glicogênio muscular pode envolver dois fatores principais: a severidade das condições climáticas e o período de reprodução contínuo. Esses resultados afirmam ainda mais a necessidade de realização de mais estudos com essa espécie envolvendo a tolerância a temperaturas sub-zeros, pois o resultado do glicogênio muscular se assemelha com *P. maculata* que é tolerante ao congelamento (HIGGINS & SWANSON, 2013).

As concentrações de lactato no fígado e no plasma não diferiram significativamente entre as estações. No músculo, no entanto, houve diferença significativa desse parâmetro entre o inverno e o verão, com o inverno apresentando a maior concentração de lactato.

Sabe-se que o congelamento aumenta a concentração de lactato tecidual nos sapos tolerantes ao congelamento, como *L. sylvaticus* (STOREY & STOREY, 1984a), pois os tecidos congelados estão em um estado de anóxia isquêmica e, devido a isso, apresentam uma alta do metabolismo anaeróbico. Os tecidos então apresentam um acúmulo de lactato como produto final glicolítico para suprir suas necessidades energéticas (ABBOUD & STOREY, 2013). Em *B. pulchella*, a maior concentração de lactato muscular sugere que na época mais fria, para manutenção do fornecimento de energia para as células musculares, ocorre a glicólise anaeróbica com produção de lactato. Esse lactato pode ser exportado para o sangue e no fígado convertido a glicose através da gliconeogênese. A glicose produzida no fígado pode ser disponibilizada para outros tecidos, inclusive para o músculo, onde pode ser metabolizada ou ser estocada como glicogênio. Essa produção do lactato no músculo e exportação dele até o fígado para conversão a

glicose é chamado Ciclo de Cori. Porém, em anfíbios, existem relatos de que a gliconeogênese a partir do lactato no fígado não é uma via tão presente (PHILLIPS & HIRD, 1977), sendo a maior parte do lactato muscular reciclado, durante o período de recuperação após um exercício, em glicogênio no próprio músculo (FOURNIER & GUDERLEY, 1992). Os valores mais baixos na concentração de lactato encontrados na primavera e verão no músculo podem indicar, ainda, o uso desse substrato para regeneração de glicose para atendimento da maior demanda metabólica do próprio tecido muscular nessas estações do ano. Especula-se, portanto, uma possível função do lactato como agente crioprotetor no músculo além de ser um substrato energético via gliconeogênese, porém, mais estudos devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Outro fator relevante para essa discussão é a relação da ureia com a LDH (Lactato desidrogenase). A lactato desidrogenase (LDH) é a enzima terminal da glicólise anaeróbica e desempenha um papel crucial tanto na manutenção da produção de ATP glicolítico em situações de pouco oxigênio quanto na facilitação do catabolismo do lactato acumulado quando as condições de estresse são reduzidas. É crucial, portanto, para produção e catabolismo do lactato pois atua como catalisador na reação reversível: $\text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{lactato} + \text{NAD}$. (ABBOUD & STOREY, 2013). Foi relatado que a ureia pode causar inibição da LDH devido a interferência no local ativo da enzima (RAJAGOPALAN et al., 1961) ou ainda desnaturação generalizada de proteínas em *Lithobates sylvaticus* (ABBOUD & STOREY, 2013). Em *B. pulchella*, durante o inverno foi relatada maior concentração de lactato no músculo e menor concentração de ureia (mesmo que não significativa), nesse mesmo período no fígado. Se esse lactato está mesmo sendo exportado até o fígado para ser convertido em glicose, é interessante que os níveis de ureia (um possível inibidor da LDH) estejam baixos para que ocorra a reação $\text{lactato} + \text{NAD} \rightarrow \text{piruvato} + \text{NADH}$ com facilidade, corroborando, assim, com os resultados obtidos nesse estudo.

A ureia, também é um crioprotetor relatado em *L. sylvaticus* e sua maior concentração nesses animais foi registrada no outono (COSTANZO & LEE, 2005). Nesse estudo, foi avaliada a concentração de ureia no plasma e no fígado e em ambos não houve diferenças significativas entre as estações. Entretanto, mesmo sem diferença significativa, observamos uma concentração de ureia hepática menor

durante o inverno comparado com a primavera e outono. A ureia, além de ser um agente crioprotetor, é o principal produto do metabolismo do nitrogênio na maioria dos anfíbios e, normalmente, se mantém em concentrações baixas (ROSENDALE et al., 2014). Porém, em situações de hipersalinidade, dissecação ou congelamento ela atinge concentrações altas, pois reduz a perda de água e melhora a habilidade de sobrevivência ao estresse osmótico (GORDON et al, 1961; JØRGENSEN, 1997; GRUNDY & STOREY, 1994; COSTANZO & LEE, 2005). A síntese da ureia (ureogênese ou ciclo da ureia) ocorre predominantemente no fígado e tem uma importância na eliminação da amônia tóxica que é produzida durante o catabolismo dos aminoácidos (BARMORE & STONE, 2019), isso pode indicar que a ureogênese é menor no inverno, pois há um menor catabolismo dos aminoácidos. Outro aspecto relacionado à ecologia da *B. pulchella* é seu habitat e como isso pode influenciar as concentrações de ureia. Essa espécie pode ocorrer em locais próximo à praia, como em Itapeva (COLOMBO et. al, 2008), onde há uma alta salinidade e ventos costeiros. Portanto, devido ao estresse osmótico que as condições nesses locais podem causar ao organismo, a concentração de ureia também pode aumentar para compensar esse estresse principalmente nos meses mais quentes, onde podem ocorrer períodos com maior possibilidade de dissecação.

Devido ao pouco conteúdo de plasma obtido desses animais (~20 uL), não foi possível medir a concentração de ureia plasmática nos animais capturados no inverno portanto, em relação as estações analisadas verão, primavera e outono não foram observadas diferenças significativas.

É importante, também, quando se analisa o metabolismo de algum animal analisar o seu estoque de lipídios. O excesso de calorías é armazenado na forma de triglicerídeos no tecido adiposo (KRAUSE & HARTMAN, 1984). Os lipídios, principalmente os triglicerídeos, provavelmente são as principais reservas de energia dos anfíbios. Eles contêm pelo menos o dobro de energia específica por peso do que a contida em carboidratos e proteínas (FITZPATRICK, 1976). Costanzo e cols. (2014) sugerem que os lipídios são o substrato energético primário em sapos que hibernam sem congelamento. Os lipídios encontrados no fígado, provavelmente, estão mais relacionados à síntese e degradação do que no armazenamento desse substrato. Em *B. pulchella*, observa-se uma menor quantidade de triglicerídeos hepático, mesmo que não significativa, durante o verão

e a primavera juntamente com uma maior quantidade de glicerol plasmático nessas mesmas estações. Sugerindo, assim, que durante essas duas estações há uma maior degradação desses lipídios teciduais originando glicerol e o exportando para o plasma. Essa conclusão levanta, novamente, a necessidade de explorar a origem do glicerol nesses animais, seja ela a partir de triglicerídeos ou aminoácidos.

Porém, o fígado é apenas um dos locais envolvidos no armazenamento lipídico de anfíbios já que as maiores quantidades são armazenadas nos corpos gordurosos abdominais e nas gônadas (FITZPATRICK, 1976). Durante o ano, o conteúdo lipídico varia em relação aos processos de armazenamento, degradação e síntese pois estão ligados a atividades como dormência e reprodução (SINGH & SINHA, 1986). Quantidades consideráveis de lipídios podem ser manejadas entre os diferentes órgãos transportados pelo plasma, seguindo rotas que podem variar sazonalmente (MILONE et al, 1990). Entretanto, mesmo sazonalmente, os estoques de triglicerídeos, tanto no fígado quanto no tecido adiposo subcutâneo, não apresentaram diferenças significativas entre as estações em *B. pulchella*. Por ser um anuro com atividade de vocalização contínua (PELTZER & LAJMANOVICH, 2007), é importante manter o principal estoque energético (lipídios) constante ao longo do ano e isso justifica os resultados obtidos nesta dissertação.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A partir das análises metabólicas realizadas em *B. pulchella*, conclui-se que ela não aumenta a concentração plasmática dos crioprotetores glicose, glicerol e ureia durante a estação mais fria (inverno) comparada às outras estações em condições naturais. Isso não anula a possibilidade desses animais serem tolerantes ao congelamento, visto que a concentração plasmática de glicose e o glicerol apresentaram valores altos quando comparados a outras espécies. Um estudo submetendo esses animais experimentalmente a condições de congelamento faz-se necessário para confirmar a capacidade de tolerar/suportar o congelamento e qual são os possíveis agentes crioprotetores nessa situação experimental.

Os estoques de glicogênio, por sua vez, variaram entre as estações somente no tecido muscular. No fígado, esses estoques são mantidos constantes ao longo

do ano. No músculo, foi observada a maior concentração de glicogênio no outono juntamente com a menor concentração de glicose plasmática, o que pode indicar que há uma preparação para aumentar as reservas de glicogênio durante o outono e deixá-las disponíveis para o inverno. Assim, caso necessite, o tecido dispõe de mais glicose para as atividades reprodutivas ou até mesmo para suportar o frio no inverno. No verão, o substrato mais utilizado nesse tecido parece ser a glicose, pois foi encontrada uma maior oxidação e síntese de glicogênio a partir desse substrato.

Ainda no músculo, a maior concentração de lactato no inverno indica que nesses animais a glicólise anaeróbica está mais presente na estação mais fria comparada ao verão que é a estação mais quente. Sugerimos que esse lactato possa seguir dois destinos: ser reciclado no próprio músculo ou ser exportado até o fígado (Ciclo de Cori) e servir com substrato para gliconeogênese.

O glicerol plasmático de *B. pulchella*, provavelmente, é oriundo dos esqueletos de carbono de aminoácidos no fígado, já que a menor concentração de ureia (substrato do catabolismo das proteínas) e a menor concentração de glicerol plasmático foram encontradas na mesma estação (inverno). Além disso, é provável que haja uma interação negativa entre os altos níveis de ureia hepática e a LDH, indicando que existe uma necessidade de baixas concentrações de ureia para que a LDH tenha o seu melhor desempenho na conversão de lactato (oriundo do músculo) a piruvato durante o inverno em *B. pulchella*. A ureia hepática, portanto, parece estar ligada ao catabolismo proteico, sugerindo menor concentração quando ocorre uma maior gliconeogênese hepática a partir de lactato ou quando é necessária a síntese de glicerol a partir de aminoácidos. Sendo que provavelmente a via gliconeogênica esteja presente no metabolismo desses animais.

Esse trabalho ainda está em andamento, pois julgamos ser importante a necessidade de analisar a expressão gênica dos transportadores de glicose, especialmente GLUT2, já que não há descrito para essa espécie. Experimentos estão sendo feitos para que consigamos amplificar e sequenciar parte da sequência para o gene *slc2a2* (que codifica GLUT2) e desenhar primers específicos para a reação de PCR quantitativa. Até agora, já obtivemos a sequência parcial de *actb* (actina), cuja expressão será usada para normalizar a expressão de *slc2a2*. Quando obtidos os primers específicos, será realizada a expressão do GLUT2 no fígado, músculo, tecido nervoso, coração e estômago.

Além do GLUT2, também projetamos realizar a expressão de outros transportadores como as aquagliceroporinas (AQP's) que são os transportadores de glicerol e os MCT's, os transportadores de monocarboxilato que realizam o transporte de lactato.

Faz-se necessário, também, analisar a expressão e atividade de algumas enzimas relacionadas ao metabolismo da glicose (Glicogênio fosforilase, fosfoglicomutase e Glicose-6-fosfatase), lactato (Lactato desidrogenase) e glicerol (Glicerol-3-fosfato desidrogenase, Glicerol quinase, e Glicerol-3-fosfatase).

Além dos transportadores e das enzimas, pretende-se determinar a presença da gliconeogênese a partir dos precursores como alanina, lactato e glicerol, pois essa via, provavelmente, pode desempenhar um papel importante na fisiologia dos anuros. Assim, experimentos que analisem a via gliconeogênica no fígado também estão nas perspectivas deste trabalho.

Todas as análises até agora realizadas ou projetadas serão interessantes quando estudadas, também, em situações experimentais de exposição desses animais ao congelamento em escalas decrescentes de temperatura e em situações de desidratação. Assim, poderemos comparar o nível de tolerância ao estresse nessa espécie e ampliar para outras existentes no Rio Grande do Sul.

Por fim, os nossos resultados confirmam a necessidade da continuação dos estudos relacionados ao metabolismo de *B. pulchella* para esclarecer as dúvidas levantadas durante esse projeto e verificar a mudança (ou não) do metabolismo em situações de estresse e as principais vias envolvidas nessas condições. Dessa forma, poderemos compreender ainda mais os aspectos fisiológicos de *B. pulchella* para entender quais mecanismos podem estar relacionados com a estratégia de congelamento e se esses mecanismos podem ser aplicáveis em outros modelos de animais ou até mesmo, na criopreservação de órgãos e tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, J. & STOREY K. B. Novel control of lactate dehydrogenase from the freeze tolerant wood frog: role of posttranslational modifications. **PeerJ**, 2013.

AIRES, M. M. Fisiologia 4ª ed **Guanabara Koogan**, 2011.

ANTONIAZZI, C. E.; LÓPEZ, J. A.; DURÉ, M.; FALICO, D. A. Feeding of two amphibian species (Anura: Hylidae) during the low temperatures season and its relationship with energy storage in Santa Fe, Argentina. **Revista de Biología Tropical**. 61 (2): 875–886, 2013.

ALVES-BEZERRA, M. & COHEN, D. E. Triglyceride Metabolism in the Liver. **Compr Physiol**. 2017;8(1):1–8. 2017.

ANTONIAZZI, C. E.; LÓPEZ, J. A.; GHIRARDI, R.; ARMANDO, A. P. Biología reproductiva de *Boana pulchella* y *Boana punctata* (Anura: Hylidae) en poblaciones simpátricas de humedales templados. **Caldasia** 41(2):245–256, 2019.

BANG J. K; LEE J. H.; MURUGAN R.N, LEE S. G, DO H., et al. Antifreeze peptides and glycopeptides, and their derivatives: potential uses in biotechnology. **Mar. Drugs** 11:2013–41, 2013.

BARMORE, W. & STONE, W. L. Physiology, Urea Cycle. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.

BOLZAN, A. M. R.; GAREY, M. V; HARTMANN, P. A. HARTMANN, M. T. Too cold for dating: Temporal distribution of the calling activity of an austral anuran assemblage **Herpetology Notes**, volume 12: 961-968, 2019.

BOVO, R. P. Fisiologia térmica e balanço hídrico em anfíbios anuros. Tese de Doutorado. **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, 2015.

BORAH, B. K.; RENTHELEI, Z.; TRIVEDI, A. K. Seasonality in terai tree frog (*Polypedates teraiensis*): Role of light and temperature in regulation of seasonal breeding. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. Volume 191, February 2019, Pages 44-51. 2006.

BRASIL. Constituição Federal. Lei n. 11.794 (Lei Arouca), de 08 de outubro de 2008. **Lex**: Estabelece procedimentos para uso científico de animais.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e Comissão Nacional de Energia Nuclear. Resolução n. 167, de 30 de abril de 2014. **Lex**: Norma CNEN NN 8.01 - Gerência de rejeitos de baixo e médio níveis de radiação.

BRENES-SOTO, A.; DIERENFELD, E. S.; JANSSENS, G. P. J. The interplay between voluntary food intake, dietary carbohydrate-lipid ratio and nutrient metabolism in an amphibian (*Xenopus laevis*). **PLoS ONE** 13(12), 2018.

BURGGREN, W. & WARBURTON, S. Burggren WW, Warburton S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. **ILAR J** 48: 260-269. **ILAR journal** / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources. 48. 260-9. 10.1093/ilar.48.3.260., 2007.

CAMACHO, A. Respostas dos ectotermos à variação microclimática. **Revista da Biologia** 8, 5–14, 2012.

CHURCHILL T. A.; STOREY K. B. Organ Metabolism and Cryoprotectant Synthesis during Freezing in Spring Peepers *Pseudacris crucifer*. **Copeia** Vol. 1996, No. 3, pp. 517-525, 1996.

COLOMBO, P.; KINDEL, A.; VINCIPROVA, G.; KRAUSE, L. Composição e ameaças à conservação dos anfíbios anuros do Parque Estadual de Itapeva, município de Torres, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biota Neotrop**, 2008.

COLOMBO, P.; ZANK, C. Biodiversidade dos Campos de Cima da Serra. P. 104-111. *In*: BOND-
BUCKUP, G. (Org.) 1. ed. Porto Alegre: **Libretos**, v. 1. 196 p, 2008.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal, Ministério da Ciência,
Tecnologia e Inovação. **Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA**. 2015.

CONLON, J. M.; YANO, K.; CHARTREL, N et. al. Freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*
is associated with unusual structural features in insulin but not in glucagon. **J Mol
Endocrinol.**,21(2):153–159, 1998.

COSTANZO, J. P; REYNOLDS, A.; DO AMARAL, M. C; ROSENDALE, A. J; CROWE, J.; CROWE,
L.; CARPENTER, J.; AURELL WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins
by sugars. **Biochem J.** 242, 1–10, 1987.

COSTANZO, J. P.; LEE, R.E.; LORTZ, P.H. Physiological responses to freeze-tolerant and intolerant
frogs: clues to evolution of anuran freeze tolerance. **Am J Physiol** 265: R721–R725, 1993.

COSTANZO, J. P. & LEE, R.E.; Cryoprotectant *production capacity of the freeze-tolerant wood frog,*
Rana sylvatica. **Can J Zool** 71: 71–75, 1993.

COSTANZO J.P & LEE R.E. Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog. **J Exp Biol**
208:4079–4089, 2005.

COSTANZO, J.P; DO AMARAL, M. C. F.; ROSENDALE, A. J; LEE R. E. Hibernation physiology,
freezing adaptation and extreme freeze tolerance in a northern population of the wood frog. **J Exp
Biol** 216: 3461– 3473, 2013.

COSTANZO, J.P; DO AMARAL, M. C. F.; ROSENDALE, A. J; LEE R. E., Seasonality of Freeze
Tolerance in a Subarctic Population of the Wood Frog, *Rana sylvatica.* **International Journal of
Zoology**, vol. 2014, Article ID 750153, 13 pages, 2014.

CRUMP, M. L. Reproductive strategies in a tropical anuran community. **Miscellaneous Publications**
N°61. Universidad de Kansas. Printing Service. Lawrence, Kansas, 1974.

DIENI, C.A & STOREY, K. B. Regulation of hexokinase by reversible phosphorylation in skeletal
muscle of a freeze-tolerant frog. **Comp Biochem Physiol B** 159: 236 –243, 2011.

DITTRICH, R.; MALTARIS, T.; MUELLER, A; DIMMLER, A.; HOFFMANN, T.; KIESEWETTER, F.;
BECKMANN, M. W. Successful Uterus Cryopreservation in an Animal Model. **Horm Metab Res**;
38(3): 141-145, 2006.

DO AMARAL, M. C. F.; FRISBIE, J.; GOLDSTEIN, D. L.; KRANE, C. M. The cryoprotectant system of
Cope's gray treefrog, *Dryophytes chrysoscelis*: responses to cold acclimation, freezing, and thawing.
Journal of Comparative Physiology B, 2018.

DRIEDZIC, W. & SHORT, C. E. Relationship between food availability, glycerol and glycogen levels
in low temperature challenged rainbow smelt *Osmerus mordax*. **Journal of Experimental Biology**,
2007.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. The biology of amphibians. **New York: MacGraw – Hill**, 1986.

DUELLMAN, W. E. & TRUEB., L. Biology of Amphibians. Baltimore, **The Johns Hopkins University
Press**, 670p, 1994.

- DUELLMAN, W.E. Distribution patterns of amphibians in South America. In Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. **W.E. Duellman, ed.** Johns Hopkins, Baltimore, p.255-328, 1999.
- DUMAN, J. Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: An overview with emphasis on physiological function. **The Journal of experimental biology**. 218. 1846-1855, 2015.
- DUMÉRIL, A. M. C. & BIBRON G. *Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles*. Volume 8. Paris: **Librarie Encyclopedique de Roret**, 1841.
- EDWARDS, J. R.; JENKINS, J. L.; SWANSON, D. L. Seasonal effects of dehydration on glucose mobilization in freeze-tolerant chorus frogs (*Pseudacris triseriata*) and freeze-intolerant toads (*Bufo woodhousii* and *B. cognatus*). **Journal of Experimental Zoology**, 301A (6), 521–531., 2004.
- FEI, L.; HU S.; YE C.; HUANG Y.; TIAN, W.; JIANG, J.; ZHONG, S.; LI, J.; WANG, Y.; CAI, M.; CAI, C. *Chinese Zoology - Amphibian*. Science Press, Beijing. 2009.
- FITZPATRICK, L. C. Life History Patterns of Storage and Utilization of Lipids for Energy in Amphibians. **AMER. ZOOL.**, 16:725-732, 1976.
- FØRGENSEN, C. Urea and amphibian water economy. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, vol. 117, pp. 161–170, 1997.
- FOURNIER, P. A. & GUDERLEY, H. Metabolic fate of lactate after vigorous activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 262(2), R245–R254, 1992.
- FROST, D R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0 Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> acesso em 28 de outubro de 2019. **American Museum of Natural History**, New York, USA, 2019.
- GORDON, M. S.; SCHMIDT-NIELSEN, K.; KELLY, H. M. Osmotic regulation in the crab-eating frog (*Rana cancrivora*). **Journal of Experimental Biology**, vol. 38, pp. 659–678, 1961.
- GOSDEN, R. G.; YIN, H.; BODINE R. J.; MORRIS, G. J. Character, distribution and biological implications of ice crystallization in cryopreserved rabbit ovarian tissue revealed by cryo-scanning electron microscopy. **Human Reproduction**, Volume 25, Issue 2, Pages 470–478, 2010.
- GRUNDY, J. E. & STOREY, K. B. Urea and salt effects on enzymes from estivating and non-estivating amphibians. **Molecular and Cellular Biochemistry**, vol. 131, no. 1, pp. 9–17, 1994.
- HIGGINS S.A. & SWANSON, L.D., Urea is not a universal cryoprotectant among hibernating anurans: Evidence from the freeze-tolerant boreal chorus frog (*Pseudacris maculata*). **Comp. Biochem. Physiol., A**, 2013.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd ed.). **Oxford**, UK: Clarendon, 1989.
- HERMES-LIMA, M. & ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 133(4), 537–556, 2002.

HIBUSE, T.; MAEDA, N.; NAGASAWA, A.; FUNAHASHI, T. Aquaporins and glycerol metabolism **Biochim Biophys Acta**. 2006 .

HILLMAN, S.S.; WITHERS, P.; DREWES, R.; HILLYARD, S. Ecological and Environmental Physiology of Amphibians. **Oxford University Press**: New York, NY, USA; ISBN 0198570317, 2008.

HOFFMANN, M.; HILTON-TAYLOR, C.; ANGULO, A.; BOHN, M.; BROOKS, T.M.; BUTCHART, S.H.; CARPENTER, K.E.; CHANSON, J.; COLLEN, B.; COX, N.A.; et al. The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. **Science**, 330, 1503–1509, 2010.

HUANG, W.S; CHENG, Y.S; TU, H.Y; Reproductive patterns of two sympatric ranid frogs, *Rana latouchii* and *R. sauteri*, with comments on anuran breeding seasons in Taiwan. **Coll Res**. 17:1–10, 2004.

HUEY, R. B; & STEVENSON R. D. Integrating physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. **American Zoologist** 19, 357–366, 1979.

HUEY, R. B; & KINGSOLVER J. G. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. **Trends Ecol Evol**. 1989 May;4(5):131-5, 1989.

HUTCHISON, V.H.; HAINES, H. B.; ENGBRETSON, G. Aquatic life at high altitude: Respiratory adaptations in the lake titicaca frog, *Telmatobius culeus*. **Respiration Physiology**, 27(1), 115–129, 1976.

IRWIN, J. T & LEE R. E. Geographic variation in energy storage and physiological responses to freezing in the gray treefrogs *Hyla versicolor* and *H. chrysoscelis*. **Journal of Experimental Biology** 206: 2859-2867, 2003.

IUCN. *Lithobates sylvaticus*. Amphibian Specialist Group 2015. **The IUCN Red List of Threatened Species**: e.T58728A78907321., 2015.

JENKINS, J. L.; SWANSON, D. L. Liver glycogen, glucose mobilization and freezing survival in chorus frogs, *Pseudacris triseriata*. **Journal of Thermal Biology**. Volume 30, Issue 6, August 2005, Pages 485-494, 2005.

JIM, J. Distribuição altitudinal e estudo de longa duração de anfíbios da região de Botucatu, Estado de São Paulo. Tese de Livre-Docência. Instituto de Biociências, **UNESP**, Campus de Botucatu, 343 p, 2002.

JOANISSE, D. R. & STOREY K. B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271(3), 1996.

JOHN-ALDER, H.B; MORIN, P.J & LAWLER S. Thermal physiology, phenology, and distribution of tree frogs. **Am Nat** 132(4): 506-520, 1988.

KALINKA, M. J.; REXER-HUBER, P. J.; BISCHOP, D. A. W. Skin ice nucleators and glycerol in the freezing-tolerant frog *Litoria ewingii*. **Journal of Comparative Physiology B**, Volume 181, Number 6, Page 781, 2011.

- KISS, A. C. I.; DE CARVALHO, J. E.; NAVAS, C. A.; GOMES, F. R. Seasonal metabolic changes in a year-round reproductively active subtropical tree-frog (*Hypsiboas prasinus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. Volume 152, Issue 2, Pages 182-188, 2009.
- KNIGHT, C. & DUMAN, J. Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: A possible cryoprotective role. **Cryobiology**. 23, 256–262, 1986.
- KRAUSE, B. R. & HARTMAN, A. D. Adipose tissue and cholesterol metabolism. **Journal of Lipid Research**, Volume 25, 1984.
- KWET, A. & M. DI-BERNARDO. Pró-Mata - Anfíbios. Amphibien. Amphibians. Porto Alegre, **EDIPUCRS**, 107p., 1999.
- KWET, A.; AQUINO, L.; LAVILLA, E.; DI TADA, I. *Hypsiboas pulchellus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2004**: e.T55619A11340514, 2004.
- KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu Rev Physiol** 67: 225–257, 2005.
- LAFONTAN, M. Advances in adipose tissue metabolism. **International Journal of Obesity** volume 32, pagesS39–S51. 2008.
- LAFONTAN, M & LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Prog Lipid Res**. 2009.
- LAYNE, J. R. Freeze tolerance and cryoprotectant mobilization in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). **Journal of Experimental Zoology**, 283(3), 221–225, 1999.
- LANGONE, J.A. Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos). **Museo Damaso Antonio Larrañaga, Montevideo**. (Nº 5, série de divulgación), 1994.
- LEE, R.; COSTANZO, J.; DAVIDSON, E.; LAYNE, J. Dynamics of body water during freezing and thawing in a freeze-tolerant frog (*Rana sylvatica*). **J Therm Biol**. 17, 263–266, 1992.
- LEE, R. Cryoprotectants and extreme freeze tolerance in a subarctic population of the wood frog. **PLoS ONE**. 10, 1–23, 2015.
- LI, Y.; COHEN, J.M.; ROHR, J.R. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. **Integr. Zool**, 8, 145–161, 2013.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZUPURSKY, S. L et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. **Freeman**. Section 16.1, Oxidation of Glucose and Fatty Acids to CO₂, 2000.
- LÓPEZ, J. A.; SCARABOTTI, P.A.; GHIRARDI, R. Seasonal patterns of abundance and recruitment in an amphibian assemblage from the Paraná River floodplain. **Interciencia** 36:538–544, 2011.
- LONG, W. & CHEESEMAN, C. I. Structure of, and functional insight into the GLUT family of membrane transporters. **Cell Health and Cytoskeleton**, Review, 2015.
- MANEYRO, R.; & ROSA, L. Temporal and spatial changes in the diet of *Hyla pulchella* (Anura, Hylidae) in southern Uruguay. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, 3(2), 101-103, 2004.

MERSMANN, H. J. & HU, C. Y. Factors affecting measurements of glucose metabolism and lipolytic rates in porcine adipose tissue slices in vitro. **Journal of animal science**. 64(1):148–164, 1987.

MENTINO, D.; SCILLITANI, G.; MARRA, M.; MASTRODONATO, M. Seasonal changes in the liver of a non-hibernating population of water frogs, *Pelophylax kl. esculentus* (Anura: Ranidae). **The European Zoological Journal**, Volume 84, Pages 525-535, 2017.

MILONE, M.; CALIENDO, M. F.; RASTOGI, R. K., CHIEFFI, G. Seasonal lipid composition in the liver, fat body and gonads of *Rana esculenta*. Italian Journal of Zoology 50:227–234, 1983.

MOYES, C. D. & SCHULTE, P. M. Princípios de Fisiologia Animal. 2ª Edição, ISBN: 9788536322230, 792 pag. **Editora Artmed**. 2010.

MOTULSKU, H. J. & BROWN, R.E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression—A new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. **BMC Bioinform**.7: 123 -143, 2006.

MUECKER, M. & THORENS B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Mol Aspects Med** 34: 121–138, 2013.

MUTYAM, V.; PUC CETTI, M.V; FRISBIE, J.; GOLDSTEIN, D.L; KRANE, C.M. Dynamic regulation of aquaglyceroporin expression in erythrocyte cultures from cold- and warm-acclimated Cope's gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol** 315: 424 – 437, 2011.

NAVAS, C. A.; OTANI, L. Physiology, environmental change, and anuran conservation. **Science** 2010, 330, 83–103, 2007.

NELSON, D. L. & COX, M. M Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, 6. ed., 2014.

NEUFELD, D. & LEADER, J. Cold inhibition of cell volume regulation during the freezing of insect malpighian tubules. **J Exp Biol**. **201**, **2195–2204**, **1998**.

NGUYEN, T. D. Regulation of glutamate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. **Library Catalogue Record**, <https://doi.org/10.22215/etd/2017-12056>. Carleton University, 2017.

NIU, Y.; WANG, J.; MEN, S.; ZHAO, Y.; LU, S.; TANG, X. Urea and plasma ice-nucleating proteins promoted the modest freeze tolerance in Pleske's high altitude frog *Nanorana pleskei*. **Journal of Comparative Physiology B**, 2018.

PELTZER, P.M & LAJMANOVICH; C.R. Amphibians. En: Iriundo MH, Paggi JC, Parma M J, editores. El río Paraná Medio. Heidelberg, Berlín: **Springer**. p. 327–340, 2007.

PIMM, S.L, JENKINS CN, ABELL R, BROOKS TM, GITTLEMAN JL, JOPPA LN, RAVEN PH, ROBERTS CM, SEXTON JO. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. **Science** 344(6187): 1246752, 2014.

POUGH, F. H.; Amphibian Biology and Husbandry. **ILAR Journal**, Volume 48, Issue 3, Pag 203–213, 2007.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. A Vida dos Vertebrados. (4ª ed.). São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, 2008.

PHILLIPS, J. W & HIRD, F. J. R. GLUCONEOGENESIS IN VERTEBRATE LIVERS. **Comp. Biochem. Physiol**, Vol. 57B, pp. 127 to 131, 1977.

PRADO, G. M., & POMBAL Jr., J. P. Distribuição espacial e temporal dos anuros em um brejo da Reserva Biológica de Duas Bocas, Sudeste do Brasil. **Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro**, v.63, n.4, p.685-705, 2005.

RAJAGOPALAN, K.V.; HANDLER, P.; FRIDOVICH, I. Competitive inhibition of enzyme activity by urea. **Journal of Biological Chemistry**, 36:1059–1065, 1961.

RAYMOND, J. Glycerol synthesis in the rainbow smelt *Osmerus mordax*. **J Exp Biol**. 1995.

RAYMOND, J. A.; DRIEDZIC, W. Amino Acids Are a Source of Glycerol in Cold-Acclimatized Rainbow Smelt. **Comparative biochemistry and physiology. B**, Comparative biochemistry 118(2):387-393, 1997.

ROSSA-FERES, D. C. & JIM, J. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros na região de Botucatu, São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, 54(2):323-334, 1994.

ROY P.; GOSWAMI, P. Freeze tolerance in wood frogs. **J Investig Genomics**. 6(1):1–4. DOI: 10.15406/jig.2019.06.00078, 2019.

ROWE, C.; HOPKINS, W. A.; BRIDGES, C. Physiological ecology of amphibians in relation to susceptibility to natural and anthropogenic factors. Linder G, Krest S, Sparling D, eds. Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects. Pensacola: **Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press**. p 9-58. 2003.

RUBINSKY, B.; LEE, C. Y.; BASTACKY, J.; ONIK, J. The process of freezing and the mechanism of damage during hepatic cryosurgery. **Cryobiology**. 27, 85-97, 1990.

SÁNCHEZ, L.C; PELTZER, P.M; MANZANO, A.S; LAJMANOVICH, R.C. Dinámica de un ensamble de anuros en un humedal del tramo inferior del río Paraná, Argentina. **Interciencia** 32(7):463–470, 2007.

SANTOS, T. G.; KOPP, K.; SPIES, M. R.; TREVISAN, R. CECHIN, S. Z. Distribuição temporal e espacial de anuros em área de Pampa, Santa Maria, RS. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 98, n. 2, p. 244-253, 2008.

SBH. “Anfíbios brasileiros – lista de espécies”. *Sociedade Brasileira de Herpetologia*, 2019.

Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acessado em: 02/02/2020.

SCHMID, W. D. Survival of frogs in low temperature. **Science** 512: 697–698, 1982.

SINGH, R. P. & SINHA, R. C. Seasonal changes in energy reserves in the common frog, *Rana tigrine*. **Japanese Journal of Physiology** 39:969–973, 1989.

SOMMERS, M. D.; RANDALL, L. A. & BARCLAY, R. M. R. Effects of environmental variables on the calling behaviour of Northern Leopard Frogs (*Lithobates pipiens*) in Alberta, Canada. **Canadian Journal of Zoology** 96: 163–169, 2018.

SOUZA, R. Caracterização dos invernos no sul do Brasil em função dos dias de neve e da participação das massas de ar. Tese (Doutorado em Geografia) - Faculdade de Geografia, Letras e Ciências Humanas, **Universidade de São Paulo**. 148 pp, 2002.

SRTR. Scientific Registry of Transplant Recipients. Disponível em: <<https://www.srtr.org>>. Acesso em 10 de janeiro de 2019.

STOREY, K. B. Freeze tolerance in the frog, *Rana sylvatica*. **Experientia**, 40: 1261, 1984 (a).

STOREY, K. B. & STOREY J. M. Biochemical adaptation for freezing tolerance in the wood frogs, *Rana sylvatica*. **J Comp Physiol B** 155:29–36, 1984 (b).

STOREY, J. M. & STOREY, K. B. Adaptations of metabolism for freeze tolerance in the gray tree frog, *Hyla versicolor*. **CanJ Zool** 63:49–54, 1985.

STOREY, K.B & STOREY, J. M. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles. **Can J Zool** 64: 49 –56, 1986.

STOREY, K. B. Organ-specific metabolism during freezing and thawing in a freeze tolerant frog. **Am. J. Physiol.** 253: R292 - R297, 1987.

STOREY, K.B & STOREY, J. M. Freeze tolerance in animals. **Physiol Rev.**, Jan;68(1):27-84, 1988.

STOREY K. B. & STOREY, J. M. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. **Q Rev Biol.** 65, 145–174, 1990.

STOREY K. B. Life in a frozen state: adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles. **Am. J. Physiol.** 258, R559-R568, 1990.

STOREY K. & STOREY, J. M. Natural Freezing Survival in Animals. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Vol. 27, pp. 365-386, 1996.

STOREY, J. M. & STOREY, K. B. β -Adrenergic, hormonal, and nervous influences on cryoprotectant synthesis by liver of the freeze-tolerant wood frog *Rana sylvatica*. **Cryobiology** 33: 186 –195, 1996.

STOREY, K.B. Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance. **Cryobiology** 48: 134 –145, 2004 (a).

STOREY K. B. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. **Hardcover**, 616 pag, 2004 (b).

STOREY, K. B. & STOREY, J. M. Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. **Physiol Rev** 97: 623–665, 2017.

STUART, S.N.; CHANSON, J.S.; COX, N.A.; YOUNG, B.E.; RODRIGUES, A.S.L.; FISCHMAN, D.L.; WALLER, R.W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, 306, 1783–1786, 2004.

STUART, S.; HOFFMAN, M.; CHANSON J.S.; COX, N.A.; BERRIDGE, R.J.; RAMANI, P.; YOUNG, B.E. Threatened Amphibians of the World; Lynx Edicions: Barcelona, Spain; **IUCN: Gland, Switzerland**; Conservation International: Arlington, VA, USA; ISBN 978-84-96553-41-5, 2008.

- SUZUKI, M.; SHIBATA, Y; OGUSHI, Y.; OKADA, R. Molecular machinery for vasotocin-dependent transepithelial water movement in amphibians: aquaporins and evolution. **Biol Bull** 229: 109 –119, 2015.
- THOMSON, K. S. The colonisation of land; origins and adaptations of terrestrial animals. **Science**, vol. 229, 1985, p. 549, 1985.
- TORRES, I. L. *et al.* Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Brazilian journal of medical and biological research**. 34(1):111–116, 2001.
- VALENZUELA-SÁNCHEZ, A.; CUNNINGHAM, A. A.; SOTO-AZAT, C. Geographic body size variation in ectotherms: effects of seasonality on an anuran from the southern temperate forest. **Frontiers in Zoology**, 12(1), 2015.
- VASCONCELOS, A. C. Patologia Geral em Hipertexto. **Universidade Federal de Minas Gerais**. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2000.
- VAN BEURDEN, E. K. Energy Metabolism of Dormant Australian Water-Holding Frogs (*Cyclorana platycephalus*). *Copeia*, 1980(4), 787, 1980.
- VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. **Analytical Biochemistry**. 11: 256-265, 1965.
- VAREJÃO-SILVA, M. A. Meteorologia e climatologia. Versão digital 2, Recife, **Brasil**. 2006.
- VOELKEL, S. Living Below Zero. Acessado em 04 de novembro de 2019: <https://vetsci.co.uk/2011/01/20/surviving_sub_zero/>. BIOL 445, **University of Liverpool**, 2010.
- VOET, D.; VOET, J.G. Biochemistry. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. 2011.
- WATFORD, M. Functional glycerol kinase activity and the possibility of a major role for glyceroneogenesis in mammalian skeletal muscle. **Nutr Rev**. 58(5):145-8. 2000.
- WELLS K.D. The social behaviour of anuran amphibians. **Anim. Behav**. 25(3):666–693, 1977.
- WELLS, K.D. The ecology and behavior of amphibians. Chicago: **University of Chicago Press**, 2007.
- WRENDENBERG, A, *et al.* Respiratory chain dysfunction in skeletal muscle does not cause insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**. 350(1):202-207, 2006.
- WONG, M. W.; MASTENBROEK, S.; REPPING, S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. **Fertility and Sterility**, Volume 102, Issue 1, July 2014, Pages 19-26, 2014.

APÊNDICE A – Manutenção de *B. pulchella* em cativeiro

INTRODUÇÃO

Padronizar a criação e/ou manutenção em cativeiro de um animal silvestre é importante quando o uso do mesmo em pesquisas faz-se necessário. Animais de uma mesma espécie coletados diretamente do habitat natural apresentam uma variabilidade entre eles visto que diferentes fatores externos, como disponibilidade de alimento, período reprodutivo, número de animais entre outros, interferem individualmente cada indivíduo. Além disso, esses animais podem apresentar diferenças metabólicas e fisiológicas ao longo do ano devido à variação dos fatores abióticos como temperatura e fotoperíodo.

Portanto, visto que até o momento não há registros para criação e/ou manutenção de *B. pulchella* em cativeiro, paralelamente a execução desse trabalho, foi desenvolvido um método para manutenção das mesmas a fim de verificar a viabilidade de *B. pulchella* ser mantida em cativeiro para utilização em futuros experimentos. Esse método de manutenção bem como os resultados metabólicos e morfológicos obtidos será descrito a seguir.

MÉTODO

Animais

Quatro animais foram coletados no inverno (n=2, 1 macho e 1 fêmea) e no verão (n=2, machos) em São Francisco de Paula (29°23'28.3"S 50°23'10.9"W) para o teste de manutenção em cativeiro. O método de coleta desses animais foi o mesmo descrito no tópico 3.1.2 dessa dissertação.

Alocação dos animais e período em cativeiro

Assim que chegaram ao laboratório, esses animais foram alocados no terrário para anfíbios. Como os animais são de períodos diferentes, a manutenção foi sempre em dupla (n=2) dentro do terrário. Para aclimação, eles permaneceram por 60 dias até realizada a eutanásia.

Local de instalação

Assim que os animais chegaram do campo, logo foram acondicionados em um terrário com as paredes de vidro (Largura: 70 cm; Altura 26 cm; Profundidade: 40 cm), com a superfície coberta por tela de arame (Diâmetro da malha: 0,5 cm) . Dentro do terrário foi montado um ambiente similar ao hábitat natural da espécie com solo forrado por pedra tipo seixo e coberto com terra preta. Uma parte do terrário (Tamanho: 30 cm x 25 cm; Profundidade: 3 cm) não foi colocado terra para construção de um depósito de água (**Figura 1**). Essa água depositada é essencial para manter a umidade e hidratação dos animais e deve ser sem cloro. Quanto aos vegetais, sugere-se o uso de plantas resistentes à umidade e com locais para refúgio entre as folhas para abrigo dos animais (Ex: Bromeliaceae). O uso de pedaços de madeira também se faz necessário para o enriquecimento ambiental.

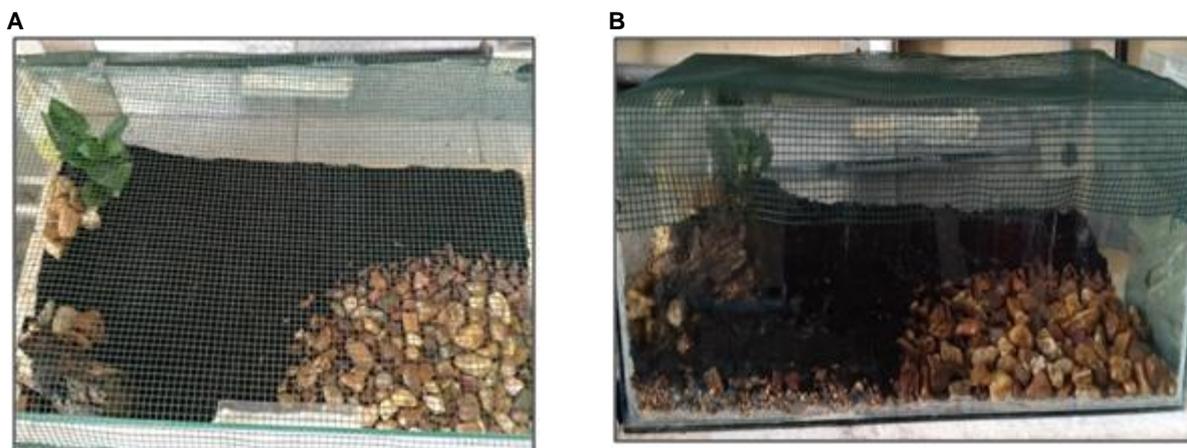


Figura 1. **A)** Vista aérea do terrário construído para o período de manutenção em cativeiro de *B. pulchella*. **B)** Vista lateral do terrário.

Condições ambientais

O terrário dos animais localizava-se em uma sala tipo biotério, sem outros animais presentes. O fotoperíodo era determinado pela luz solar natural e a temperatura controlada a 25°C.

Alimentação

Utilizou-se animais dos grupos Coleoptera (besouros e larvas), Hymenoptera e Araneae para a alimentação dos animais. O oferecimento de alimento ocorria de

duas a três vezes por semana. Essa alimentação ocorria oferecendo, com auxílio de uma pinça, as presas perto da boca do animal ou, se recusado, era depositado no terrário.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Todos os animais (n=4) submetidos ao regime de 60 dias dentro do cativeiro sobreviveram até o final do experimento. Assim que retirados do recinto, foi avaliado o peso, CRC e procedida à eutanásia.

Após a eutanásia, houve a coleta de sangue para dosagem de glicose, glicerol. As técnicas utilizadas para essas dosagens estão descritas nos materiais e métodos dessa dissertação.

Tanto o PCT quanto o CRC dos animais mantidos no cativeiro foram similares àqueles encontrados nos animais coletados em campo (**Tabela 1**). O PCT não apresentou diferença significativa entre o peso inicial (dia de entrada no terrário) e peso final (dia da eutanásia), indicando que não houve perda de peso durante os 60 dias de cativeiro (**Figura 2**).

Os parâmetros séricos avaliados e a concentração de glicogênio hepático também não diferiram entre os animais de cativeiro e os coletados durante as estações. O glicerol foi similar aos animais coletados durante o inverno (**Tabela 2**).

Tabela 1. Variações sobre os parâmetros PCT e CRC dos animais de cativeiro.

Parâmetros	Animais
PCT inicial (g)	3,47 ± 0,36
PCT final (g)	3,73 ± 0,45
CRC (cm)	4,15 ± 0,14

Os valores estão representados como média ± EPM, n= 4.

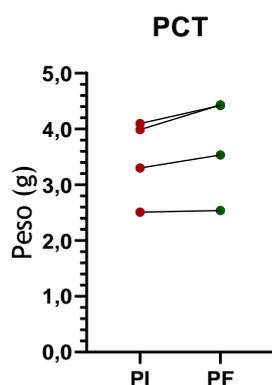


Figura 2. PCT dos animais mantidos em cativeiro. PI: Peso inicial. PF: Peso final. Não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos PI e PF quando realizado teste T pareado com teste de Wilcoxon para dados não paramétricos ($P \leq 0,05$).

Tabela 2. Variações sobre os parâmetros séricos dos animais de cativeiro.

Parâmetros	Animais
Glicose mmol/L	6,44 ± 2,05
Glicerol mmol/L	0,31 ± 0,01
Glicogênio mg/g	5,17 ± 2,51

Os valores estão representados como média ± EPM, n= 4 para glicose e glicogênio e n=2 para glicerol.

Assim ao final deste teste piloto podemos concluir que os animais submetidos ao regime de cativeiro nas condições descritas tiveram uma sobrevivência de 100%. Os parâmetros avaliados não diferiram dos animais coletados diretamente da natureza. Assim, concluímos que essa técnica para manutenção se mostra eficaz e útil para os próximos estudos.