

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

**TESE DE DOUTORADO**

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA PERERECA SUL-AMERICANA *BOANA PULCHELLA* DURANTE EXPOSIÇÃO A BAIXAS TEMPERATURAS, DESIDRATAÇÃO E ANÓXIA**

**MARJORIANE DE AMARAL**

Porto Alegre

2024

MARJORIANE DE AMARAL

**ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA PERERECA SUL-AMERICANA *BOANA PULCHELLA* DURANTE EXPOSIÇÃO A BAIXAS TEMPERATURAS, DESIDRATAÇÃO E ANÓXIA**

Tese de doutorado 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 Doutora em Fisiologia.

Orientador: Dr. Luiz Carlos Kucharski

Coorientador: Dr. Patrick Colombo

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

de Amaral, Marjoriane  
ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA PERERECA SUL-AMERICANA  
BOANA PULCHÉLLA DURANTE EXPOSIÇÃO A BAIXAS  
TEMPERATURAS, DESIDRATAÇÃO E ANÓXIA / Marjoriane de  
Amaral. -- 2024.  
180 f.  
Orientador: Luis Carlos Kucharski.  
  
Coorientador: Patrick Colombo.  
  
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2024.  
  
1. Fisiologia. 2. Anuros. 3. Metabolismo. 4.  
Exposição. 5. Ecofisiologia. I. Kucharski, Luis  
Carlos, orient. II. Colombo, Patrick, coorient. III.  
Titulo.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(s) autor(s).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Dr. Luiz Carlos Kucharski, pela parceria e orientação. Desde 2016, quando apareci na sala dele sugerindo um projeto sobre Ecofisiologia de anuros, ele me acolheu e me incentivou nessa jornada acadêmica. Obrigada pelos conselhos, incentivos e dedicação!

Ao meu coorientador, Patrick Colombo, obrigada por me introduzir nesse mundo maravilhoso dos anuros e pelos anos de parceria. Será para sempre meu 'Kô'.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, obrigada pelo financiamento, estrutura e formação acadêmica.

Aos meus colegas do LaMEC, meu muito obrigada pelos auxílios nas dosagens, finais de semana de experimento e correria com as pererecas. Vocês foram essenciais para a conclusão desse projeto. Agradeço também à técnica e às demais professoras do laboratório.

Aos companheiros e companheiras de campo, muito obrigada pelas inúmeras noites madrugadas adentro para a coleta das '*pulchellinhas*' (a maioria delas sem *pulchellas*, inclusive!). Obrigada por sempre estarem dispostos e auxiliarem na execução desse projeto.

Aos inúmeros pesquisadores e pesquisadoras incríveis que encontrei na vida acadêmica, meu muito obrigada. Se sou o que sou hoje é porque levo comigo um pouco de cada uma dessas pessoas que cruzaram meu caminho.

Aos meus amigos e amigas que compreenderam minhas ausências e sempre me incentivaram a continuar, muito obrigada!

Agradeço também à minha família e, principalmente, à minha mãe Marlouve, uma das minhas maiores incentivadoras! Mãe, agradeço a compreensão pelas ausências e pelas visitas cansadas e, principalmente, agradeço teu cuidado e teu amor incondicional!

Por fim, agradeço ao meu parceiro de vida José. José, palavras não são suficientes para descrever a tua importância (e da Lucy!) nessa jornada. Obrigada pela compreensão infinita nos dias difíceis e por sempre estar do meu lado me incentivando a continuar. Aqui ou cruzando o Atlântico, te amo sempre!

*'Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.*

*Now is the time to understand more, so that we may fear less.'*

(Marie Curie)

## RESUMO

Os anfíbios apresentam características importantes, como a ectotermia e um ciclo de vida com uma fase terrestre e outra aquática, que determinam sua distribuição. Viver em ambientes com grandes variações de temperatura ou com restrição hídrica requer modificações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas significativas para lidar com as flutuações nos parâmetros ambientais, como temperatura, oxigênio e umidade. Além disso, no contexto atual, em que as mudanças climáticas são uma realidade, esse grupo requer atenção especial devido à sua considerável vulnerabilidade diante das mudanças ambientais. Trabalhos anteriores já demonstraram que os anuros possuem alguns ajustes fisiológicos conservados dentro do grupo que os permitem sobreviver em ambientes estressores. Partindo da premissa de que os anfíbios têm capacidade de ajustar seus processos fisiológicos a mudanças ambientais, nossa hipótese é que a perereca subtropical *Boana pulchella* apresenta ajustes metabólicos específicos para lidar com temperaturas baixas, desidratação e anóxia. O objetivo desse trabalho, portanto, foi caracterizar quais são os ajustes metabólicos de *B. pulchella* frente a exposição experimental a temperaturas negativas, desidratação e anóxia. Experimentos foram conduzidos para expor *B. pulchella* a essas condições, seguidos de análises bioquímicas e enzimáticas no plasma e tecidos. Foram mensurados índices morfométricos, concentração de metabólitos no plasma e tecidos (ácido úrico, glicerol, glicose, lactato, ureia), balanço oxidativo, e vias relacionadas ao metabolismo da glicose como oxidação a CO<sub>2</sub>, glicogênese e gliconeogênese em diferentes condições experimentais. Os resultados revelaram mudanças metabólicas significativas em *Boana pulchella* que variaram dependendo do tipo de exposição. Durante exposição a temperaturas negativas, observou-se resiliência ao congelamento. Além disso, concentrações reduzidas de ureia e diminuição do

metabolismo de glicose hepática durante a temperaturas negativas podem indicar uma necessidade de níveis reduzidos de osmólitos em condições de frio e a conservação de energia durante esse período. Na desidratação, os resultados indicam que há uma estratégia de preservação de água tecidual através da glicogênese, evidenciada pelo aumento da síntese de glicogênio e, assim, estocar moléculas de água no tecido junto com esse glicogênio. O equilíbrio oxidativo também exibiu atividades tecido-específicas de enzimas antioxidantes. Durante a reidratação, a CAT no coração e no músculo, e SOD no músculo, parecem ser enzimas importantes para lidar com ROS e prevenir o estresse oxidativo mantendo os tecidos funcionais. Sugerimos, ainda, através dos nossos resultados, um papel importante do lactato como agente neuroprotetor quando exposto a desidratação e a anóxia, uma vez que seus níveis foram elevados. As respostas integradas, em conjunto com outras não analisadas, possivelmente auxiliam na sobrevivência desses animais em ambientes desafiadores uma vez que em todas as exposições os animais conseguiram se recuperar. Além disso, esses resultados auxiliam na descrição dos ajustes metabólicos que os anuros subtropicais apresentam quando expostos a estressores fomentando a literatura e a compreensão da fisiologia desse grupo de animais pouco estudados. Para avançar no entendimento das adaptações fisiológicas dos anfíbios, propõe-se explorar interações entre esses fatores estressores, análises detalhadas de metaboloma e atividades enzimáticas, bem como determinar a expressão de transportadores de glicose. Essas abordagens têm o potencial de fornecer uma compreensão mais profunda das adaptações fisiológicas dos anfíbios e informar estratégias de conservação diante das mudanças climáticas.



## ABSTRACT

Amphibians exhibit important characteristics, such as ectothermy and a life cycle with both terrestrial and aquatic phases, which determine their distribution. Living in environments with large temperature variations or water restriction requires significant behavioral, biochemical, and physiological modifications to cope with fluctuations in environmental parameters, such as temperature, oxygen, and humidity. Moreover, in the current context where climate change is a reality, this group requires special attention due to their considerable vulnerability to environmental changes. Previous studies have shown that anurans possess some physiological adjustments conserved within the group that allow them to survive in stressful environments. Based on the premise that amphibians could adjust their physiological processes to environmental changes, our hypothesis is that the subtropical tree frog *Boana pulchella* presents specific metabolic adjustments to cope with low temperatures, dehydration, and anoxia. Therefore, the objective of this study was to characterize the metabolic adjustments of *B. pulchella* in response to experimental exposure to negative temperatures, dehydration, and anoxia. Experiments were conducted to expose *B. pulchella* to these conditions, followed by biochemical and enzymatic analyses in plasma and tissues. Morphometric indices, metabolite concentrations in plasma and tissues (uric acid, glycerol, glucose, lactate, urea), oxidative balance, and pathways related to glucose metabolism such as CO<sub>2</sub> oxidation, glycogenesis, and gluconeogenesis were measured under different experimental conditions. The results revealed significant metabolic changes in *Boana pulchella* that varied depending on the type of exposure. During exposure to negative temperatures, resilience to freezing was observed. Additionally, reduced urea concentrations and decreased hepatic glucose metabolism during negative temperatures may indicate a need for reduced

osmolyte levels in cold conditions and energy conservation during this period. In dehydration, the results indicate a strategy of tissue water preservation through glycogenesis, evidenced by increased glycogen synthesis and thus storing water molecules in the tissue along with this glycogen. Oxidative balance also exhibited tissue-specific activities of antioxidant enzymes. During rehydration, CAT in the heart and muscle, and SOD in the muscle, appear to be important enzymes for dealing with ROS and preventing oxidative stress while maintaining functional tissues. Furthermore, through our results, we suggest an important role of lactate as a neuroprotective agent when exposed to dehydration and anoxia, as its levels were elevated. The integrated responses, along with other unanalyzed ones, possibly contribute to the survival of these animals in challenging environments since in all exposures the animals were able to recover. Additionally, these results assist in describing the metabolic adjustments that subtropical anurans present when exposed to stressors, fostering literature and understanding of the physiology of this understudied group of animals. To advance understanding of amphibian physiological adaptations, it is proposed to explore interactions between these stress factors, detailed metabolomic analyses, enzymatic activities, as well as determine the expression of glucose transporters. These approaches have the potential to provide a deeper understanding of amphibian physiological adaptations and inform conservation strategies in the face of climate change.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Mapa da riqueza de espécies de anuros no mundo.....	<b>2</b>
<b>Figura 2</b> Visão geral das adaptações a estressores ambientais em anfíbios.....	<b>4</b>
<b>Figura 3</b> Eventos fisiológicos e bioquímicos associados à mobilização de glicose.....	<b>10</b>
<b>Figura 4</b> Processos para retenção e reabsorção de água promovidos pelo hormônio arginina vasotocina (AVT) em anuros.....	<b>14</b>
<b>Figura 5</b> Abundância das enzimas envolvidas nas vias glicogenolíticas e glicolíticas durante o congelamento e a anóxia.....	<b>17</b>
<b>Figura 6</b> Mapa da distribuição da espécie <i>Boana pulchella</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 7</b> Indivíduos da espécie <i>Boana pulchella</i> .....	<b>21</b>
<b>Figura 8</b> Alojamento dos animais durante o período de aclimação e exposição do experimento de resfriamento.....	<b>30</b>
<b>Figura 9</b> Linha do tempo do protocolo experimental mostrando os diferentes grupos experimentais alimentação, resfriamento e recuperação, realizado de acordo com Do Amaral et al. (2018), Storey and Storey (2019), Al-attar et al. (2020), Zhang et al. (2021) e Varma and Storey (2023b).....	<b>31</b>
<b>Figura 10</b> Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, músculo, encéfalo, coração e rim) com as respectivas análises realizadas nos animais dos grupos aclimação, resfriamento e recuperação.....	<b>32</b>
<b>Figura 11</b> Alojamento dos animais durante o período de desidratação e reidratação no experimento de desidratação.....	<b>40</b>
<b>Figura 12</b> Linha do tempo do protocolo experimental de desidratação mostrando os grupos experimentais controle, desidratação e reidratação realizado de acordo com Churchill e Storey (1994), Wu et al. (2018), Storey e Storey (2019).....	<b>41</b>

<b>Figura 13</b> Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, músculo, encéfalo, coração e rim) com as respectivas análises realizadas nos animais dos grupos controle, desidratação e reidratação.....	<b>42</b>
<b>Figura 14</b> Alojamento dos animais durante o período de aclimação e anóxia.....	<b>48</b>
<b>Figura 15</b> Linha do tempo do protocolo experimental de desidratação mostrando os grupos experimentais controle, anóxia e recuperação de acordo com Al-Attar e Storey (2019), Storey e Storey (2019).....	<b>49</b>
<b>Figura 16</b> Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, músculo, encéfalo, coração) com as respectivas análises realizadas nos animais dos grupos controle, anóxia e recuperação.....	<b>50</b>
<b>Figura 17</b> Substratos plasmáticos de <i>Boana pulchella</i> nos grupos controle, anóxia e recuperação.....	<b>115</b>
<b>Figura 18</b> Gliconeogênese a partir de <sup>14</sup> C-lactato em <i>Boana pulchella</i> nos grupos controle, anóxia e recuperação.....	<b>116</b>
<b>Figura 19</b> Oxidação de <sup>14</sup> C-glicose a CO <sub>2</sub> e síntese de glicogênio a partir de <sup>14</sup> C-glicose em <i>Boana pulchella</i> nos grupos controle, anóxia e recuperação.....	<b>117</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AC:** Adenilato ciclase

**ADP:** Adenosina difosfato

**AQPs:** Canais de água aquaporinas

**ATP:** Adenosina trifosfato

**AVT:** Arginina vasotocina

**CAT:** Catalase

**CRC:** Comprimento rostro-cloacal

**CS:** Citrato sintase

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EWL:** *Evaporative water loss*

**FBPase:** Frutose-1,6-bifosfatase

**FBPase:** Frutose-1,6-bisfosfatase

**Fc:** Frequência cardíaca

**GAPDH:** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**GLUTs:** Transportadores de glicose

**GP:** Glicogênio fosforilase

**GS:** Glicogênio sintase

**GSK3 $\beta$ :** Glicogênio sintase quinase-3 $\beta$

**GST:** Glutathione S-transferase

**ICS:** Índice cardioossomático

**IHS:** Índice hepatossomático

**IUCN:** *International union for conservation of nature and natural resources*

**LC:** *Least concern*

**LDH:** Lactato desidrogenase

**MC:** Massa corporal

**NPO:** Núcleo pré-óptico

**PEPCK:** Fosfoenolpiruvato carboxicinase

**PEPCK-C:** Fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólica

**PFK:** Fosfofrutoquinase

**PFK-2:** Fosfofrutoquinase-2

**PGM:** Fosfoglicomutase

**PK:** Piruvato quinase

**PKA:** Proteína quinase A

**PN:** Pars nervosa

**ROS:** Espécies reativas de oxigênio

**SOD:** Superóxido dismutase

**TBARS:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TCA:** Ciclo do ácido tricarboxílico

**Vs:** Volume sistólico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Adaptações fisiológicas em anuros.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Adaptações fisiológicas a baixas temperaturas.....	5
1.1.1.1 Tolerância ao congelamento.....	7
1.1.2 Adaptações fisiológicas à desidratação.....	11
1.1.3 Adaptações fisiológicas à anóxia.....	16
<b>1.2 Modelo de estudo: <i>Boana pulchella</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>2 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Hipótese.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Objetivos.....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Objetivo geral.....	23
2.2.2 Objetivos específicos do experimento de exposição a temperaturas negativas.....	23
2.2.3 Objetivos específicos do experimento de exposição à desidratação.....	24
2.2.4 Objetivos específicos do experimento de exposição à anóxia.....	25
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Aspectos éticos, local e exequibilidade.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Animais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Exposição a temperaturas negativas.....</b>	<b>29</b>
3.3.1 Aclimação.....	29
3.3.2 Resfriamento e recuperação.....	29
3.3.3 Reflexo de endireitamento.....	29
3.3.4 Substratos plasmáticos.....	33
3.3.5 Substratos teciduais.....	33
3.3.6 Glicogênio tecidual.....	34
3.3.7 Oxidação de <sup>14</sup> C-glicose a CO <sub>2</sub> .....	35
3.3.8 Conversão da <sup>14</sup> C-glicose em glicogênio (glicogênese).....	35

3.3.9 Conversão de <sup>14</sup> C-[substrato] em glicose (gliconeogênese).....	36
<b>3.4 Exposição à desidratação.....</b>	<b>37</b>
3.4.1 Aclimação.....	37
3.4.2 Desidratação e reidratação.....	39
3.4.3 Parâmetros morfométricos.....	42
3.4.4 Balanço oxidativo.....	43
3.4.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	43
3.4.4.2 Superóxido dismutase.....	44
3.4.4.3 Catalase.....	44
3.4.4.4 Glutathione S-transferase.....	45
3.4.5 Substratos teciduais.....	45
3.4.6 Mensurações teciduais com utilização de isótopos <sup>14</sup> C.....	46
<b>3.5 Exposição à anóxia.....</b>	<b>46</b>
3.5.1 Aclimação.....	46
3.5.2 Anóxia e recuperação.....	47
3.5.3 Reflexo de endireitamento.....	50
3.5.4 Substratos plasmáticos.....	51
3.5.5 Mensurações teciduais com utilização de isótopos de <sup>14</sup> C.....	51
3.5.6 Balanço oxidativo.....	51
3.5.7 Substratos teciduais.....	52
<b>3.6 Análise estatística.....</b>	<b>52</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Artigo 1 (exposição a temperaturas negativas) .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2 Artigo 2 (exposição à desidratação).....</b>	<b>66</b>
<b>4.3 Artigo 3 (gliconeogênese durante exposição a temperaturas negativas e desidratação).....</b>	<b>104</b>
<b>4.4 Dados parciais do experimento de exposição à anóxia.....</b>	<b>114</b>

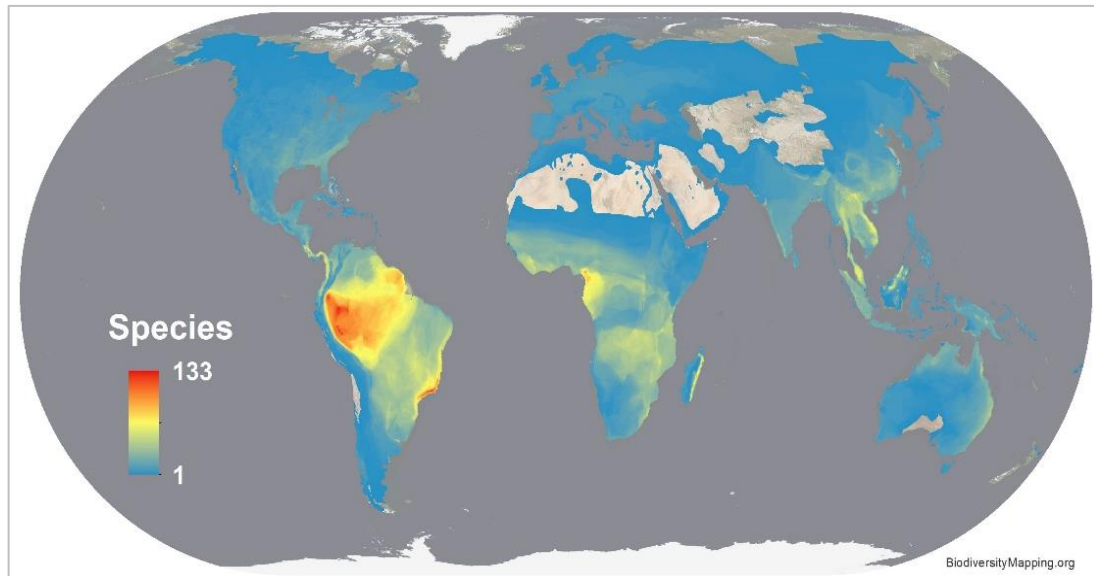


4.4.1 Parâmetros morfométricos.....	114
4.4.2 Substratos plasmáticos.....	115
4.4.3 Gliconeogênese a partir de <sup>14</sup> C-lactato.....	116
4.4.4 Oxidação de <sup>14</sup> C-glicose a CO <sub>2</sub> e síntese de glicogênio a partir de <sup>14</sup> C-glicose.....	117
<b>5 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>118</b>
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>132</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>160</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>161</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>162</b>
<b>ANEXO IV.....</b>	<b>163</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O termo "anfíbio" deriva do grego (amphi = duplo; bio = vida) e refere-se ao fato de que muitas espécies dessa classe possuem duas fases distintas de vida: uma fase larval aquática (girino), caracterizada pela respiração branquial; e uma fase terrestre, na qual o adulto possui respiração pulmonar e cutânea (Bernarde, 2012). Esta classe está subdividida em três ordens distintas: 1. Anura (sapos, rãs e pererecas); 2. Caudata (salamandras e tritões); 3. Apoda (cecílias e cobras-cegas; Pough, 2007). A ordem Anura é a ordem mais representativa dentro da classe dos anfíbios, contendo, atualmente, 7687 espécies das 8731 descritas para a classe (Frost, 2024).

Os anuros apresentam uma distribuição bem abrangente, demonstrando uma notável capacidade de colonizar com sucesso praticamente todos os habitats da Terra (Pimm et al., 2014), incluindo ambientes sazonalmente variados, ambientes xéricos, ambientes com baixas temperaturas e áreas montanhosas de grande altitude (Costanzo et al., 2013; Niu et al., 2022a; de Amaral et al., 2022). No entanto, os anuros tendem a se concentrar em regiões geográficas mais próximas ao Equador (figura 1), onde predomina regiões tropicais úmidas com chuvas regulares e poucas variações de temperatura (Duellman, 1989; Buckley e Jetz 2007; Wells, 2007; Jenkins et al., 2013; Pimm et al., 2014). Não é incomum, portanto, que a fauna brasileira de anuros seja a mais rica do mundo (SBH, 2024), pois o Brasil concentra biomas propícios para a colonização dessas espécies.



**Figura 1. Mapa da riqueza de espécies de anuros no mundo.** O gradiente de cores indica uma escala de menor (1; azul) a maior (133; vermelho) riqueza (Adaptado de Jenkins et al., 2013; Pimm et al., 2014).

Essa distribuição geográfica mais concentrada em zonas com pouca variação de temperatura e umidade dá-se ao fato de que esses dois fatores são determinantes para boa condição desses animais, influenciando todos os aspectos da biologia dos organismos (e.g. Feder e Burggren, 1992; Angilletta et al., 2004; Edwards et al., 2004; Hillman et al., 2008; Roufayel et al., 2011; Saeed et al., 2021). A temperatura, como fator ambiental primordial, influencia processos biológicos essenciais, como crescimento e reprodução (Angilletta, 2009). Essa influência significativa decorre do fato de que os anuros são animais ectotérmicos, ou seja, têm pouco controle interno sobre sua temperatura corporal, e poiquilotérmicos, pois a temperatura corporal muda em função da temperatura do ambiente ao seu redor (Sokolova, 2008; Lewbart, 2019). Essas características acabam refletindo em sua distribuição geográfica e na diversidade de habitats que ocupam (Navas, 1997; Angilletta et al., 2002; Guschina e Harwood, 2006).

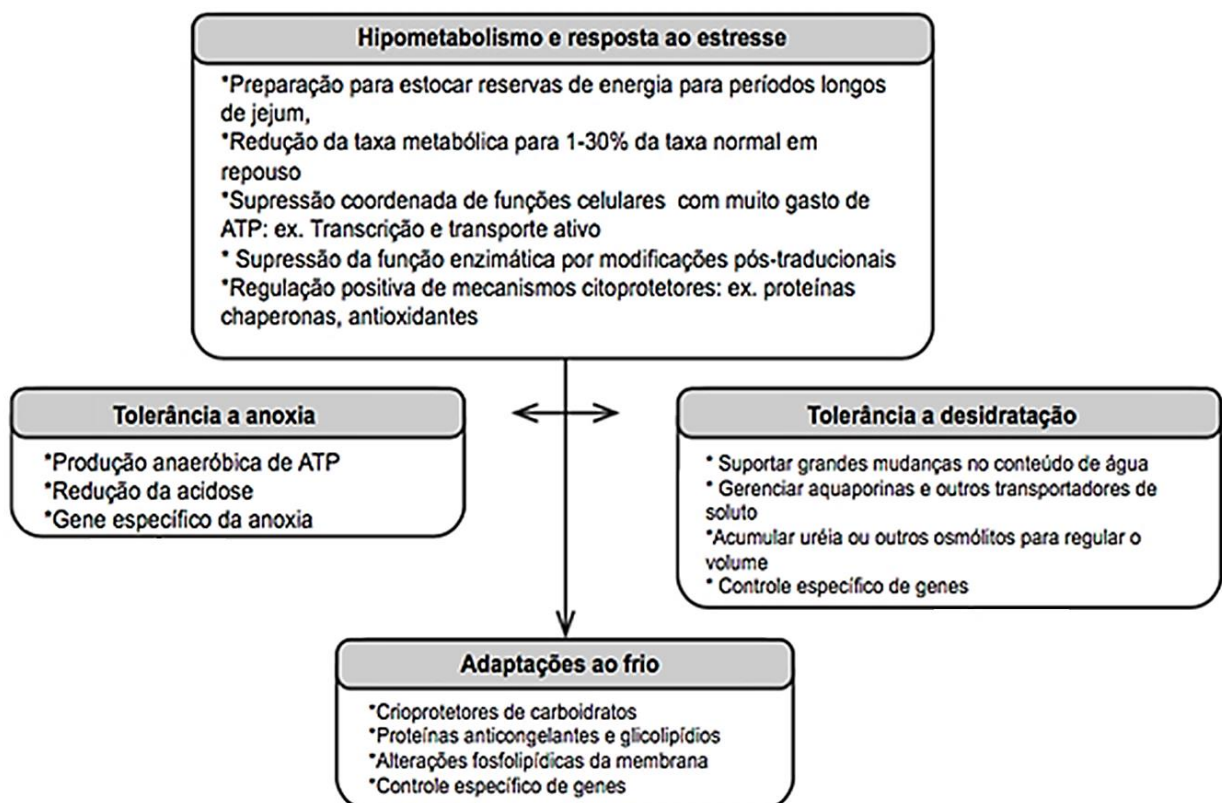
Além da temperatura, a umidade também desempenha um papel crítico no desempenho ecológico dos anuros, uma vez que a interação entre os regimes térmicos e a disponibilidade de água define os habitats adequados para essas espécies (Lillywhite e Navas, 2006). De modo geral, os anfíbios são dependentes da água e/ou umidade devido ao seu ciclo de vida que inclui uma parte aquática, a sua reprodução e a suas características anatômicas (Pough, 2007). A reprodução ocorre em poças, lagoas e riachos que são utilizados para desova e desenvolvimento larval (Duellman e Trueb, 1986). Os anuros possuem ovos sem casca, e essa característica torna os ovos suscetíveis a dessecação quando não hidratados (Duellman e Trueb, 1986; Duellman, 1989). Outro aspecto é referente a anatomia do tegumento. Esses animais possuem uma pele com pouca queratina e um estrato córneo estreito (Toledo e Jared, 1993), tornando-a altamente delgada, permeável à água e com uma alta susceptibilidade à perda de água por evaporação (EWL, do inglês *evaporative water loss*; Campbell et al., 2012; Tracy et al., 2014).

### **1.1 Adaptações fisiológicas em anuros**

Apesar da preferência a ambientes com temperaturas amenas e sem amplitudes e umidade regular, alguns anuros desenvolveram adaptações que possibilitaram a sua sobrevivência em ambientes frios (por exemplo, Storey e Storey, 1984), em grandes altitudes (por exemplo, Hutchison et al., 1976) e até mesmo em desertos (por exemplo, Van Beurden, 1980). Em contrapartida, a capacidade de sobreviver em ambientes não convencionais como esses requer modificações significativas do ponto de vista comportamental, bioquímico e fisiológico (Hillman et al., 2008). Essas adaptações são necessárias para lidar com as flutuações nos parâmetros ambientais, tais como variações de temperatura, oxigênio e umidade

(Churchill e Storey, 1996; Tattersall e Ultsch, 2008; Carvajalino-Fernández et al., 2011; Davenport, 2012; Dawson et al., 2018; Berman et al., 2019; Shekhovtsov et al., 2020; Reider et al., 2021; de Amaral et al., 2022; de Amaral et al., 2023).

A maioria dessas adaptações que ocorrem durante períodos de exposição a estressores ambientais parecem ter sido derivadas (e otimizadas) de outros recursos preexistentes encontrados nos anfíbios (Storey e Storey, 2017). Tolerância à anóxia, tolerância à desidratação e resistência ao frio parecem estar sobrepostas em uma base conservada tanto da resposta ao estresse quanto aos princípios comuns de depressão da taxa metabólica (hipometabolismo; Storey e Storey, 2017; figura 2). Essas adaptações multifacetadas revelam a notável plasticidade e capacidade de adaptação dos anuros a uma variedade de condições ambientais desafiadoras.



**Figura 2. Visão geral das adaptações a estressores ambientais em anfíbios.** A tolerância à anóxia, desidratação e ao frio parecem derivadas e otimizadas do hipometabolismo e da resposta ao estresse em anfíbios (Adaptado de Storey e Storey, 2017).

Tendo em mente essa base conservada do hipometabolismo e a derivação a outras adaptações fisiológicas frente a desidratação, a anóxia e ao frio em anuros, é necessário fomentar a literatura existente com estudos demonstrando quais são as alterações que ocorrem durante a exposição a esses fatores nesse grupo tão diverso que são os anuros. Ademais, em um mundo onde as mudanças climáticas já são uma realidade e os anuros é um dos grupos de animais mais vulneráveis a essas mudanças (Luedtke et al., 2023), a exposição a temperaturas adversas, baixa disponibilidade de água e de oxigênio são parâmetros particularmente importantes nesse contexto. Além de trazerem informações sobre a plasticidade de determinada espécie e descrever suas alterações metabólicas, os resultados desses estudos sobre as alterações fisiológicas em distintas condições abióticas podem ser aplicados a estudos com outros táxons e como ferramentas para conservação das espécies (Madliger et al., 2018).

### *1.1.1 Adaptações fisiológicas a baixas temperaturas*

Muitas espécies de anuros habitam locais que apresentam, ao longo do ano, episódios esporádicos de baixas temperaturas (e.g Carvajalino-Fernández et al., 2011; Rodríguez et al., 2019; Reider et al., 2021; Carvajalino-Fernández et al., 2021; de Amaral et al., 2022) ou temporadas duradouras de temperaturas negativas ( e.g. Storey e Storey, 1984; Voituron et al., 2003; Costanzo et al., 2013, 2014; Niu et al., 2021). As adaptações fisiológicas dos anuros terrestres a baixas temperaturas variam de espécie para espécie e são, majoritariamente, estudadas em espécies que habitam regiões de zonas temperadas do Canadá, Estados Unidos e Europa (Storey e Storey, 2017).

Mesmo em temperaturas baixas, algumas espécies de anuros são observadas em atividade, como por exemplo, *Anaxyrus boreas* a 3 °C (Brattstrom, 1963), *Incilius bocourti* a 3,5 ° C (Stuart, 1951) e *Boana pulchella* a 4 °C (de Amaral et al., 2022; comunicação pessoal, julho de 2022). A capacidade de continuar ativo em baixas temperatura traz o enfoque para os animais que vivem em regiões subtropicais, isso porque, nessas regiões, alguns anuros enfrentam variações nas temperaturas ambientais ao longo das estações (Haddad e Sazima 1992; Rossa-Ferres e Jim 1994; Bertoluci 1998; Kiss et al. 2009; Caldart et al. 2019). Essas espécies podem lidar com os efeitos das baixas temperaturas mantendo níveis de desempenho semelhantes por meio de ajustes fisiológicos (De Amaral et al., 2022; Kiss et al. 2009). A espécie subtropical *Boana prasina*, por exemplo, exibe atividade mais baixa da enzima citrato sintase (CS) hepática e cardíaca no inverno (Kiss et al. 2009). Já a perereca *B. pulchella* parece realizar um esforço para estocar glicose tecidual durante o outono para os meses de inverno (de Amaral et al., 2022).

Quando inativos, alguns organismos como os lagartos (Claussen et al., 1990; Costanzo et al., 1995; Burke et al., 2002) adotam uma estratégia para tolerar temperaturas abaixo do ponto de congelamento, reduzindo cuidadosamente a temperatura corporal abaixo desse ponto, em um processo chamado super-resfriamento. No entanto, os anfíbios têm uma capacidade limitada de super-resfriamento, geralmente em torno de -2 ou -3° C devido à permeabilidade da sua pele à água que facilita o início do congelamento (Storey e Storey, 1986, 1987; Swanson e Graves, 1995; Pinder et al., 1992). Portanto, em ambientes onde a temperatura ambiente cai abaixo do ponto de congelamento, os anfíbios têm apenas duas estratégias disponíveis: (1) buscar refúgios com temperaturas mais amenas para evitar o congelamento; e (2) tolerar o congelamento. A primeira estratégia é

comumente adotada por espécies que hibernam durante os meses frios de inverno, buscando se enterrar para se proteger do risco de congelamento. No entanto, em invernos particularmente rigorosos, essa estratégia pode não ser suficiente para garantir a sobrevivência dos animais (Petranka, 1979; Smith, 1969; Kuzmin, 1999). Portanto, para muitas espécies, tolerar o congelamento torna-se a única alternativa para garantir a sobrevivência.

#### *1.1.1.1 Tolerância ao congelamento*

Uma das estratégias mais fascinantes encontradas entre os anfíbios é a capacidade de tolerância ao congelamento, na qual uma diminuição na temperatura corporal leva ao congelamento interno dos fluidos sem prejudicar a sobrevivência do indivíduo (Hillman et al., 2008). A tolerância ao congelamento em anuros foi inicialmente relatada há mais de 40 anos, e desde então, tem havido uma série de estudos sobre o assunto (Schimid, 1982; Storey e Storey, 1984; Costanzo et al., 1993; Cai e Storey, 1997; Greenway e Storey, 2000; Larson et al., 2014; Rosendale et al., 2015; Aguilar et al., 2016; Hawkins et al., 2019; Storey e Storey, 2021; Shekhovtsov et al., 2023; Niu et al., 2023a; Varma e Storey, 2023a; de Amaral et al., 2024). Apesar das inúmeras publicações dentro do tópico, ainda há pouco conhecimento sobre a variação e a capacidade de tolerância ao congelamento entre populações congêneres (Costanzo et al., 2015), e, especialmente, em muitas espécies não estudadas, como aquelas que habitam regiões subtropicais e experenciam episódios esporádicos de temperaturas negativas (Carvajalino-Fernández, 2021; Reider et al., 2021).

Em regiões subtropicais, é sabido que alguns anfíbios de hábitos terrestres e noturnos estão expostos a baixas temperaturas, podendo até correr o risco de congelamento (Navas, 1996a; Navas, 2003; Carvajalino-Fernández et al., 2011; de



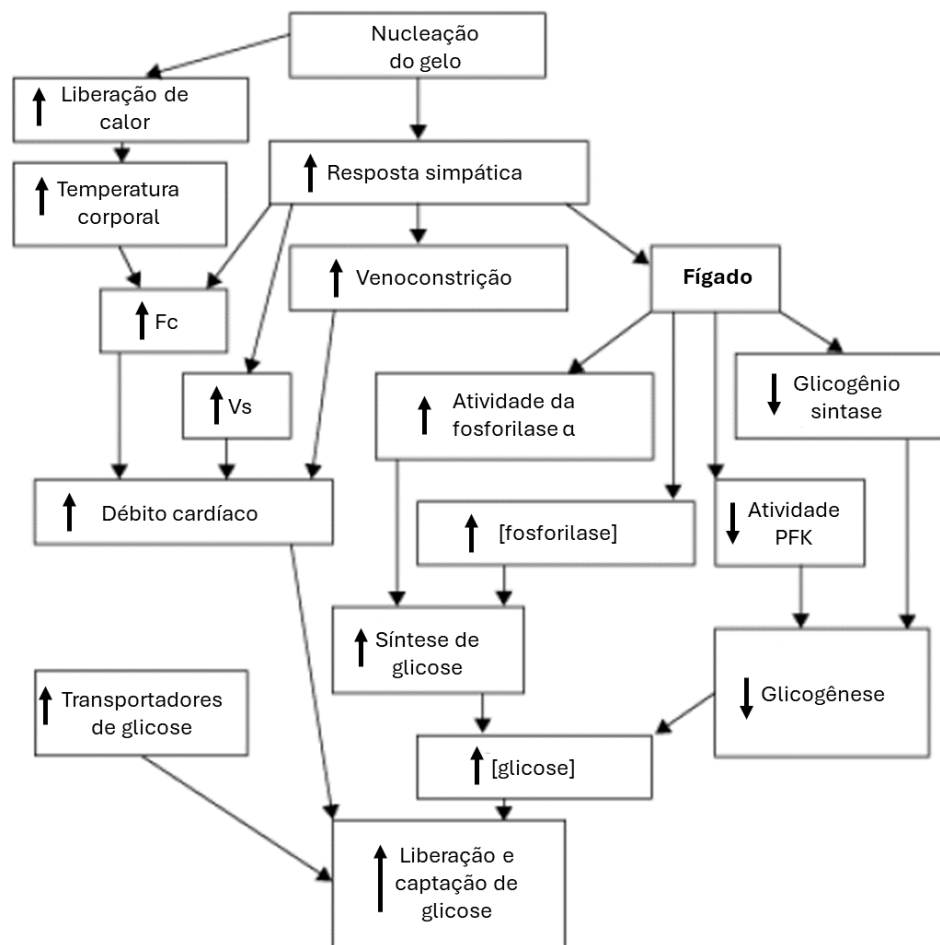
Amaral et al., 2022). Apesar dessas condições de frio extremo, esses anuros mantêm atividade ao longo do ano (Navas, 1996b; Navas, 1996c; Navas et al., 2008; Both et al., 2008), o que sugere que esses animais possuem algum tipo de proteção contínua contra as baixas temperaturas (Carvajalino-Fernández et al., 2011; Carvajalino-Fernández et al., 2021; Reider et al., 2021). No entanto, os estudos sobre tolerância a baixas temperaturas ainda se concentram em espécies do hemisfério norte (Storey e Storey, 2017), deixando uma lacuna na pesquisa em espécies subtropicais que enfrentam episódios esporádicos de temperaturas negativas.

A espécie de anuro subártico, *Lithobates sylvaticus* (Storey e Storey, 1984), foi extensivamente estudada para compreender a tolerância ao congelamento e os mecanismos fisiológicos subjacentes pois foi uma das primeiras espécies identificadas com essa adaptação. Essas rãs estão distribuídas desde o sul dos Montes Apalaches, nos Estados Unidos, até o Círculo Polar Ártico (Martof e Humphries, 1959) e podem congelar cerca de dois terços do conteúdo de água do seu corpo. Espécimes da América do Norte suportam temperaturas mínimas entre  $-3^{\circ}\text{C}$  e  $-6^{\circ}\text{C}$ , enquanto alguns espécimes do Ártico sobreviveram a testes experimentais a  $-16^{\circ}\text{C}$  (Costanzo et al., 2013).

Dentre os diversos mecanismos que permitem essa capacidade de congelamento, a produção de agentes crioprotetores é um deles (Storey e Storey, 2017). Em geral, os crioprotetores são divididos em coligativos e estabilizadores de membrana (ver Storey, 1997). Os crioprotetores coligativos estão em altas concentrações, levando a uma diminuição significativa no ponto de congelamento e ao aparecimento mínimo de gelo durante o congelamento. Os crioprotetores que têm efeito estabilizador de membrana, por sua vez, são geralmente encontrados em concentrações mais baixas e atuam impedindo a conversão da fase líquida em sólida

nas membranas celulares. Glicose, glicerol e ureia são alguns dos compostos considerados crioprotetores em anuros. Os crioprotetores agem, de maneira geral, controlando a taxa de formação de gelo extracelular, diminuindo os danos de dessecação causados pela cristalização do gelo nos tecidos, reduzindo o limite de extensão do volume celular e estabilizando a estrutura da membrana durante o congelamento (Storey e Storey, 1992; Storey e Storey, 1996).

A glicose é o agente crioprotetor mais estudado e mais descrito em anuros. *L. sylvaticus* tolerantes ao congelamento possuem seis vezes mais glicogênio no fígado e doze vezes mais atividade da enzima glicogênio fosforilase em comparação com a rã não tolerante ao congelamento *Rana pipens* (Mommensen e Storey, 1992), e é esse estoque de glicogênio que fornece uma rápida disponibilização de glicose para o período de congelamento. No início da formação de gelo, ocorre a fosforilação da glicogênio-fosforilase  $\beta$  em glicogênio-fosforilase  $\alpha$ , ativando a enzima (Storey et al., 1996). Essa enzima ativa catalisa a remoção de resíduos de glicose do glicogênio para formar glicose-1-fosfato que é convertida a glicose-6-fosfato e assim seguir para produção de glicose. A glicose mobilizada no fígado é, então, distribuída para outros órgãos do corpo via circulação sanguínea (Storey, 1987) e seu fluxo celular para fora e dentro das células é mantido por transportadores de glicose (GLUTs; Kling et al. 1994). Durante o período de congelamento, os níveis plasmáticos de glicose aumentam significativamente, variando entre 150 e 300 mM, enquanto em animais não expostos ao congelamento esses níveis variam entre 1 e 5 mM (Storey e Storey, 1986). Um esquema dos principais eventos fisiológicos e bioquímicos associados à mobilização de glicose durante um evento de congelamento pode ser visualizado na figura 3.



**Figura 3. Eventos fisiológicos e bioquímicos associados à mobilização de glicose.** Durante o congelamento, ocorrem respostas sincronizadas para disponibilizar crioprotetores para todos os órgãos. Fc: frequência cardíaca; Vs: volume sistólico; PFK: fosfofrutoquinase (Adaptado de Hillman et al., 2008).

Esse processo de mobilização não inicia até que o gelo comece a se formar, e como o gelo inicia essa cascata regulatória ainda não é compreendido. Porém, essa ativação parece ser mediada via sistema nervoso simpático, uma vez que pode ser interrompido com  $\beta$ -bloqueadores (Storey e Storey, 1996). A mediação via sistema nervoso simpático é consistente com a resposta geral ao estresse em anfíbios mediada por catecolaminas liberadas pelo sistema nervoso simpático (Hillman et al., 2008).

O mecanismo de acumular crioprotetores, obviamente, é uma das diversas estratégias necessárias para enfrentar um processo de congelamento e descongelamento. O organismo precisa adotar uma série integrada de respostas adaptativas para lidar com o estresse que essa exposição gera como hipóxia/anóxia, isquemia, desidratação, desequilíbrios osmóticos/iônicos, baixa temperatura, danos físicos pelo gelo, etc (Storey e Storey, 2017). Devido a isso, a tolerância ao congelamento integra vários elementos que desencadeiam a resposta ao estresse celular (Kültz, 2005). Os elementos principais da resposta incluem a estabilização de proteínas por chaperonas, defesas antioxidantes, regulação redox, reparo de danos ao DNA, controle sobre a síntese/degradação de proteínas e alterações em proteínas/enzimas envolvidas no metabolismo energético central (Cai et al., 1997; Wu et al., 2018; Do Amaral et al., 2020; Storey et al., 2021; Zhang et al., 2020; Zhang et al., 2021; Lung e Storey, 2022; Varma e Storey, 2023a).

Storey e Storey (2017) sugerem que essas adaptações, como já mencionado, derivam de outros recursos preexistentes encontrados nos anfíbios. Devido a isso, a tolerância ao congelamento pode ser associada com outros dois tipos de estresse que ocorrem durante esse período: desidratação e anóxia (Hawkins et al., 2019).

### *1.1.2 Adaptações fisiológicas à desidratação*

Os anfíbios, apesar de terem colonizado com sucesso diversos ambientes, apresentam uma pele altamente permeável à água, o que representa um desafio constante na manutenção do equilíbrio hídrico devido à alta taxa de evaporação nesse grupo de animais (Hillman et al., 2008). Essa suscetibilidade à perda de água por evaporação restringiu muitas espécies a ambientes aquáticos ou úmidos, mas outras desenvolveram mecanismos eficazes para reduzir a perda de água pela pele ou

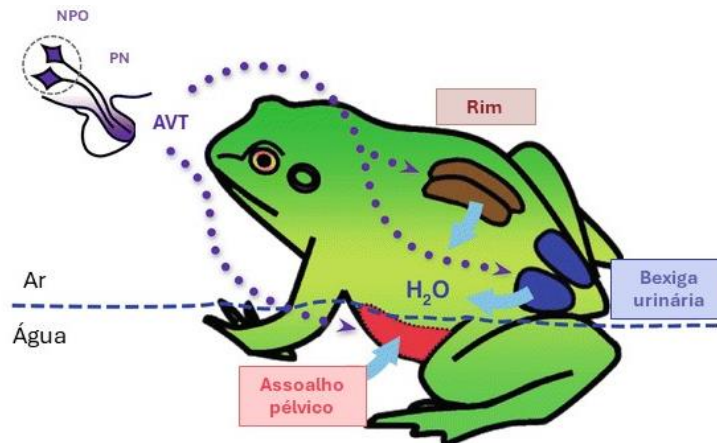
aumentar a captação cutânea de água (Hillman, 1980; Shoemaker, 1992). Para enfrentar esse desafio, os anfíbios regulam seu equilíbrio hídrico por meio de alterações anatômicas, comportamentais, fisiológicas e metabólicas visando maior tolerância à dessecação, maior tolerância térmica e menor perda cutânea de água (Bentley, 1966; Duellman e Trueb, 1986; Pinder et al. 1992; Toledo e Jared, 1993; McClanahan et al. 1994; Navas et al., 2004; Muir et al., 2007; Malik e Storey, 2009; Kiss et al., 2011; Varjão e Ribeiro, 2018).

As espécies que vivem em ambientes permanentemente ou sazonalmente secos podem estar durante os momentos de restrição hídrica (Navas e Carvalho, 2010). A estivação é um fenômeno semelhante à conhecida hibernação, só que causado pelo calor e a seca em vez do frio (Storey e Storey, 2012). Durante a estivação, o metabolismo do animal pode ser reduzido em 38 a 95%, dependendo da espécie e estágio de vida (Storey, 2000). As estratégias comportamentais para lidar com a restrição hídrica podem diminuir os desafios fisiológicos. Uma das estratégias mais adotadas pelos anuros estivadores é permanecer em buracos escavados até que as condições na superfície se tornem favoráveis (ex. Thompson et al. 2005; Cartledge et al. 2006). Esse comportamento reduz a taxa de perda de água por evaporação pois a umidade geralmente é alta no subsolo (Tyler et al. 1980; Roberts 1990).

Anatomicamente, os anuros terrestres possuem manchas pélvicas na derme altamente vascularizadas ao redor das áreas ventrais do estômago e da coxa (Benteley, 1966) que se mostraram áreas especializadas que melhoram a absorção de água (Roth 1973). Essa região pélvica (*seat patch*, em inglês) é extremamente importante para hidratação rápida, uma vez que os adultos anuros não bebem água pela boca (Bentley e Yorio, 1979; Ogushi et al., 2010). Quando em restrição hídrica,

os animais dependem de ajustes comportamentais e fisiológicas para otimizar a reabsorção de água pelo assoalho pélvico. A adaptação comportamental consiste em adotar posturas corporais de modo que essa região pélvica seja pressionada contra uma superfície úmida da qual a água pode ser absorvida (Heatwole et al., 1969). Além disso, fisiologicamente, há um controle das taxas de absorção de água pela liberação de hormônios antidiuréticos como a arginina vasotocina (AVT; Tracy e Rubink, 1978; Bentley, 1969; Cree, 1988; Hillman et al., 2008). A AVT é produzida nos neurônios neurosecretórios magnocelulares, localizados nos corpos celulares do núcleo pré-óptico (NPO) do hipotálamo (Vossel-Daeninck et al., 1981; Bentley, 1998). Quando o organismo está em restrição hídrica, a AVT é liberada de seus terminais axonais na pars nervosa (PN) da glândula hipófise (Suzuki e Tanaka, 2009). A liberação da AVT pode influenciar a permeabilidade do assoalho pélvico através de mudanças na condutância da pele (Tracy, 1976, 1982), mudanças no fluxo sanguíneo (Viborg e Hillyard, 2005; Willumsen et al., 2007) e o potencial hídrico do assoalho através de deslocamento de canais de água (AQPs) para região (Tracy e Rubink, 1978; Hasegawa et al., 2003; Hillman et al., 2008; Uchiyama e Konno, 2006; Suzuki et al., 2015). O hormônio AVT também aumenta a reabsorção de água através da urina armazenada na bexiga urinária, a reabsorção do fluido tubular nos rins e reduz a produção de urina (figura 4; Eggena 1987; Cree 1988; Suzuki et al., 2007). Outra adaptação que alguns anuros desenvolveram para evitar a perda de água corporal é proteger a pele e evitar a evaporação através de secreções cutâneas (Barbeau e Lillywhite, 2005). Algumas espécies do gênero sul-americano *Phyllomedusa* exibem um movimento complexo e estereotipado realizado com as quatro patas por toda superfície do corpo afim de distribuir a secreção de lipídios liberada por suas glândulas

mucosas cutâneas (Blaylock et al., 1976) em períodos de seca, promovendo assim, uma camada isolante que evita a perda de água por evaporação (Gomez et al., 2006).



**Figura 4. Processos para retenção e reabsorção de água promovidos pelo hormônio arginina vasotocina (AVT) em anuros.** Durante períodos de restrição hídrica, o AVT, produzido no núcleo pré-óptico (NPO) do hipotálamo, é liberado de seus terminais axonais na pars nervosa (PN) da glândula pituitária promovendo a reabsorção de água através do assoalho pélvico, bexiga urinária e rins (Adaptado de Finn e Cerdà, 2018).

Ademais, durante a restrição hídrica os órgãos podem não receber aporte de oxigênio suficiente devido a diminuição do fluxo sanguíneo (Navas e Carvalho, 2010). Diante disso, pode ocorrer um aumento na concentração de lactato sanguíneo indicando uma estimulação da produção de energia anaeróbica via glicólise nos tecidos (Hillman, 1978; Churchill e Storey, 1994, 1995). A desidratação severa também pode comprometer a bioenergética celular diminuindo, por exemplo, os níveis de adenosina trifosfato (ATP) e aumentando adenosina difosfato (ADP) no fígado (Churchill e Storey, 1994, 1995).

Outro ajuste é relativo ao acúmulo de solutos durante a desidratação, como a ureia. A acumulação de ureia em animais durante a estivação tem sido proposta como um mecanismo para reduzir a perda de água por evaporação (Storey, 2002). Durante

a estivação, ocorre um aumento gradual no catabolismo de proteínas à medida que a demanda por síntese de ureia aumenta, presumivelmente para auxiliar na retenção de água nos tecidos (Storey, 2002; Muir et al., 2007; Rosendale et al., 2012). Durante a estivação sazonal, os níveis de ureia podem atingir mais de 300 mM em sapos e rãs do deserto que passam muitos meses em estado de estivação (Hillman et al., 2008), enquanto níveis de até 90 mM foram registrados em *Lithobates sylvaticus* sob condições secas (Costanzo e Lee, 2005).

Além do período de desidratação, alguns ajustes metabólicos devem ser feitos para enfrentar também o período de reidratação, uma vez que a rápida introdução de água no organismo promove uma rápida perfusão tecidual e, conseqüentemente, uma rápida reoxigenação dos tecidos (Hermes-Lima et al., 2001). Devido a isso, é necessário que os organismos também estejam preparados para lidar com espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos oxidativos (Hermes-Lima e Storey, 1998; Bickler e Buck, 2007), onde um aumento na abundância de antioxidantes pode ajudar esses animais a suportarem o repentino influxo de oxigênio (Luu et al., 2021).

O que fica claro é que as estratégias e adaptações a períodos de restrição hídrica são diversas e muitas não foram abordadas nesse texto. No entanto, de forma geral, as conseqüências da desidratação são muito semelhantes àquelas observadas no congelamento, envolvendo a remoção de água intracelular, aumento da osmolalidade e diminuição do volume celular. Enquanto no congelamento esse estresse é causado pelo aprisionamento da água corporal em gelo extracelular, durante a desidratação o estresse resulta da perda líquida de água corporal (Churchill e Storey, 1994). Estudos realizados por Churchill e Storey (1993, 1994, 1995), por exemplo, observaram que a desidratação estimula os mesmos processos de glicogenólise hepática e hiperglicemia observados durante o congelamento. Essas



semelhanças reforçam a ideia de que os fatores fisiológicos e bioquímicos envolvidos na tolerância ao frio e à desidratação são compartilhados, sugerindo que esses animais, quando expostos a estressores abióticos, podem depender de respostas metabólicas e fisiológicas conservadas dentro do grupo.

### 1.1.3 Adaptações fisiológicas à anóxia

Viver em ambientes anóxicos e hipóxicos, embora incomum, parece ser uma habilidade desenvolvida pelo grupo dos anuros (Hillman et al., 2008; Storey e Storey, 2017). Alguns ranídeos, como *Rana temporária* e *Rana pipiens*, por exemplo, têm a capacidade de sobreviver por até 30 horas em condições de anóxia em baixas temperaturas (Christiansen e Penney, 1973; Stewart et al., 2004) e por cerca de 4-5 horas em temperatura ambiente (Lutz e Nulsson, 1997; Hermes-Lima e Storey, 1996; Knickerbocker e Lutz, 2001). Espécies que habitam locais de grandes altitudes, como a espécie do Planalto Tibetano *Nanorana parkeri*, consegue viver, constantemente, a ~4500 metros acima do nível do mar (Niu et al., 2020; Niu et al., 2022a). A rã siberiana *Rana amurensis*, por sua vez, é capaz de sobreviver por vários meses sob um conteúdo de oxigênio muito baixo, e o sapo *Pelobates vespertinus* hiberna sob solos com apenas 10% do conteúdo normal de oxigênio (Bulakhova, et al., 2023).

Sabe-se que a chave para a sobrevivência dos anuros em ambientes desprovidos de oxigênio está, provavelmente, relacionada à capacidade de reduzir a taxa metabólica, permitindo que os baixos níveis de fosforilação oxidativa atendam às demandas metabólicas de ATP, e o desenvolvimento de um sistema antioxidante poderoso para lidar com a superprodução pós-anóxica de ROS (Hermes-Lima e Zenteno-Savin, 2002; Bickler e Buck, 2007; Storey e Storey, 2017).

Para atender as demandas energéticas durante condições anóxicas, é necessário otimizar através a produção anaeróbica de ATP, o que é alcançado minimizando a formação de acidose e ativando a regulação gênica/proteica específica para anóxia (Yoldas e Erismis, 2021). Além disso, as tendências gerais dos padrões de fosforilação para enzimas relacionadas às vias glicogenolíticas e glicolíticas são semelhantes entre animais expostos à anóxia e ao congelamento (figura 5; Hawkins et al., 2019). No entanto, durante a anóxia, a glicose não é necessária como crioprotetor e pode ser completamente utilizada como energia. Os produtos da glicogenólise, portanto, podem prosseguir através da glicólise anaeróbica para sustentar a energia celular pelo maior tempo possível.

Enzima	Congelamento	Anoxia
GP	↓	↓
GS	↓	-
GSK3β	↑	↑
PGM	-	-
PFK-2	↑	-
FBPase	-	-
Aldolase	↑	↑
GAPDH	↓	-
PK	↓	↓

**Figura 5. Abundância das enzimas envolvidas nas vias glicogenolíticas e glicolíticas durante o congelamento e anóxia.** Resultados resumidos de mudanças significativas na abundância de fosfopeptídeos durante a exposição ao congelamento e à anóxia. As setas indicam a tendência geral em comparação com os animais controle. GP: glicogênio fosforilase; GS: glicogênio sintase; GSK3β: glicogênio sintase quinase-3β; PGM: fosfoglicomutase; PFK-2: fosfofrutoquinase-2; FBPase: Frutose-1,6-bifosfatase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PK: piruvato quinase (Adaptado de Hawkins et al., 2019).

A produção anaeróbica de ATP resulta num acúmulo de produtos glicolíticos que incluem lactato e alanina (Storey e Storey, 1984; Churchill e Storey, 1994;

Rosendale et al., 2014). O lactato promove um estado de desenvolvimento de acidose láctica associada à exposição prolongada à hipóxia (Wegener e Krause, 1993). Em situações de oxigênio limitado, foi sugerido que esse lactato possa ser utilizado, em anuros, na via gliconeogênica para produção de glicose (Donohoe e Boutilier, 1999). Os tecidos que possuem algum aporte de oxigênio podem captar e utilizar o lactato diretamente ou, esse lactato pode ser transportado para o fígado e convertido em glicose para tecidos dependentes de glicose, como o encéfalo. Ademais, principalmente em órgãos vitais como o encéfalo o lactato pode desempenhar um papel neuroprotetor em períodos de anóxia/hipóxia (Roumes et al., 2021).

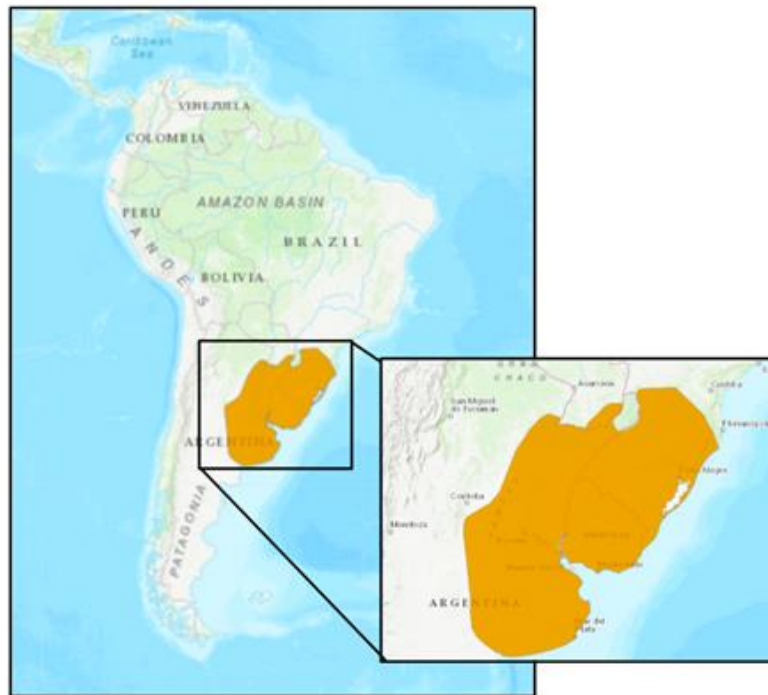
Além do período de restrição de oxigênio em si, um momento crítico dessa exposição é quando o oxigênio volta a estar disponível. Durante a recuperação após um período de restrição de oxigênio, a reintrodução do oxigênio muitas vezes resulta em uma explosão na produção de ROS, que pode causar danos às macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA (Lung e Storey, 2022). É importante, portanto, fornecer um aparato eficaz de defesas enzimáticas para lidar com as ROS. As defesas enzimáticas contra espécies reativas de oxigênio evoluíram em todos os organismos aeróbicos e várias enzimas atuam como linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio. A enzima superóxido dismutase (SOD) cataboliza o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A catalase (CAT), localizada nos peroxissomos, degrada o  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e  $O_2$ , e a glutathione S-transferase (GST) catalisa reações de detoxificação para lidar tanto com xenobióticos exógenos quanto com produtos endógenos, como aldeídos formados a partir de reações de peroxidação lipídica (Hermes-Lima et al., 2001). Quando expostos a anóxia, a resposta universal dos anuros, portanto, é aumentar a atividade dessas enzimas (Storey e Storey, 2017). A rã *Rana pipens* exposta a 30 horas de anóxia, por exemplo,

apresentou um aumento da atividade da CAT no músculo esquelético e no coração e da GST no encéfalo. Paralelamente, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um indicador clássico de peroxidação lipídica, não aumentaram no músculo e no fígado durante a anóxia e a reoxigenação, indicando um papel importante das enzimas na manutenção do balanço redox (Hermes-Lima e Storey., 1996).

O que fica claro, mais uma vez, é que muitos dos ajustes fisiológicos existentes durante a exposição à anóxia são semelhantes aos desenvolvidos quando os anuros são expostos a baixas temperaturas e/ou desidratação (Hermes-Lima e Zenteno-Savin, 2002; Gupta e Storey, 2020; Yoldas e Erismis, 2021; Storey et al., 2023). Portanto, identificar e mensurar as alterações do metabolismo durante a exposição a esses três estressores pode acrescentar importantes resultados para compreensão da capacidade de adaptação dentro do grupo dos anfíbios, identificar novas formas de ajustes metabólicos e fornecer ferramentas para conservação desses animais.

### **1.2 Modelo de estudo: *Boana pulchella***

A espécie *Boana pulchella* (Duméril e Bibron, 1841), comumente conhecida como perereca-do-banhado, é um anuro pertencente à família Hylidae que habita regiões localizadas no sul do Brasil, no Uruguai, no Paraguai e na Argentina (figura 6; Frost, 2021).



**Figura 6. Mapa da distribuição da perereca *Boana pulchella*.** A área de distribuição da espécie engloba regiões localizadas no sul do Brasil, no Uruguai, no Paraguai e na Argentina (polígono alaranjado; adaptado de Kwet. al, 2004).

Nestes locais, *B. pulchella* pode ser encontrada vocalizando em diversos habitats naturais, incluindo florestas e pastagens secas de baixada e savanas (figura 7; Kwet et al., 2004). Atualmente, nessas áreas, observa-se um avanço das atividades agrícolas, transformando o habitat e secando poças onde ocorrem sua reprodução (Brodeur et al., 2012; Larramendy e Soloneski, 2017). Além da degradação do habitat envolvendo a agricultura, *B. pulchella* habita áreas sob a influência do fenômeno climático La Niña, que causa secas prolongadas em toda a região onde vive essa espécie (Puchalski, 2000; Fontana e Berlato, 2003; Gross e Cassol, 2015).

De hábitos arborícolas, ela é normalmente encontrada empoleirada na vegetação e possui um polimorfismo de coloração (dicromatismo) que pode variar do marrom escuro até um verde intenso (figura 7; Duellman e Trueb, 1986; Kwet e Di-Bernardo, 1999). O saco vocal dos machos é amarelado ou alaranjado, tornando-se

bastante chamativo quando os indivíduos estão vocalmente ativos. O comprimento rostro-cloacal (CRC) dos adultos varia entre 33 e 45 mm nos machos e entre 38 e 50 mm nas fêmeas (Kwet e Di-Bernardo, 1999). De acordo com a *International union for conservation of nature and natural resources* (IUCN), seu *status* de conservação é classificado como pouco preocupante (LC, do inglês *Least concern*; Kwet et al., 2004), o que representa o menor nível de risco de extinção.



**Figura 7. Indivíduos da espécie *Boana pulchella*.** Dois representantes da perereca do banhado empoleirados na vegetação, um dos indivíduos apresenta a coloração verde e o outro marrom, características dessa espécie (Foto de Natália Dallagnol Vargas).

Apesar de ser uma espécie subtropical, *B. pulchella* vive em regiões do Sul da América do Sul onde ocorrem temperaturas negativas e possibilidade de geada durante os meses de inverno (Duarte et al., 2006; Both et al., 2009). Além disso, ela permanece ativa e reproduzindo-se durante a temporada de inverno (Both et al., 2008; Canavero et al., 2008; Maneyro, 2008; Ximenez e Tozetti, 2015), demonstrando uma capacidade de lidar com as variações abióticas sazonais. Estudos anteriores

demonstraram que essa espécie exibe mudanças metabólicas durante o ano, com os níveis plasmáticos de glicose oscilando, sendo maiores no inverno e na primavera do que no outono (De Amaral et al., 2022). Adicionalmente, a taxa de uso de glicose para oxidação sofre uma regulação sazonal, sendo maior no verão do que na primavera. Estas alterações, juntamente com a observação de que os estoques de glicogênio hepático permanecem inalterados, sugerem que há uma regulação antecipatória da síntese e mobilização de substratos energéticos para sustentar o metabolismo no inverno, bem como uma regulação sazonal para manutenção de uma homeostase do metabolismo da glicose no fígado (de Amaral et al., 2022).

Dessa forma, diante das diversas alterações e ajustes apresentados pelos anuros durante situações de baixas temperaturas, desidratação e anóxia fica claro que esse grupo de animais devem ser largamente estudados para elucidar melhor as estratégias já descritas na literatura e outras que ainda não foram identificadas. Ademais, dada a vasta diversidade de espécies presentes em praticamente todos os habitats do planeta e os modos de vida extremamente diversificados, é praticamente inegável que os anfíbios representam um grupo ainda pouco explorado (Bovo, 2015). Portanto, diante dessas informações já documentadas na literatura sobre os hábitos de vida de *B. pulchella*, os ajustes sazonais de metabólitos nessa espécie (de Amaral et al., 2022), aos poucos dados disponíveis na literatura sobre esses aspectos em espécies sul-americanas (Carvajalino-Fernandez et al., 2021; Reider et al., 2021) e sobre o compartilhamento de estratégias e ajustes fisiológicos que são derivados e otimizados de uma base conservada de adaptação dentro do grupo dos anuros (Storey e Storey, 2017), torna-se imperativo realizar pesquisas para avaliar a capacidade e as alterações fisiológicas que essa espécie enfrenta pela exposição a diferentes estressores abióticos.

## 2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

### 2.1 Hipótese

Espécies sul-americanas de anuros, como a *Boana pulchella*, possuem mecanismos fisiológicos de sobrevivência em ambientes desafiadores que envolvem baixas temperaturas, restrição de oxigênio e restrição hídrica. Esses mecanismos fisiológicos podem estar associados a alteração das concentrações e uso dos metabólitos energéticos, nas vias de armazenamento e disponibilidade desses substratos bem como em defesas do organismo, como nas enzimas associadas com o balanço oxidativo. Essas adaptações, portanto, provavelmente são essenciais para a sobrevivência dessas espécies em ambientes com estressores ambientais.

### 2.2 Objetivos

#### 2.2.1 Objetivo geral

Essa Tese tem como objetivo geral realizar a caracterização das estratégias metabólicas adaptativas durante a exposição a temperaturas negativas, desidratação e anóxia na espécie *Boana pulchella*. A partir das informações obtidas, espera-se fornecer informações detalhadas sobre as respostas metabólicas e fisiológicas desse anuro Sul-Americano a situações desafiadoras, contribuindo para uma compreensão mais profunda das adaptações que permitem sua sobrevivência em ambientes adversos e descrevendo novos dados para complementar a literatura existente.

#### 2.2.2 Objetivos específicos do experimento de exposição a temperaturas negativas

O objetivo desse experimento foi realizar a exposição de indivíduos de *B. pulchella* a temperaturas negativas durante 24 horas e após a exposição a um período de



recuperação em temperatura de aclimatação, comparando os resultados obtidos entre os grupos amostrados (aclimatação, resfriamento e recuperação), realizando:

- Determinação do reflexo de endireitamento dos animais nos diferentes grupos;
- Determinação dos índices morfométricos dos animais e do tecido cardíaco e hepático;
- Mensuração dos níveis plasmáticos de ácido úrico, glicerol, glicose, lactato e ureia;
- Mensuração da concentração de glicogênio no coração, encéfalo, fígado e músculo;
- Análise da concentração de ácido úrico, glicerol, glicose, lactato, proteínas totais, triglicerídeos e ureia no coração, encéfalo, fígado e músculo;
- Mensuração da oxidação da glicose e da síntese de glicogênio no fígado e músculo;
- Avaliação da atividade gliconeogênica no fígado, músculo e rins, por meio da análise dos precursores lactato, glicerol, alanina e glutamina;

### 2.2.3 *Objetivos específicos do experimento de exposição à desidratação*

O objetivo desse experimento foi submeter os indivíduos de *B. pulchella* a uma perda de 40% da água corporal total, simulando uma situação de desidratação, e após um período de recuperação de 24 horas sem restrição hídrica. Ao final, objetivou-se analisar e comparar os resultados obtidos entre os grupos amostrados (controle, desidratação e reidratação), realizando:

- Determinação dos índices morfométricos dos animais e do tecido cardíaco e hepático;

- Determinação do conteúdo de água do tecido muscular;
- Mensuração da concentração de glicogênio do coração, encéfalo, fígado e músculo;
- Determinação da concentração de lactato, proteínas totais e ureia do coração, encéfalo, fígado e músculo;
- Mensuração da oxidação da glicose e da síntese de glicogênio no fígado e músculo;
- Avaliação da atividade gliconeogênica no fígado, músculo e rins, por meio da análise dos precursores lactato, glicerol, alanina e glutamina;
- Balanço oxidativo do coração, encéfalo e músculo através da mensuração da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT), e no músculo das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione-S-transferase (GST) e também a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

#### *2.2.4 Objetivos específicos do experimento de exposição à anóxia*

O objetivo desse experimento foi realizar a exposição dos indivíduos de *B. pulchella* a um ambiente anóxico (0% de O<sub>2</sub>) por 30 minutos e a um período de recuperação da anóxia por 4 horas. Após, foi realizada a comparação dos resultados obtidos entre os grupos amostrados (controle, anóxia e recuperação), através da:

- Determinação dos índices morfométricos dos animais e do tecido cardíaco e hepático;
- Mensuração da concentração de glicogênio do coração, encéfalo, fígado e músculo;
- Determinação da concentração de lactato e ureia plasmáticos;

- Determinação da concentração de lactato, proteínas totais e ureia do coração, encéfalo, fígado e músculo;
- Mensuração da oxidação da glicose e da síntese de glicogênio no fígado e músculo;
- Avaliação da atividade gliconeogênica no fígado, músculo e encéfalo, por meio da análise do precursor lactato;
- Balanço oxidativo do coração, encéfalo, fígado e músculo através da mensuração da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) e através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### **3.1 Aspectos éticos, local e exequibilidade**

As técnicas descritas a seguir foram realizadas em laboratórios da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Todos os experimentos envolvendo animais e as dosagens dos substratos e das técnicas com radioativos foram realizados na UFRGS, no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) do Departamento de Fisiologia (UFRGS). Já a mensuração dos parâmetros relacionados ao balanço oxidativo foram realizados no Laboratório da Fisiologia da Conservação da PUCRS.

Os procedimentos deste estudo seguem as diretrizes da Lei Arouca (Lei n. 11.794, 2008), a qual estabelece normas para o uso científico de animais, bem como os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Ademais, a coleta dos animais utilizados neste projeto foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), com autorização obtida através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio), sob o número **75475-6** (anexo I). O projeto e seu delineamento experimental foram aprovados pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, registrados no sistema dessa universidade sob o número **39416** (anexo II). Os responsáveis pelo manejo dos animais passaram por treinamento prévio e possuem experiência com o protocolo experimental e a prática de eutanásia.

### 3.2 Animais

Todos os animais utilizados nos experimentos descritos nessa tese são anfíbios anuros, pertencente à família Hylidae da espécie *Boana pulchella* (CRC:  $\pm 4$  cm; peso corporal:  $\pm 3$  g), machos (identificados pela presença de saco vocal), adultos (vocalizando), provenientes da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - EEA/UFRGS (30°06'02.9"S 51°40'35.0"O) ou da cidade de São José dos Ausentes (28°36'09.7"S 49°51'21.0"O), ambos sítios localizados no estado do Rio Grande do Sul, no Brasil. Esses animais foram coletados em pelo menos três expedições (uma a cada experimento), durante o período da noite (entre 21h e 2h), pelo método de busca ativa auditiva. Este método envolve permanecer em um local pré-determinado onde a espécie de interesse ocorre naturalmente e, ao ouvir a vocalização do anuro (chamado), iniciar a busca para capturá-lo (Heyer et al., 2014). Quando o animal é avistado, a captura é realizada através de uma aproximação cuidadosa e um movimento rápido da mão para pegar o animal, segurando-o com firmeza, mas sem apertá-lo. Após a captura, os animais são imediatamente transferidos para um saco de coleta com substratos e água do local. 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. Após coletados, em um período de máximo 10 horas, os animais foram imediatamente encaminhados para o laboratório de anfíbios do Museu de Ciências Naturais da Divisão de Pesquisa e Manutenção de Coleções Científicas do DBIO/SEMA (MCN/SEMA), local com autorização para uso e manejo de fauna silvestre, conforme AUTUFS nº **00078/2019** (anexo III). Para realização do protocolo experimental, os animais foram encaminhados para o

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### **3.3 Exposição a temperaturas negativas**

#### **3.3.1 Aclimação**

Dezoito animais (n=18) foram coletados na EEA/UFRGS durante o final do outono de 2022. A faixa de temperatura durante o mês de coleta, registrada pela estação meteorológica EEA-UFRGS, foi de 7 a 27 °C (Datum SIRGAS2000). Assim que chegaram no LaMEC, os animais receberam um banho de tetraciclina 0,05% por cinco minutos. Após, eles foram imediatamente submetidos a um período de aclimação de 2 semanas em caixas plásticas ventiladas (6 animais por caixa de 19 x 26 x 12 cm) com musgo esfagno, papel toalha úmido e potes de água. As caixas foram colocadas dentro de uma incubadora refrigerada (Incubadora FOC 225E, VELP SCIENTIFICA®; termostato TC-900e POWER, Full Gauge Controls®; figura 8) com a temperatura mantida a 5°C e um ciclo de luz de 10 horas de luz para 14 horas de escuridão (simulando um período de inverno). Essa incubadora possuía um sistema que circulava constantemente o ar para manter uma temperatura adequada em toda a incubadora, eliminando pontos quentes e frios fora da temperatura definida. A temperatura dentro das caixas foi verificada com um termopar tipo "K" (EZA TP-01) com um bulbo seco conectado a um termômetro digital tipo TM-902c para garantir que não ocorressem gradientes de temperatura entre a incubadora e o interior das caixas. Durante as duas semanas de aclimação, era borrifada água desclorada todos os dias e os animais alimentados duas vezes por semana com larvas de tenébrio e pequenos besouros. O grupo de animais aclimatados (n=6) foi amostrado aleatoriamente desta condição após duas semanas de aclimação a 5 °C.

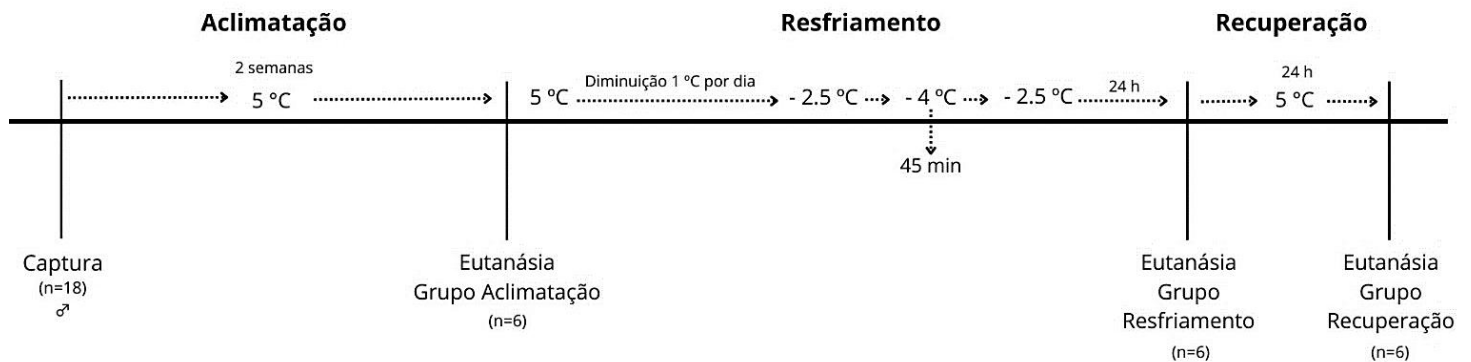


**Figura 8. Alojamento dos animais durante o período de aclimação e exposição do experimento de resfriamento.** Os animais foram acondicionados em caixas e alocados dentro de uma incubadora refrigerada com controle de luz e temperatura **(A)**. Seis animais foram acondicionados em cada caixa onde continha musgo, papel umedecido e pote com água desclorada **(B)**.

### 3.3.2 Resfriamento e recuperação

Após o período de aclimação, quando foram retirados os animais do grupo aclimatados, os demais animais foram mantidos nas caixas e a temperatura da incubadora foi gradualmente reduzida em uma taxa de  $1 \pm 0,5$  °C a cada 24 horas. Quando a temperatura atingiu  $-2,5$ °C, abaixamos a temperatura da incubadora para  $-4$ °C e mantivemos por 45 minutos, pois conforme os protocolos descritos na literatura esse tempo a  $-4$ °C é necessário para a indução da temperatura corporal dos animais abaixo de zero. Após 45 minutos, a temperatura foi elevada para  $-2,5$ °C e assim mantida por 24 horas. Após esse período, um grupo de animais ( $n=6$ ) foi selecionado aleatoriamente e representaram o grupo dos animais resfriados. Os animais restantes ( $n=6$ ) foram mantidos por 24 horas a uma temperatura de aclimação de  $5$ °C, representando o grupo de animais recuperados. Este protocolo seguiu os protocolos

estabelecidos por Do Amaral et al. (2018), Storey and Storey (2019), Al-attar et al. (2020), Zhang et al. (2021) e Varma and Storey (2023b) e está representando na figura 9.



**Figura 9. Linha do tempo do protocolo experimental mostrando os diferentes grupos experimentais alimentação, resfriamento e recuperação, realizado de acordo com Do Amaral et al. (2018), Storey and Storey (2019), Al-attar et al. (2020), Zhang et al. (2021) e Varma and Storey (2023b).** *Boana pulchella* (n = 18) foram coletadas no sul do Rio Grande do Sul. Após a captura, os animais foram levados ao laboratório e iniciou-se um período de aclimação de duas semanas a 5°C. Após duas semanas, seis animais foram selecionados aleatoriamente (grupo aclimação). Os animais restantes foram expostos a uma diminuição gradual da temperatura (1 °C por dia) até atingirem -2,5°C. Em seguida, foram expostos a -4°C por 45 minutos e após, expostos novamente a -2,5°C por 24 horas. Após 24 horas, seis animais foram eutanasiados (grupo de resfriamento). Os animais restantes foram expostos a 5°C por 24 horas para se recuperarem à temperatura de aclimação e foram eutanasiados (grupo de recuperação).

Todos os animais, pertencentes aos grupos de aclimação, resfriamento e recuperação, foram submetidos à avaliação de sua massa corporal (MC; em gramas; balança analítica BEL<sup>®</sup>, modelo Mark M214A) e comprimento rostro-cloacal (CRC; em centímetros). Após, os animais foram eutanasiados com creme de lidocaína a 5%, aplicado no abdômen, região inguinal e cavidade oral. A coleta de sangue foi realizada com seringas heparinizadas através de punção cardíaca. Os indivíduos foram então rapidamente dissecados sobre gelo, e foram removidos o fígado, o coração, o encéfalo, o rim e os músculos das patas posteriores. O peso do fígado e do coração



foi registrado, e o índice hepatossomático (IHS) e o índice cardiossomático (ICS) foram calculados usando a seguinte equação:  $IHS \text{ ou } ICS = \left( \frac{\text{peso do tecido (g)}}{\text{massa corporal (g)}} \right) \times 100$ .

As amostras de fígado, músculo, coração, encéfalo, rim e plasma foram imediatamente utilizadas nas técnicas de avaliação metabólica ou armazenadas a -80°C até o momento da utilização nas técnicas bioquímicas. O resumo dos parâmetros avaliados em cada tecido pode ser observado na figura 10.



**Figura 10. Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, músculo, encéfalo, coração e rim) com as respectivas análises realizadas nos animais dos grupos aclimatação, resfriamento e recuperação.**

### 3.3.3 Reflexo de endireitamento

Antes da eutanásia, todos animais foram submetidos a um teste de reflexo de endireitamento. Esse teste avalia a capacidade do animal de voltar à posição normal quando colocado de costas (Goulet et al., 2010). O retorno imediato à posição normal é considerado um sucesso. O teste foi encerrado se o anuro permanecesse de costas por 10 segundos (Harvey et al., 1976). Essa avaliação verificou a capacidade de resposta dos anuros durante a exposição ao resfriamento. Os resultados desses

testes foram gravados, e a análise de dados quantificou o tempo necessário para o reflexo, medido em milissegundos (ms).

#### 3.3.4 *Substratos plasmáticos*

O sangue foi centrifugado a 4 °C e a 5000×g por 10 minutos para isolar o plasma. Este plasma foi transferido e centrifugado a 5000×g por 5 minutos, resultando em aproximadamente 15 µL de plasma (de Amaral et al., 2022). Kits enzimáticos comerciais determinaram os níveis de glicose (Id-Nº:133, LABTEST Diagnóstica®, Brasil), lactato (Id-Nº:138, LABTEST Diagnóstica®, Brasil), glicerol (Id-Nº:5360, R-Biopharm AG, Alemanha), ureia (Id-Nº: 27, LABTEST Diagnóstica®, Brasil) e ácido úrico (Id-Nº: 140, LABTEST Diagnóstica®, Brasil) no plasma. As medições foram realizadas utilizando um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, Reino Unido) em absorbâncias específicas, calibradas com os padrões dos kits, e relatadas em milimoles por litro de plasma (mmol/L).

#### 3.3.5 *Substratos teciduais*

Os substratos teciduais, incluindo glicerol, lactato, proteínas totais, ureia e triglicerídeos, foram determinados homogeneizando amostras de fígado ( $\pm$  6 mg), músculo ( $\pm$  8 mg), coração ( $\pm$  10 mg) e encéfalo ( $\pm$  20 mg) em 400 µl de tampão específico (114 mM de NaCl, 2,25 mM de KCl, 0,44 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,33 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 13 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM de HEPES, µl: ml de coquetel inibidor de protease - Sigma-Aldrich®, 10 µl: ml de PMSF - Sigma-Aldrich®; pH 7,63). Da mistura homogeneizada, 100 µl foram centrifugados a 2000×g por 10 minutos a 4 °C, enquanto os restantes 300 µl passaram por centrifugação a 20.000×g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi designado para determinação de

glicogênio (de Amaral et al., 2022; adaptado). Após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para avaliação da concentração de substratos por meio de kits enzimáticos comerciais (semelhante ao descrito acima), e as medições foram realizadas utilizando um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Reino Unido). Curvas de calibração baseadas em padrões dos kits determinaram as concentrações, relatadas em miligramas por grama de tecido (mg/g).

### 3.3.6 Glicogênio tecidual

O conteúdo de glicogênio foi determinado seguindo os protocolos de Van Handel (1965) e de Amaral et al. (2022, adaptado). Em frascos com o precipitado da homogeneização descrito na Seção 3.3.5, adicionou-se KOH a 30% e ferveu-se por 60 minutos a 100 °C. Posteriormente, foi introduzido etanol 96% e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 35% para facilitar a precipitação do glicogênio, seguido por centrifugação por 10 minutos a 1510 g. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspensão em 1 ml de água destilada e 300 µl de HCl 4 N para promover a hidrólise do glicogênio. Após mais 60 minutos de fervura a 100 °C, o pH foi neutralizado adicionando-se 300 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M. A concentração de glicose foi determinada utilizando o kit Glucose Liquiform (Id-Nº:133, LABTEST Diagnóstica®, Brasil), com leituras de absorbância realizadas em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Reino Unido). A concentração de glicogênio foi avaliada utilizando uma curva de calibração baseada em padrões de glicogênio conhecidos (Sigma-Aldrich® #G8876), apresentada em miligramas de glicogênio por grama de tecido (mg/g).

### 3.3.7 Oxidação de $^{14}\text{C}$ -glicose a $\text{CO}_2$

A conversão de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose para  $^{14}\text{CO}_2$  foi mensurada seguindo os protocolos de Torres et al. (2001) e Marqueze et al. (2006). Tecidos frescos foram fatiados ( $\pm 10$  mg de fígado e  $\pm 90$  mg de músculo) e incubados em frascos vedados com tampas de borracha contendo 1 ml de tampão, 0,1  $\mu\text{Ci}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  glicose (250 mCi/mmol, PerkinElmer®, EUA) e 10 mM de glicose não marcada. A fase gasosa foi saturada com uma mistura de carbogênio (5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$ ) e a reação ocorreu em pequenos poços dentro dos frascos de vidro vedados contendo tiras de papel *Whatman* 3MM colocados acima do nível do meio de incubação para capturar o  $^{14}\text{CO}_2$  formado. Os frascos foram incubados em um agitador metabólico Dubnoff por 60 minutos a 25 °C. O processo de oxidação foi interrompido através da adição de ácido tricloroacético (TCA) 50% (v/v) nos poços contendo tecido e NaOH 2 M nos poços contendo o papel *Whatman* 3MM – esse processo foi realizado inserindo agulhas através das tampas de borracha, sem que ocorresse a perda do  $^{14}\text{CO}_2$  formado. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente por 24 horas para capturar o  $^{14}\text{CO}_2$  no papel *Whatman* 3MM. Após 24 h, o papel *Whatman* 3MM foi transferido para uma mistura de cintilação líquida e a radioatividade foi quantificada (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Os resultados foram apresentados como  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $\mu\text{mol}$  do substrato de  $^{14}\text{C}$  incorporado em  $\text{CO}_2$  por grama de tecido por hora).

### 3.3.8 Conversão da $^{14}\text{C}$ -glicose em glicogênio (glicogênese)

As amostras de tecido utilizadas no protocolo de oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{CO}_2$  (seção 3.3.7) foram lavadas em tampão frio, secas com papel filtro e, em seguida, introduzidas em frascos contendo KOH a 30%. Esses frascos foram

submetidos a uma fervura de 60 minutos a 100 °C. Posteriormente, etanol 96% e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 35% foram adicionados, seguidos de centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, foi realizada uma nova centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos após a adição de etanol a 70%. Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi dissolvido em água destilada (Thomas et al., 1968). Cem microlitros desta solução foram transferidos para frascos contendo uma mistura de cintilação líquida (tolueno–Triton X<sup>®</sup>-100 (2:1), 0,4% de PPO, 0,01% de POPOP). A radioatividade foi quantificada usando um contador LKB (LKB-Wallac, EUA), e a síntese de glicogênio foi quantificada como  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $\mu\text{mol}$  de <sup>14</sup>C-glicose incorporada em glicogênio por grama de tecido por hora de incubação).

### 3.3.9 Conversão de <sup>14</sup>C-substrato em glicose (gliconeogênese)

A determinação da gliconeogênese tecidual foi realizada de acordo com Oliveira e Da Silva (1997) e Oliveira et al. (2004). Fatias de tecido fresco de fígado ( $\pm$  10 mg), músculo ( $\pm$  80 mg) e rim ( $\pm$  10 mg) foram incubadas em microtubos contendo 0,5 ml de tampão (114 mM NaCl, 2,25 mM KCl, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 13 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 0,1% de albumina, 10  $\mu\text{l}$ :1 ml PMSF—Sigma–Aldrich<sup>®</sup> #P7626 e 1  $\mu\text{l}$ : ml de coquetel de inibidor de protease—Sigma–Aldrich<sup>®</sup> #P8340; pH 7,63) e substratos marcados e não marcados. As fatias de fígado foram incubadas na presença de 0,10  $\mu\text{Ci}$  de [U-<sup>14</sup>C]-alanina (151 mCi/mmol; Perkin Elmer, EUA) mais 5 mM de L-alanina não marcada, 0,10  $\mu\text{Ci}$  de [U-<sup>14</sup>C]-lactato (250 mCi/mmol; Du Pont, EUA) mais 5 mM de L-lactato não marcado e 0,10  $\mu\text{Ci}$  de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol (154 mCi/mmol; Perkin Elmer, EUA) mais 5 mM de L-glicerol não marcado. As fatias de músculo foram incubadas na presença de 0,10  $\mu\text{Ci}$  de [U-<sup>14</sup>C]-alanina (151 mCi/mmol; Perkin Elmer, EUA) mais 5 mM de L-alanina não marcada e 0,10  $\mu\text{Ci}$  de

[U-<sup>14</sup>C]-lactato (154 mCi/mmol; Perkin Elmer, EUA) mais 5 mM de L-lactato não marcado. As fatias de rim foram incubadas na presença de 0,10 µCi de [U-<sup>14</sup>C]-glutamina (266 mCi.mmol<sup>-1</sup>; Amersham, Reino Unido) mais 5 mM de L-glutamina não marcada. Após adicionar os substratos não marcados, o pH do meio de incubação foi determinado. A fase microtubular gasosa foi saturada com uma mistura de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> por 20 s. As fatias foram incubadas a 25 °C por 60 minutos em um agitador metabólico Dubnoff (60 ciclos/min). Estudos anteriores demonstraram que, em condições experimentais, 5% de CO<sub>2</sub> não afetam a capacidade gliconeogênica (Oliveira et al., 2004). Ao final da incubação, o meio foi desproteíndizado, e a <sup>14</sup>C-glicose, formada a partir de [U-<sup>14</sup>C]-alanina, [U-<sup>14</sup>C]-glicerol, [U-<sup>14</sup>C]-lactato e [U-<sup>14</sup>C]-glutamina foi separada por cromatografia em camada fina usando n-butanol a 95%, álcool etílico a 5,4% e ácido acético em água (75:47,4:27,6, v/v/v). O ponto correspondente à <sup>14</sup>C-glicose, localizado por pulverização com um reagente de anisaldeído (95% de álcool etílico/ácido sulfúrico concentrado/p-metoxibenzaldeído 18:1:1, v/v/v), foi marcado, raspado e dissolvido em líquido de cintilação: tolueno: Triton X-100 (2:1, v/v)-PPO 0,4%, POPOP 0,01%. A radioatividade foi medida usando um contador LKB (LKB-Wallac, EUA). Os valores da atividade gliconeogênica são expressos como mmol de [U-<sup>14</sup>C]-alanina, [U-<sup>14</sup>C]-glicerol, [U-<sup>14</sup>C]-lactato ou [U-<sup>14</sup>C]-glutamina convertidos em <sup>14</sup>C-glicose. g<sup>-1</sup> de tecido h<sup>-1</sup> (mmol de <sup>14</sup>C-substrato convertido em <sup>14</sup>C-glicose por grama de tecido por hora de incubação).

### 3.4 Exposição à desidratação

#### 3.4.1 Aclimação

Vinte e uma *Boana pulchella* (n=21) foram coletadas durante o inverno de 2022 em banhados localizados dentro da EEA/UFRGS. A faixa de temperatura no local de

coleta era de 5 a 14°C, e a umidade era de aproximadamente 96%, conforme mensurado pela estação meteorológica portátil (Kestrel 3500 Weather Meter®) ao final de cada coleta. Os animais coletados, pesando aproximadamente 4 g cada, foram transportados para o LaMEC, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

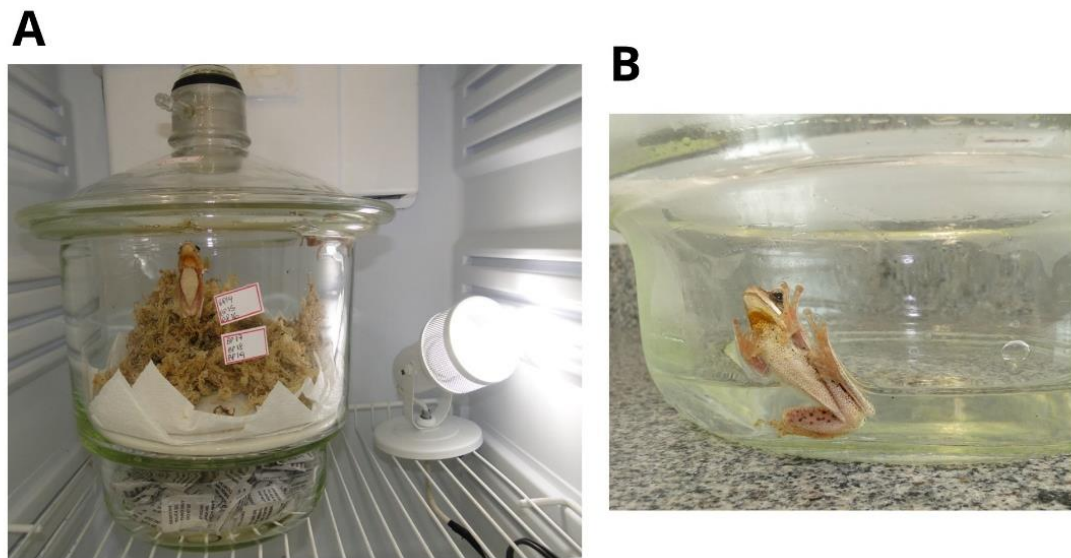
Assim que chegaram ao laboratório, cinco animais (n=5) foram separados para determinar o conteúdo inicial de água corporal (BWCi) de *Boana pulchella*, valor necessário para mensurar os níveis de desidratação durante o experimento (Churchill e Storey, 1994). Para isso, esses indivíduos foram pesados e eutanasiados com lidocaína a 5% administrada na região inguinal e na cavidade oral. Posteriormente, foram colocados em uma incubadora a 80°C e pesados a cada 12 horas. O ponto de desidratação completa foi identificado quando não houve alteração no peso por 24 horas, e o BWCi foi calculado subtraindo o peso final do peso inicial. Após, o conteúdo de água corporal de *B. pulchella* foi estimado em  $0,797 \pm 0,005$  g de água por grama de massa corporal.

O restante dos animais (n=16) foram submetidos a um banho de tetraciclina (0,5%) e seguiram para o protocolo de aclimação delineado por de Amaral et al. (2023) e descrito na seção 3.3. A única alteração realizada nesse experimento durante o protocolo de aclimação foi o recipiente onde os animais foram aclimatados. Ao invés de caixas plásticas perfuradas, os animais foram aclimatados dentro de dessecadores de vidros de sete litros (máximo seis animais por dessecador), com discos de porcelana separando o fundo e cobertos com tampa com um orifício aberto para circulação do ar. Em cima do disco de porcelana, foi inserido papéis toalhas umedecidos com água desclorada, pote com água desclorada e musgo esfagno. Após o período de aclimação de duas semanas, um grupo de controle de animais (n=5) foi selecionado aleatoriamente dessa condição.

### 3.4.2 Desidratação e reidratação

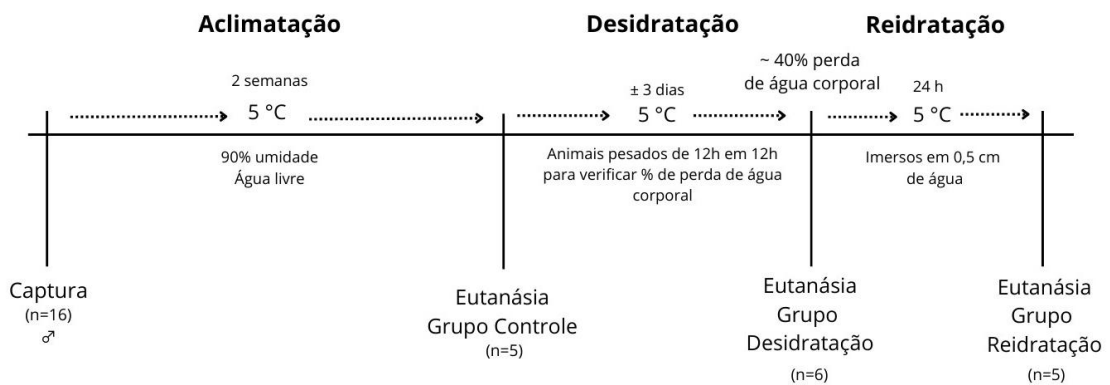
Após a aclimatação, o restante dos animais (n=11) foram submetidos a um procedimento de desidratação (Churchill e Storey, 1994; Wu et al., 2018; Storey e Storey, 2019). Antes de iniciar o protocolo, foi realizada a identificação fotográfica das partes internas das patas traseiras para a pesagem individual durante o período de exposição. Nos dessecadores, abaixo do disco de porcelana, foi inserido saquinhos de sílica gel dessecante (200 g) e o interior do dessecador foi seco, com musgo esfagno e toalhas de papel substituídos por contrapartes secas (figura 11A). Após pesagem e identificação de cada indivíduo, a bexiga urinária foi esvaziada, e eles foram devolvidos aos dessecadores a 5°C sob um ciclo de luz-escuro de 10:14 horas. Foi realizada a pesagem a cada 12 horas para acompanhar a perda de água corporal até atingir aproximadamente 40%. O percentual de perda de água corporal total foi calculado, a cada pesagem, usando a fórmula:  $\% \text{ perda de água corporal} = \left[ \frac{(Mi - Md)}{(Mi \times BWCi)} \right] \times 100$ , onde  $Mi$  é a massa inicial,  $Md$  é a massa em cada pesagem e  $BWCi$  é o conteúdo inicial de água corporal (obtido anteriormente). Ao atingir 40% de perda de água corporal, o que foi em média em três dias, os animais foram eutanasiados (n=6), compondo o grupo dos animais desidratados ou reidratados (n=5). A reidratação foi realizada colocando-os em contato com uma lâmina de água desclorada (0,5 cm de profundidade) a 5°C por 24 horas antes da eutanásia (figura 11B).





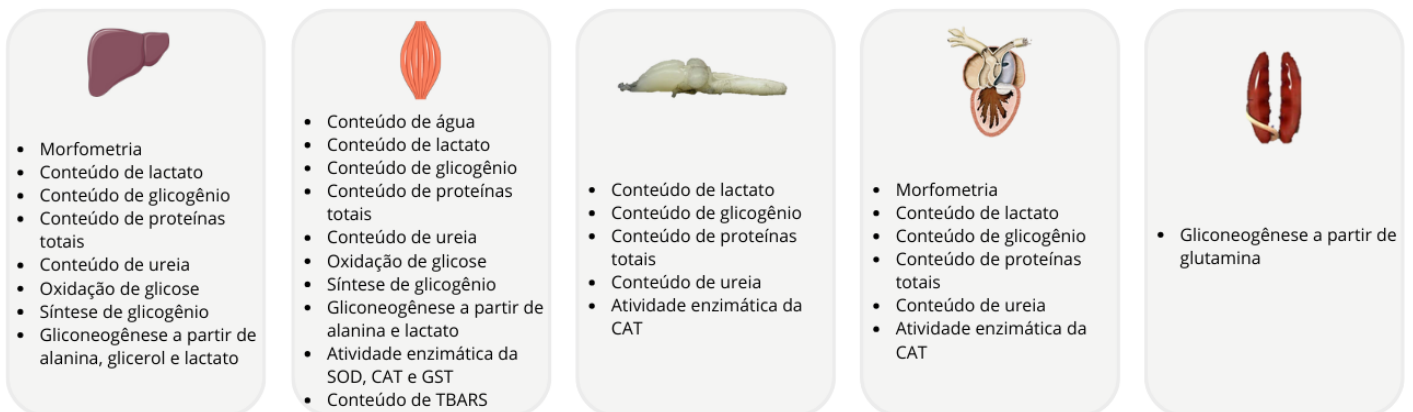
**Figura 11. Alojamento dos animais durante o período de desidratação e reidratação no experimento de desidratação.** Os animais foram acondicionados em dessecadores de vidros e alocados dentro de uma incubadora refrigerada com controle de luz e temperatura. Durante a desidratação, foi adicionado saquinhos dessecantes de sílica em gel nos dessecadores **(A)** e durante a reidratação uma lâmina de água de 0,5 cm foi adicionada ao fundo do dessecador onde os animais ficaram em contato **(B)**.

Após 24h de recuperação, foi amostrado e eutanasiado os animais que compuseram o grupo dos animais reidratados. O protocolo empregado durante esse experimento está ilustrado na figura 12. Nenhum animal morreu durante o protocolo de aclimatação e experimental, indicando que *B. pulchella* pode sobreviver com até 40% de perda de água corporal.



**Figura 12. Linha do tempo do protocolo experimental de desidratação mostrando os grupos experimentais controle, desidratação e reidratação realizado de acordo com Churchill e Storey (1994), Wu et al. (2018), Storey e Storey (2019).** *Boana pulchella* (n = 16) foram coletadas no sul do Rio Grande do Sul. Após a captura, os animais foram levados ao laboratório e iniciou-se um período de aclimação de duas semanas a 5 °C com acesso livre a água. Após duas semanas, cinco animais foram selecionados aleatoriamente (grupo controle). O restante dos animais foi submetido a um ambiente com restrição hídrica e quando atingiram 40% de perda de água corporal, seis animais foram amostrados e compuseram o grupo desidratados. Os outros cinco animais foram colocados em recuperação com acesso a água por 24 h e após amostrados (grupo reidratados).

Antes da eutanásia, a massa corporal (BM) dos animais em gramas (g) e o comprimento focinho-ventre (SVL) em centímetros (cm) foram mensurados. A eutanásia foi realizada individualmente usando lidocaína a 5% (creme anestésico tópico) no abdômen e na cavidade oral. Após confirmada a eutanásia, a dissecação imediata sobre gelo removeu o fígado, os músculos das patas (gastrocnêmio, grácil, sartório e adutor) e o coração, encéfalo e rim. As amostras de tecidos foram imediatamente para protocolos que exigiam tecido fresco ou armazenadas a -80°C para uso subsequente em outros procedimentos. O resumo dos parâmetros avaliados em cada tecido pode ser observado na figura 13.



**Figura 13. Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, músculo, encéfalo, coração e rim) com as respectivas análises realizadas nos animais dos grupos controle, desidratação e reidratação.**

### 3.4.3 Parâmetros morfométricos

O índice de massa escalada (SMI), conforme descrito por Peig e Green (2009) e MacCracken e Stebbings (2012), foi utilizado para avaliar a condição corporal usando a massa corporal e o SVL (comprimento focinho-ventre). Um alto SMI sugere maiores reservas de energia e, portanto, uma boa condição corporal. O declive do SMI foi calculado a partir da análise de regressão de SVL transformado em log e

massa transformada em log:  $SMI = \left[ \text{massa individual} \times \left( \frac{\text{média do SVL da população}}{\text{SVL individual}} \right)^{\text{inclinação da regressão log massa} \sim \text{log SVL}} \right]$ .

Uma parte do tecido muscular foi usada para determinar o conteúdo de água do tecido. Este tecido foi pesado, identificado e colocado em uma incubadora a 60°C. A cada 24 horas, o peso do tecido foi medido, e quando foi observado que o peso do tecido não mudou por 24 horas, o peso seco do tecido foi determinado. Assim, o conteúdo de água do tecido foi expresso em mg e determinado pela seguinte fórmula:

*Conteúdo de água muscular (mg) = peso final do tecido – peso inicial do tecido.*

Os pesos do fígado e do coração foram medidos, e o índice hepatossomático (IHS) e o índice cardiossomático (ICS) foram calculados usando a fórmula:  $HSI \text{ ou } ICS = \left( \frac{\text{peso do tecido (g)}}{\text{massa corporal (g)}} \right) \times 100$ .

#### 3.4.4 Balanço oxidativo

Fatias de músculo, coração e encéfalo foram homogeneizadas usando um misturador Ultra-Turrax (IKA-WERK) com um tampão de fosfato (20 mM), cloreto de potássio (140 mM) e inibidor de protease (1 mM de PMSF), pH 7,4, na proporção de 39 ml: 1 g. Posteriormente, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm e 4°C (Reichert et al., 2022; Valgas et al., 2024). O sobrenadante dessa centrifugação foi coletado, fracionado e congelado a -20°C para subsequentes ensaios de equilíbrio redox e análises de substratos teciduais. Os marcadores de equilíbrio redox foram quantificados em duplicata e armazenados por um período máximo de dois meses. Todos os marcadores foram normalizados aos níveis de proteínas totais quantificados no sobrenadante do homogeneizado.

##### 3.4.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados medindo as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em 520 nm, conforme a metodologia delineada por Buerge e Aust (1978) e Lima e Abdalla (2001). Em resumo, uma mistura contendo 10% de ácido tricloroacético (TCA), 0,67% de ácido tiobarbitúrico (TBA), água destilada e a amostra homogeneizada de tecido muscular foram aquecidos a 100 °C por 15 minutos. Posteriormente, foi resfriado em gelo por 15 minutos, e álcool n-butílico foi adicionado. A mistura foi então centrifugada por 1 minuto a 3000 rpm a 4

°C, e o sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo preto para leitura. Os resultados foram quantificados e expressos em nanomoles de TBARS por miligrama de proteína.

#### 3.4.4.2 *Superóxido dismutase*

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima responsável pela catalisação da dismutação do radical ânion superóxido, resultando na formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio. O método para determinar a SOD é baseado na inibição da reação entre o radical superóxido com a adrenalina (Boveris e Cadenas, 1982) e é quantificado em unidades relativas (uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe 50% da taxa de redução do detector (adrenalina). A atividade da SOD foi medida no tecido muscular. Preparamos uma solução de tampão de glicina (50 mM, pH 11) e epinefrina (1mM), um composto fotossensível formado pela adição de 0,04 g de bitartarato de epinefrina, 2 ml de tampão de glicina e 14 µl de HCl. Foram obtidas três curvas para cada amostra, nos volumes de 24, 12 e 6 µl, juntamente com o tampão necessário para atingir um volume final de 450 µl, mais 8,2 µl de epinefrina, foram adicionados a uma cubeta de quartzo preto. A leitura espectrofotométrica de SOD foi realizada a 480 nm durante 10 s a cada 1 s. A quantificação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína.

#### 3.4.4.3 *Catalase*

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada em tecido cerebral, cardíaco e muscular, medindo a redução do peróxido de hidrogênio (Boveris e Chance, 1973). Resumidamente, adicionamos 477,5 µl de tampão de reação (fosfato de sódio) mais

5 µl de amostra a uma cubeta de quartzo e adicionamos 17,5 µl de peróxido de hidrogênio (concentração final de 50 mM). A cinética enzimática foi lida a 240 nm ao longo de um período de 20 segundos em intervalos de 2 segundos (músculo e encéfalo) ou 70 s a cada 7 s (coração), e todas as amostras foram lidas em duplicata. Os resultados foram apresentados em pmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por miligrama de proteína por minuto.

#### 3.4.4.4 *Glutathione S-transferase*

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada pela quantificação do produto formado pela conjugação de 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) com glutathione reduzida (GSH). O composto formado é detectável a 340 nm, e a atividade da enzima é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig e Jakoby, 1981). Uma mistura contendo tampão de fosfato de sódio e EDTA, CDNB, GSH, juntamente com a amostra homogeneizada de tecido muscular, foi colocada em uma cubeta de quartzo e registrada ao longo de 100 segundos, com leituras realizadas a cada 10 segundos. Os resultados foram expressos em µmol de CDNB conjugado · min<sup>-1</sup> · mg proteína<sup>-1</sup> (Boyland e Chasseaud, 1969).

#### 3.4.5 *Substratos teciduais*

A concentração dos substratos teciduais lactato, proteínas totais e ureia do encéfalo, coração, fígado e músculo foi determinada a partir da sobrenadante da homogeneização descrita em 3.4.4. A partir desse homogeneizado, a concentração de substratos foi determinada por meio de kits enzimáticos comerciais - lactato (Id-Nº:138, LABTEST Diagnóstica®, Brasil), ureia (Id-Nº: 27, LABTEST Diagnóstica®, Brasil) e proteínas totais (Id-Nº: 99, LABTEST Diagnóstica®, Brasil). As medições

foram realizadas em uma placa de 96 poços usando um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, Reino Unido) em absorbâncias específicas, calibradas em relação aos padrões do kit. As concentrações foram determinadas com base em curvas de calibração derivadas dos padrões do kit e expressas em miligramas por grama de tecido ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

A concentração de glicogênio no encéfalo, coração, fígado e músculo foi determinada em frascos contendo o precipitado da homogeneização descrita na seção 3.4.4 e seguindo os procedimentos delineados por Van Handel (1965), de Amaral et al. (2022, adaptado), de Amaral et al. (2023) e descrito na seção 3.3.6.

#### 3.4.6 Mensurações teciduais com utilização de isótopos de $^{14}\text{C}$

Fatias de tecido hepático e tecido muscular foram utilizadas para determinação da oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose a  $\text{CO}_2$ , técnica descrita na seção 3.3.7, e da glicogênese através da conversão  $^{14}\text{C}$ -glicose em glicogênio, técnica descrita na seção 3.3.8. Fatias de tecido fresco de fígado, músculo e rim foram utilizadas para determinar a gliconeogênese através da conversão de  $^{14}\text{C}$ -alanina,  $^{14}\text{C}$ -glicerol,  $^{14}\text{C}$ -glutamina e  $^{14}\text{C}$ -lactato em glicose, como descrito na seção 3.3.9.

### 3.5 Exposição à anóxia

#### 3.5.1 Aclimatação

Quinze indivíduos de *Boana pulchella* ( $n=15$ ), foram coletados durante o verão de 2024 em banhados localizados dentro no município de São José dos Ausentes, Rio Grande do Sul. A temperatura no local de coleta era de  $18.3\text{ }^\circ\text{C}$ , e a umidade era de 84.5%, conforme indicado pela estação meteorológica portátil (Kestrel 3500

Weather Meter®) ao final da coleta. Assim que coletados e armazenados para o transporte, os animais foram encaminhados para o LaMEC na Universidade Federal do Rio Grande do Sul para o experimento.

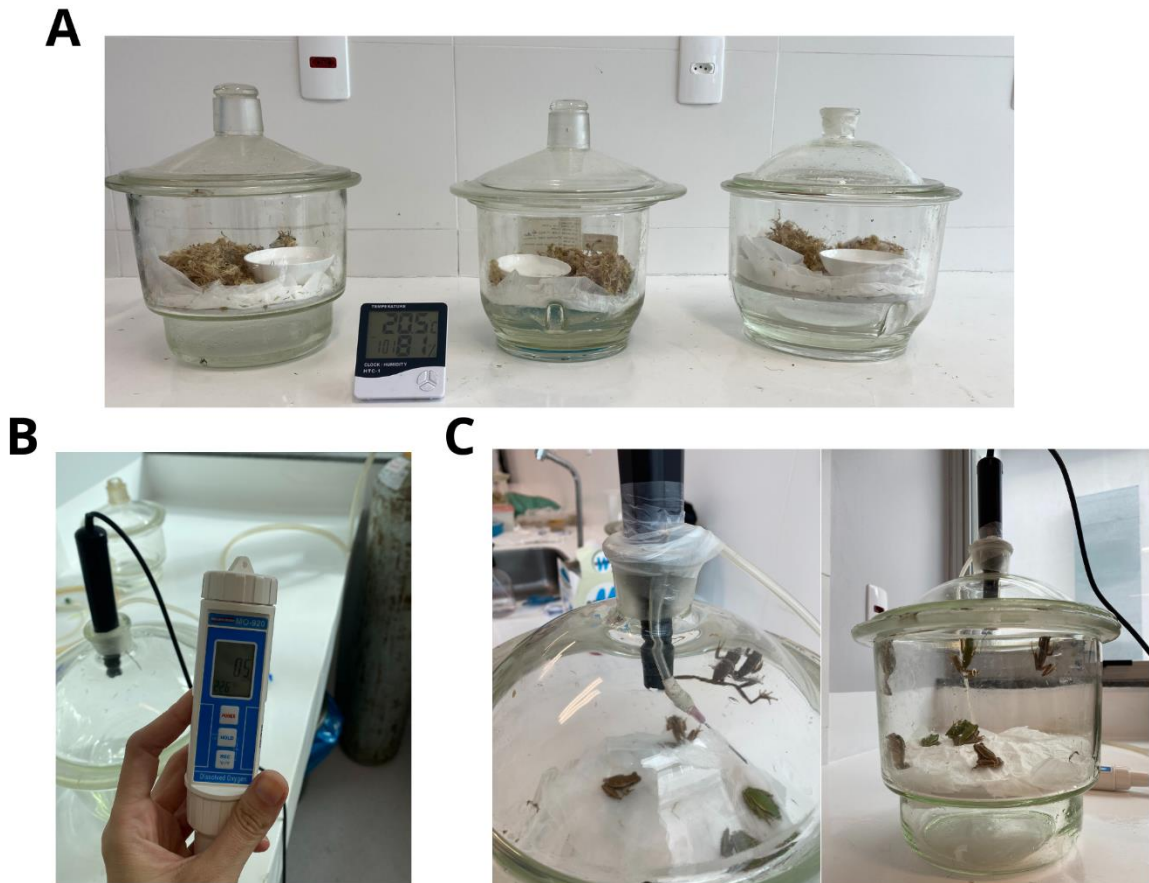
Assim que chegaram ao laboratório, os animais foram submetidos a um banho de tetraciclina (0,5%) e seguiram para o protocolo de aclimatação delineado por de Amaral et al. (2023) e descrito na *seção 3.4.1*. Os animais permaneceram em dessecadores de vidro durante uma semana a uma temperatura de  $20 \pm 1$  °C, fotoperíodo natural (14:10h, dia:noite) e concentração de oxigênio de  $21 \pm 0.2\%$  mensurada, todos os dias, através de um medidor de oxigênio (modelo 920, Instrutherm®; figura 14A). Após o período de aclimatação de uma semana, um grupo de animais (n=5) foi selecionado aleatoriamente dessa condição e compuseram o grupo controle.

### *3.5.2 Anóxia e recuperação*

O restante dos animais (n=10) seguiram para o protocolo experimental de exposição a exposição à anóxia (Al-Attar e Storey, 2019; Storey e Storey, 2019). Os dessecadores onde estavam os animais foram reorganizados com toalhas de papel umedecidas com água desclorada (borbulhada com gás nitrogênio a 100% por 30 minutos) revestindo o fundo. Após, a tampa do dessecador foi fixada e no orifício de abertura na tampa foi inserido um medidor de oxigênio (modelo 920, Instrutherm®) e uma mangueira para introdução de N<sub>2</sub> (figura 14B). Um fluxo de gás nitrogênio 100% foi então projetado para dentro do dessecador por 20 minutos e, ao final a concentração de O<sub>2</sub> no interior da câmara foi de 0%. Após, os dez animais (n=10) foram acondicionados nessa câmara rapidamente e tampa selada com parafilme



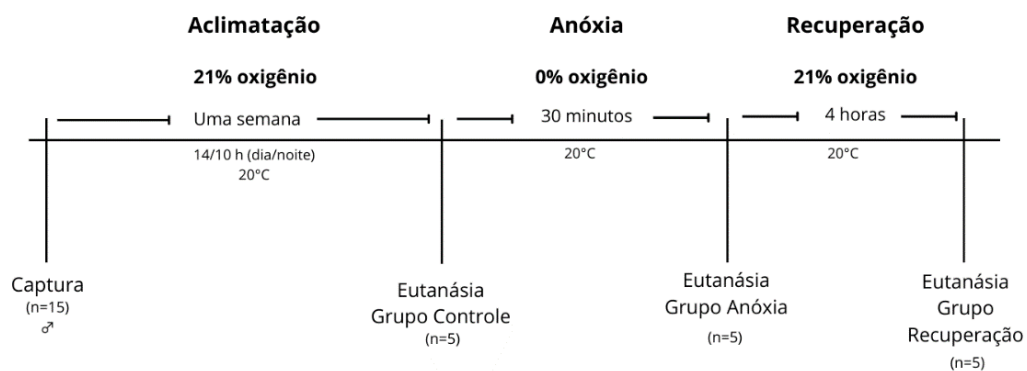
(figura 14C). O gás  $N_2$  foi novamente liberado através das câmaras constantemente (variação da concentração de  $O_2$  durante esse tempo: 0% a 1%).



**Figura 14. Alojamento dos animais durante o período de aclimação e anóxia.** Os animais foram acondicionados em dessecadores de vidros, com temperatura controlada (20°C), fotoperíodo natural (14:10, dia:noite) e, durante a aclimação de uma semana, a concentração de oxigênio atmosférico era de 21% **(A)**. Durante a anóxia, o medidor de  $O_2$  foi acoplado ao dessecador juntamente com uma mangueira onde era liberado o fluxo de  $N_2$  a fim de criar uma atmosfera anóxica **(B)**. Os animais foram introduzidos a esse ambiente anóxico, onde permaneceram até perderem a reatividade **(C)**.

Os animais foram observados e estimulados para verificar a responsividade durante todo tempo. Para verificar a responsividade, uma fina haste foi introduzida no dessecador e permitiu que os animais fossem tocados. Após trinta minutos de exposição ao ambiente anóxico, os animais pararam de responder aos estímulos. Nesse momento, cinco animais ( $n=5$ ) foram amostrados e compuseram o grupo dos

animais em anóxia. Os outros cinco animais ( $n=5$ ) foram realocados em um novo dessecador, com fluxo livre de ar atmosférico e concentração de oxigênio de 21%, onde permaneceram por quatro horas. Após quatro horas, esses animais foram amostrados e compuseram o grupo dos animais recuperados. O protocolo empregado durante essa exposição está ilustrado na figura 15.

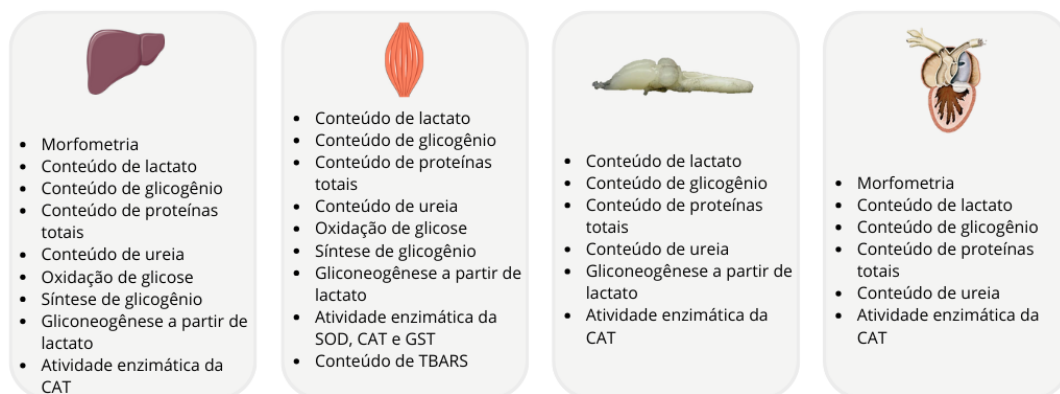


**Figura 15. Linha do tempo do protocolo experimental de desidratação mostrando os grupos experimentais controle, anóxia e recuperação de acordo com Al-Attar e Storey (2019) e Storey e Storey (2019).** *Boana pulchella* ( $n = 15$ ) foram coletadas no do Rio Grande do Sul. Após a captura, os animais foram levados ao laboratório e iniciou-se um período de aclimação de uma semana a 20 °C com acesso livre a água e concentração de oxigênio atm 20%. Após uma semana, cinco animais foram selecionados aleatoriamente (grupo controle). O restante dos animais foi submetido a um ambiente sem oxigênio ( $O_2$ ) e, quando não respondiam mais ao estímulo, cinco animais foram amostrados e compuseram o grupo anóxia. Os outros cinco animais foram colocados em recuperação com 20% de oxigênio por 4 h e após amostrados (grupo recuperados).

A massa corporal (MC; em gramas; balança analítica BEL<sup>®</sup>, modelo Mark M214A) e comprimento rostro-cloacal (CRC; em centímetros) foi mensurada antes da eutanásia. Após, os animais foram eutanasiados com creme de lidocaína a 5%, aplicado no abdômen, região inguinal e cavidade oral. A coleta de sangue foi realizada

com seringas heparinizadas através de punção cardíaca. Os animais foram então rapidamente dissecados sobre gelo, e foram removidos o fígado, o coração, o encéfalo, e os músculos posteriores das pernas.

O índice de massa escalada (SMI), conforme descrito na seção 3.4.3, foi determinado para os indivíduos dos três grupos experimentais conforme:  $SMI = \left[ massa\ individual \times \left( \frac{média\ do\ SVL\ da\ população}{SVL\ individual} \right)^{inclinação\ da\ regressão\ log\ massa \sim log\ SVL} \right]$ . O IHS e o ICS também foram calculados usando a seguinte equação:  $IHS\ ou\ ICS = \left( \frac{peso\ do\ tecido\ (g)}{massa\ corporal\ (g)} \right) \times 100$ . As amostras de fígado, músculo, coração, encéfalo e plasma foram imediatamente utilizadas nas técnicas de avaliação metabólica ou armazenadas a  $-80^{\circ}C$  até o momento da utilização nas técnicas bioquímicas. O resumo dos parâmetros avaliados em cada tecido pode ser observado na figura 16.



**Figura 16. Quadro do resumo dos tecidos utilizados (fígado, músculo, encéfalo, coração) com as respectivas análises realizadas nos animais dos grupos controle, anóxia e recuperação.**

### 3.5.3 Reflexo de endireitamento

Antes da eutanásia, todos animais foram submetidos a um teste de reflexo de endireitamento. A metodologia empregada para realização desse teste foi baseada segundo Harvey et al., 1976 e está descrita na seção 3.3.3.

#### 3.5.4 *Substratos plasmáticos*

O plasma foi separado conforme descrito em de Amaral et al. (2022) e na seção 3.3.4. Kits enzimáticos comerciais determinaram os níveis de glicose (Id-Nº:133, LABTEST Diagnóstica®, Brasil), lactato (Id-Nº:138, LABTEST Diagnóstica®, Brasil) e ureia (Id-Nº: 27, LABTEST Diagnóstica®, Brasil). As medições foram realizadas utilizando um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, Reino Unido) em absorvâncias específicas, calibradas com os padrões dos kits, e relatadas em milimoles por litro de plasma (mmol/L).

#### 3.5.5 *Mensurações teciduais com utilização de isótopos de <sup>14</sup>C*

Fatias de tecido hepático e tecido muscular foram utilizadas para determinação da oxidação de <sup>14</sup>C-glicose a CO<sub>2</sub>, técnica descrita na seção 3.3.7, e da glicogênese através da conversão <sup>14</sup>C-glicose em glicogênio, técnica descrita na seção 3.3.8. Fatias de tecido fresco de fígado, músculo e encéfalo foram utilizadas para determinar a gliconeogênese através da conversão de <sup>14</sup>C-lactato em glicose, como descrito na seção 3.3.9.

#### 3.5.6 *Balanço oxidativo*

Fatias dos tecidos encéfalo, coração, fígado e músculo foram utilizadas para mensurar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme protocolo descrito em 3.4.4.1, a atividade da superóxido dismutase (SOD) (*descrita na seção 3.4.4.2*), atividade da Catalase (CAT) conforme descrito em 3.4.4.3 e atividade da Glutathione S-transferase (GST) seguindo o protocolo descrito na seção 3.4.4.4.

### 3.5.7 Substratos teciduais

Fatias dos tecidos encéfalo, coração, fígado e músculo foram utilizadas para mensuração a concentração de glicogênio e dos substratos lactato e ureia, conforme descrito na seção 3.4.5.

## 3.6 Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado com a utilização do programa *Minitab* (versão 15) utilizando como base para cálculo os resultados de protocolos experimentais de nosso laboratório (ex. de Amaral et al., 2022) e de outros grupos de pesquisa com o mesmo protocolo e modelo animal (ex. Zhang et al., 2021; Varma and Storey, 2023b), levando em consideração o desvio padrão encontrado nos grupos. Os resultados foram inicialmente analisados utilizando o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição dos dados, e os valores *outliers* foram identificados e, se presentes, excluídos usando o método ROUT (Q = 1%; Motulsky e Brown, 2006). Dados paramétricos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste de Kruskal–Wallis (KW) seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. Os dados com uma amostra de grupos dependentes, como pesos de mesmos indivíduos em tempos diferentes, foram submetidos a ANOVA de medidas repetidas (RM) com correção de Greenhouse-Geisser. Dados paramétricos são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), e dados não paramétricos são relatados como valores de mediana e intervalo interquartil mínimo e máximo. A significância estatística foi determinada quando  $P \leq 0,05$ . A análise dos dados foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism* (GraphPad®, EUA).

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir das metodologias descritas nessa Tese serão apresentados em quatro seções distintas de acordo com os artigos originários dos resultados obtidos:

- I. Artigo 1 (exposição a temperaturas negativas);
- II. Artigo 2 (exposição à desidratação);
- III. Artigo 3 (gliconeogênese durante exposição a temperaturas negativas e desidratação);
- IV. Dados parciais do experimento de exposição à anóxia.

#### **4.1 Artigo 1 (exposição a temperaturas negativas)**

Título: ***Metabolic changes in the subtropical frog *Boana pulchella* during experimental cooling and recovery conditions***

Periódico: ***Journal of Thermal Biology* (ISSN 1879-0992)**

Página URL do periódico: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-thermal-biology>

Qualis: **A1**

Fator de Impacto: **2.7**

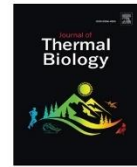
Status: **Publicado**

Acesso: <https://doi.org/10.1016/j.itherbio.2023.103705>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Thermal Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jtherbio](http://www.elsevier.com/locate/jtherbio)

## Metabolic changes in the subtropical frog *Boana pulchella* during experimental cooling and recovery conditions

Marjoriane de Amaral<sup>a,\*</sup>, Maiza Cristina Von Dentz<sup>a</sup>, Leonardo Airton Ressel Simões<sup>a</sup>,  
Éverton Vogt<sup>a</sup>, Dener Heiermann<sup>b</sup>, Pedro Fischer<sup>b</sup>, Patrick Colombo<sup>b</sup>, Luiz Carlos Kucharski<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Metabolism and Comparative Endocrinology, Department of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2600, 90035003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Museum of Natural Sciences of the Secretariat of Environment and Infrastructure of Rio Grande do Sul (SEMA), FZB, Department of Herpetology/Amphibians, Doutor Salvador França, 90690000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Frog  
Cooling  
Subtropical  
Metabolism  
Metabolites  
Physiology  
Temperature

### ABSTRACT

Frogs have developed biochemical and physiological adaptations to occupy diverse ecological niches on Earth successfully. Survival in frozen states is a fascinating strategy made possible by evolving adaptations to produce cryoprotectant solutes. The hylid frog *Boana pulchella* thrives in South American regions with cold climates, remaining active while enduring sporadic subzero temperatures during winter. The species' metabolic changes during subzero exposure remain unclear. Therefore, we exposed *B. pulchella* to cooling and recovery, assessing plasma and tissue metabolite changes. Cooling significantly reduced urea concentrations in plasma ( $P = 0.033$ ), muscle ( $P = 0.001$ ), heart ( $P = 0.009$ ), and brain ( $P = 0.041$ ) compared to acclimation. Liver glucose oxidation and glycogen synthesis were lower in cooling and recovery than in acclimation ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0117$ , respectively). Muscle glycogen synthesis was lower in recovery than acclimation ( $P = 0.0249$ ). These results demonstrate *B. pulchella*'s physiological strategies during subzero exposure, likely reflecting species-specific evolutionary adaptations for brief subzero exposures that enable winter survival in its natural habitat.

### 1. Introduction

Ectothermic vertebrates have successfully colonised diverse ecological niches on Earth (Pimm et al., 2014), living seasonally or continuously in high-latitude and high-elevation environments (Storey, 1984; Weber et al., 2002; Costanzo et al., 2013; Cogălniceanu et al., 2017; Shekhovtsov et al., 2020). While these vertebrates tend to concentrate in tropical regions due to anatomical, behavioural, and physiological characteristics such as ectothermy (Duellman, 1999; Wells, 2007), certain species have evolved adaptations enabling them to inhabit cold regions (Storey, 1984), high altitudes (Hutchison et al., 1976), and deserts (Van Beurden, 1980).

Surviving in unconventional environments, especially for ectotherms, necessitates biochemical and physiological changes to cope with resource scarcities like food, accessible water, and oxygen (Geise and Linsenmair, 1986; Costanzo et al., 1993; Joanisse and Storey, 1996; Jackson and Ultsch, 2010; Nguyen, 2017; Berman et al., 2019). Among the influencing abiotic factors, temperature predominantly shapes physiological parameters in ectothermic animals (Sinsch, 1984; Orizaola

et al., 2010), with reported metabolic responses to low temperatures varying among populations in different thermal regimes (Costanzo et al., 2013; Bullock, 1955; Storey and Storey, 2013).

Frogs that overwinter in cold environments often survive through strategies of freezing avoidance or tolerance (Hill and Wyse, 1989). A particularly captivating adaptation within this group is freeze tolerance, where the animal adapts its metabolism to endure lower temperatures. Anuran freezing tolerance was first reported 40 years ago (Schmid, 1982). Since then, a prolific amount of research has been published (Storey, 1987; Joanisse and Storey, 1996; Cowan and Storey, 2001; Zhang and Storey, 2012; Rosendale et al., 2015; Berman et al., 2019; Costanzo, 2019; Storey et al., 2021; Al-attar and Storey, 2022). This ability is achieved through the action and accumulation of cryoprotectants like glucose, glycerol, and urea, combined with integrated physiological changes (Storey and Storey, 2013, 2017).

South America boasts regions with cold climates that experience negative temperatures, frost, snow, and temperature fluctuations inhabited by anurans (Duarte et al., 2006; Both et al., 2009). Recent studies have delved into the response of tropical frogs to freezing

\* Corresponding author.

E-mail address: [marjoriane.amaral@ufrgs.br](mailto:marjoriane.amaral@ufrgs.br) (M. de Amaral).

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103705>

Received 1 February 2023; Received in revised form 30 August 2023; Accepted 31 August 2023

Available online 11 September 2023

0306-4565/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.



exposure and its dynamics in these cold environments (Rodríguez et al., 2019; Carvajalino-Fernández et al., 2021; Reider et al., 2021). An example is the Colombian frogs of the *Pristimanti* genus found in the Páramo region, which experience freezing nights followed by warmer daytime temperatures (Carvajalino-Fernández et al., 2011). Notably, under experimental freezing conditions, the glucose concentration of three Páramo species has been shown to increase (Carvajalino-Fernández et al., 2021), highlighting the need for further exploration of their still little-explored cold-related adaptations (Carvajalino-Fernández et al., 2011).

The *Boana pulchella* frog, native to subtropical America (Ceil, 1980), inhabits temperate areas of southern Brazil, Uruguay, and Argentina (Frost, 2023). This frog exemplifies a subtropical species experiencing low temperatures during winter, with breeding more frequently occurring during the winter months (Kwet et al., 2004; Maneyro and Carreira, 2012; Curi et al., 2014; Mata, 2015; Oliveira, 2015; Antoniazzi et al., 2019), even under subzero air temperatures (Maneyro, 2008; Santos et al., 2008; Ximenez and Tozetti, 2015). Seasonal metabolic changes observed in previous studies might be associated with its ability to reproduce during winter (de Amaral et al., 2022). Moreover, *B. pulchella* exhibits elevated plasma glucose and glycerol concentrations compared to other anurans, including freeze-tolerant species like *D. chrysoseles* (Do Amaral et al., 2018; de Amaral et al., 2022). However, the metabolic changes in *B. pulchella* during exposure to low temperatures remain unexplored.

Considering the existing knowledge and limited research on subtropical anurans in subtropical zones, this study aims to evaluate the primary metabolic changes in the South American species *B. pulchella* during cold exposure and recovery. The goal is to comprehend how these animals navigate subzero temperatures, focusing on energy substrates and glycolysis pathways. By subjecting *B. pulchella* to laboratory experiments simulating negative temperatures and subsequent re-acclimation, this study seeks to uncover the underlying metabolic dynamics supporting this species.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animal treatment

Male *B. pulchella* frogs ( $n = 18$ ) were collected during fall (April) from 9:00 p.m. to 02:00 a.m. at the UFRGS agronomic experimental station (EEA-UFRGS), Eldorado do Sul city, Brazil (30°06'02.9" S, 51°40'35.0" W). The collection site temperature at the moment of capture was 16.8 °C, and the humidity was 93.1% (measured using a single handheld Kestrel 3500 Weather Meter®). The temperature range during the collection month, registered by the EEA-UFRGS weather station, was 7–27 °C (Datum SIRGAS2000). After capture, the frogs were transported to the lab, bathed in tetracycline 0.05%, and acclimatised for 2 weeks at 5 °C under a 10:14 h light-dark regimen in a temperature-controlled refrigerated incubator (Incubator FOC 225E, VLP SCIENTIFICA®; thermostat TC-900e POWER, Full Gauge Controls®; Supplementary material). This incubator had a system that constantly circulates air to maintain a proper temperature throughout the incubator, eliminating hot and cold spots outside the set temperature. During the acclimation time, the animals were maintained inside ventilated plastic boxes (6 animals per box of 19 x 26 x 12 cm) with moist sphagnum moss and paper towel, and free access to dechlorinated water (which was also sprayed on them every day) and were fed twice weekly with mealworm larvae and small beetles. The temperature inside the boxes was checked with a "K" type thermocouple (EZA TP-01) with a dry bulb connected to a digital thermometer type TM-902c to guarantee that no temperature gradient occurred between the chamber and inside boxes. The acclimation animals' group ( $n = 6$ ) was randomly sampled from this condition after two weeks of acclimation at 5 °C.

For whole animal cooling exposure, the remaining animals undergoing acclimation ( $n = 12$ ) were subjected to a daily temperature

decrease of 1 °C until reaching –2.5 °C. Subsequently, the incubator was set at –4 °C for a 45-min cooling period to induce frog body temperatures below zero. Following this, the incubator temperature was raised to –2.5 °C for 24 h. Twenty-four hours later, six animals from the cooling group were randomly selected ( $n = 6$ ) for sampling. The remaining animals ( $n = 6$ ) were exposed to 5 °C for 24 h and then sampled to form the recovery group (Fig. 1). This chilling exposure protocol was followed and adapted from Do Amaral et al. (2018), Storey and Storey (2019), Al-attar et al. (2020), Zhang et al. (2021), and Varma and Storey (2023).

All animals (acclimation, cooling, and recovery groups) had their body mass (BM; grams) and snout-vent length (SVL; centimetres) quantified. Following the experiments, the frogs were euthanized with 5% lidocaine cream applied to the abdomen, inguinal region, and oral cavity. Blood was collected with heparinised syringes by cardiac puncture. The frogs were quickly dissected over ice, and the liver, heart, brain, and posterior leg muscles were removed. The liver and heart were weighed, and the hepatosomatic index (HSI) and heartsomatic index (HeSI) were calculated following the equation:  $HSI$  or  $HeSI = (\text{tissue weight (mg)} \times \text{total body mass (mg)} - 1) \times 100$ . Liver, muscle, heart, brain, and plasma samples were directly used when the protocol required fresh tissue or stored at –80 °C until used for other protocols.

All frogs used in this study were collected and transported under SISBIO permission (#75475-3). All frogs underwent identical procedures during experiments previously approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Ethics Committee (CEUA-UFRGS #39416).

### 2.2. Righting reflex

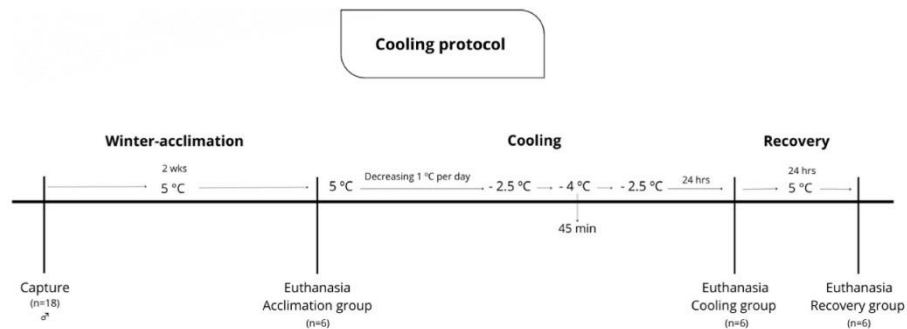
Before euthanasia, each frog underwent a righting reflex assessment, gauging its ability to turn upright when positioned on its back (Goulet et al., 2010). An immediate return to the head-up position defined success. The test concluded if the frog remained supine for 10 s (Harvey et al., 1976). This evaluation verified the frogs' responsiveness during cooling exposure. Test sessions were recorded, and data analysis quantified the time taken for the reflex, measured in milliseconds (ms).

### 2.3. Plasma substrates

Blood was centrifuged at 4 °C and 5000×g for 10 min to isolate plasma. This plasma was transferred and centrifuged at 5000×g for 5 min, resulting in approximately 15 µL of plasma (de Amaral et al., 2022). Commercial enzymatic kits determined glucose (Id-N°:133, LABTEST Diagnóstica®, Brazil), lactate (Id-N°:138, LABTEST Diagnóstica®, Brazil), glycerol (Id-N°:5360, R-Biopharm AG, Germany), urea (Id-N°:27, LABTEST Diagnóstica®, Brazil), and uric acid (Id-N°:140, LABTEST Diagnóstica®, Brazil) levels in the plasma. Measurements were performed using a spectrophotometer (Anthos Zynth 200RT, Bichrom, UK) at specified absorbances, calibrated against kit standards, and reported as millimoles per litre of plasma (mmol/L).

### 2.4. Tissue substrates

Tissue substrates, including glycerol, lactate, total proteins, urea, and triglycerides, were determined by homogenising liver ( $\pm 6$  mg), muscle ( $\pm 8$  mg), heart ( $\pm 10$  mg), and brain ( $\pm 20$  mg) samples in 400 µL of bicarbonate Krebs-Ringer buffer (114 mM NaCl, 2.25 mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.33 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 13 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Hepes, µl:ml Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich®), 10 µl:ml PMSF (Sigma-Aldrich®; pH 7.63). From the homogenised mixture, 100 µL was centrifuged at 2000×g for 10 min at 4 °C, while the remaining 300 µL underwent centrifugation at 20,000×g for 10 min at 4 °C. The ensuing precipitate was designated for glycogen determination (de Amaral et al., 2022; adapted). Following centrifugation, the supernatant was employed for substrate concentration assessment via commercial enzymatic kits (similar to above), and measurements were conducted



**Fig. 1.** Timeline of the cooling exposure protocol performed according to Do Amaral et al. (2018), Storey and Storey (2019), Al-attar et al. (2020), Zhang et al. (2021), and Varma and Storey (2023). The animals ( $n = 18$ ) were collected in southern Rio Grande do Sul. After capture, the animals were brought to the laboratory, and a 2-week acclimation period at 5 °C was initiated. After two weeks, six animals were randomly selected (control animals). The remaining animals were exposed to a gradual temperature decrease (1 °C per day) until reaching -2.5 °C. Following, they were exposed to -4 °C for 45 min before returning to -2.5 °C for 24 h. After 24 h, six animals were euthanised (cooling group). The remaining animals were exposed to 5 °C for 24 h to recover to the acclimation temperature and were euthanised (recovery group).

using a spectrophotometer (Anthos Zenyth 200RT, UK). Calibration curves based on kit standards determined concentrations, reported as milligrams per gram of tissue (mg/g).

## 2.5. Tissue glycogen

The glycogen concentration was determined following the protocols of Van Handel (1965) and de Amaral et al. (2022, adapted). In flasks with the homogenisation precipitate described in Section 2.5, 30% KOH was added and boiled for 60 min at 100 °C. Subsequently, 96% ethanol and 35% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were introduced to facilitate glycogen precipitation, followed by centrifugation for 10 min at 1510 g. The supernatant was discarded, and the precipitate was resuspended in 1 ml of distilled water and 300 µl of 4 N HCl to promote glycogen hydrolysis. After another 60 min of boiling at 100 °C, the pH was neutralised by adding 300 µl of 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Glucose concentration was determined using Glucose Liquiform (Id-N°:133, LABTEST Diagnóstica®, Brazil), with absorbance readings taken on a spectrophotometer (Anthos Zenyth 200RT, UK). Glycogen concentration was evaluated using a calibration curve based on known glycogen standards (Sigma–Aldrich® #G8876), presented as milligrams of glycogen per gram of tissue (mg/g).

## 2.6. Tissue glucose metabolism

### 2.6.1. Glucose oxidation (<sup>14</sup>C-glucose to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>)

Conversion of [U-<sup>14</sup>C]-glucose to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was measured following Torres et al. (2001) and Marqueze et al. (2006). Fresh tissues were sliced ( $\pm 10$  mg liver and  $\pm 90$  mg muscle) and incubated in flasks sealed with rubber caps containing 1 ml of KREBS, 0.1 µCi [U-<sup>14</sup>C] glucose (250 mCi mmol<sup>-1</sup>, PerkinElmer®, USA) and 10 mM unlabeled glucose. The gaseous phase was exchanged with a carbogen mixture (5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>). Small glass wells with 3 MM-Whatman paper strips were placed above the incubation level, and the flasks were sealed with rubber caps. The flasks were incubated in a Dubnoff metabolic shaking incubator for 60 min at 25 °C. The incubation was stopped by adding 0.25 ml of trichloroacetic acid (TCA) 50% through the caps and 0.25 ml of NaOH (2.0 N) inside the glass wells to capture the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced. The flasks were kept at room temperature for 24 h to capture <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in the 3 MM-Whatman paper. The paper contents were transferred to vials with a liquid scintillation mixture (toluene–Triton X®-100 (2:1), 0.4% PPO, 0.01% POPOP). The radioactivity was estimated in an LKB counter liquid-scintillation (LKB-Wallac, USA) with an automatic curve quench correction. The results of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production were expressed as µmol of

<sup>14</sup>C-glucose incorporated into <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> per gram of tissue per hour.

### 2.6.2. <sup>14</sup>C glucose conversion to glycogen (glycogenesis)

Tissue samples utilised in the <sup>14</sup>C glucose incorporation into the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> assay were rinsed in cold KREBS, dried using filter paper, and then introduced into flasks containing 30% KOH. These flasks were subjected to a 60-min boil at 100 °C. Subsequently, 96% ethanol and 35% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were added, followed by centrifugation at 2500 rpm for 10 min. After discarding the supernatant, further centrifugation at 2500 rpm for 10 min was performed following the addition of 70% ethanol. Once more, the supernatant was discarded, and the precipitate was dissolved in distilled water (Thomas et al., 1969). One hundred microliters of this solution were transferred to vials containing a liquid scintillation mixture (toluene–Triton X®-100 (2:1), 0.4% PPO, 0.01% POPOP). Radioactivity was quantified using an LKB counter (LKB-Wallac, USA), and glycogen synthesis was quantified as µmol of <sup>14</sup>C glucose incorporated into glycogen per mg of tissue per hour of incubation.

## 2.7. Data analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad®, USA). The Kolmogorov–Smirnov test was initially employed to assess data distribution, and outliers were identified and excluded using the ROUT method ( $Q = 1\%$ ; Motulsky and Brown, 2006). Parametric data (mass; HSI; HeSI; plasma glucose and glycerol; hepatic glucose oxidation and synthesis; hepatic glycerol, glycogen, urea, and total proteins; muscle glycogen, lactate, urea, uric acid, total protein and triglycerides; heart urea, total proteins and uric acid; and brain urea, lactate, glycogen, total proteins and uric acid) underwent one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Nonparametric data (body temperatures; SVL; plasma lactate, urea, and uric acid; hepatic lactate, triglycerides, and uric acid; muscle glucose oxidation and glycogen synthesis; and heart glycogen and lactate) were analysed using Kruskal–Wallis (KW) followed by Dunn's post hoc test. Parametric data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and nonparametric data are reported as median and 25–75 interquartile range (IQR). Significance was determined at  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

In the temperature variation experiment, all subjects survived, and contrary to expectations, exposure to negative temperatures did not result in the freezing of the animals. Notably, the response to the



righting reflex remained consistent across groups, indicating that the animals' activity levels during subzero temperature exposure mirrored those of the acclimation frogs. This observation strongly suggests that the adopted low-temperature exposure protocol did not trigger the freezing state in *B. pulchella*.

### 3.1. Morphometric parameters

In the acclimation, cooling, and recovery groups, the total body masses (BM) were  $2.85 \pm 0.25$  g,  $3.88 \pm 0.1677$  g, and  $3.27 \pm 0.21$  g (Table 1). The cooling animals exhibited significantly higher body mass than the acclimation group ( $P = 0.0124$ , Tukey's post hoc test). However, snout-vent length (SVL), hepatosomatic index (HSI), and heartsomatic index (HeSI) did not show significant inter-group variations.

### 3.2. Plasma substrates

Plasma urea concentration significantly differed between acclimation and cooling animals ( $P = 0.0331$ , Fig. 2; Tukey's post hoc test), with cooling animals displaying a 31% reduction in urea concentration compared to acclimation animals. A similar trend was observed in acid uric concentration, with cooling animals exhibiting a 31% decrease compared to acclimation animals. No significant differences between the groups were noted in plasma concentrations of glucose, glycerol, and lactate (Table 2).

### 3.3. Tissue substrates

#### 3.3.1. Liver

Hepatic concentrations of glycogen, glycerol, lactate, total proteins, triglycerides, uric acid, and urea did not exhibit inter-group differences. The results are summarised in Table 3.

#### 3.3.2. Muscle

Muscle glycogen, lactate, triglycerides, and uric acid concentrations did not differ significantly between groups (Fig. 3a, b, d, e). Notably, total muscle proteins differed significantly between cooling and recovery groups ( $P = 0.0151$ , Tukey's post hoc test; Fig. 3c), with a 3.42-fold increase observed in recovery animals. Urea concentration showed a statistically significant difference between the acclimation and cooling groups ( $P = 0.0011$ , Tukey's post hoc test; Fig. 3f), revealing a 51% decrease in cooling animals compared to acclimation animals.

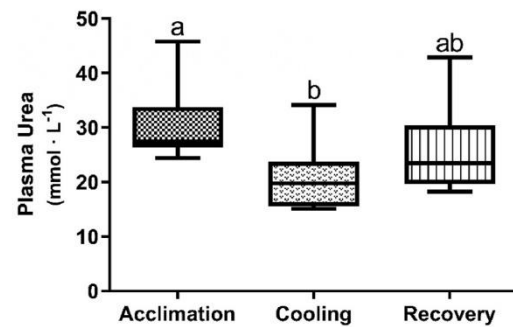
#### 3.3.3. Heart

Total proteins in the heart demonstrated a significant difference between cooling and recovery groups ( $P = 0.0079$ , Tukey's post hoc test; Fig. 4c), with a 45% reduction in concentration during cooling. A similar pattern was observed in uric acid concentrations, differing significantly between the cooling and recovery groups ( $P = 0.0122$ , Tukey's post hoc test; Fig. 4d), with cooling animals showing a 44% lower concentration

**Table 1**  
Morphometric parameters of *Boana pulchella* in acclimation, cooling and recovery groups.

	Acclimation	Cooling	Recovery	P
<b>BM (g)</b>	$2.85 \pm 0.25^a$	$3.88 \pm 0.16^b$	$3.27 \pm 0.21^{ab}$	0.0124*
<b>SVL (cm)</b>	3.72 (3.63–3.78)	4.05 (3.93–4.13)	3.77 (3.6–4.12)	0.0553
<b>HSI</b>	$1.89 \pm 0.09$	$2.24 \pm 0.09$	$1.90 \pm 0.16$	0.1016
<b>HeSI</b>	$0.30 \pm 0.01$	$0.31 \pm 0.01$	$0.28 \pm 0.02$	0.5733

Note: Total body mass (BM), snout-vent length (SVL), hepatosomatic index (HSI) and heartsomatic index (HeSI). Results are expressed as the mean and respective standard error of the mean (SEM), or the median and 25–75 percentiles. One-way ANOVA (Tukey post hoc) or Kruskal-Wallis tests (Dunn post hoc) were used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ . Different letters indicate a significant difference in each experimental group: acclimation n = 6, cooling n = 6, recovery n = 6.



**Fig. 2.** Urea plasma concentrations of *Boana pulchella* in acclimation, cooling and recovery groups. Results are expressed as the median and 25–75 percentiles. Kruskal-Wallis test (Dunn's post hoc) was used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ . Different letters indicate a statistically significant difference in each experimental group: acclimation n = 5, cooling n = 5, recovery n = 5.

**Table 2**  
Plasma metabolites between the acclimation, cooling and recovery groups of *B. pulchella*.

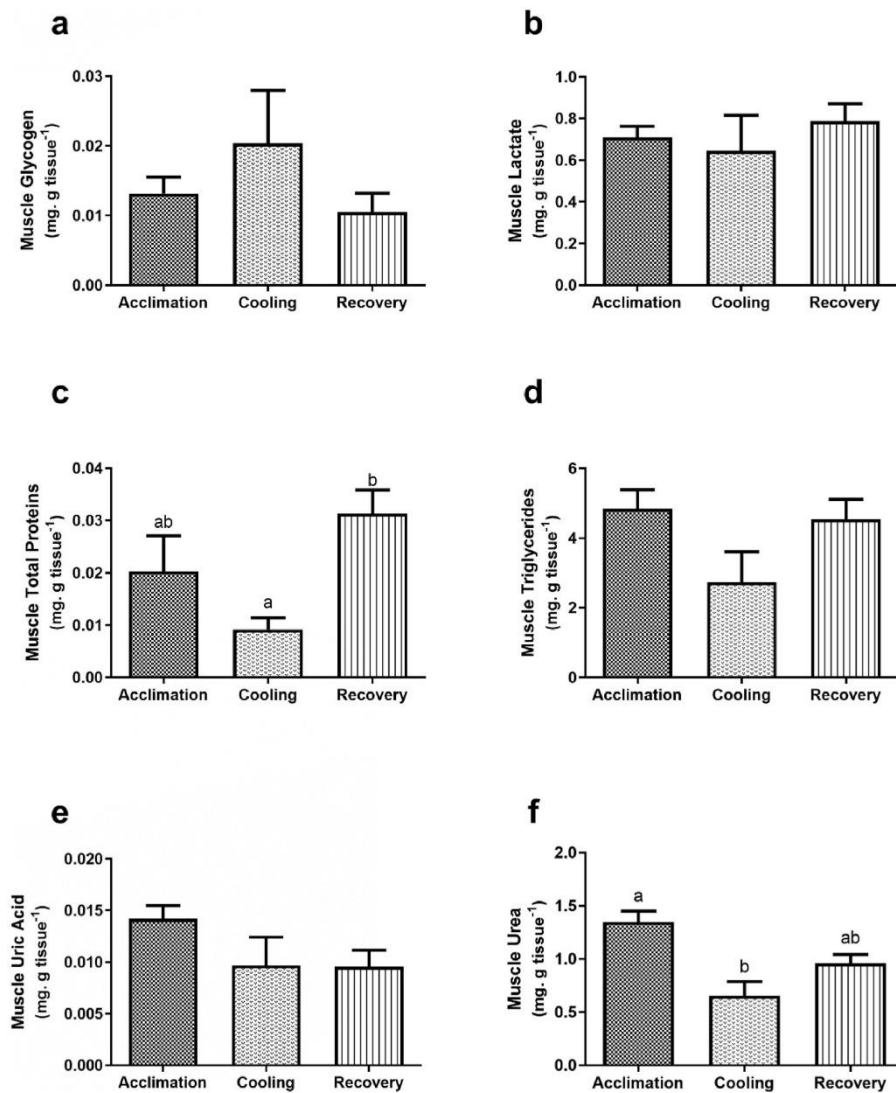
	Acclimation	Cooling	Recovery	P
<b>Glucose</b> (mmol · mL <sup>-1</sup> )	$0.738 \pm 0.049$	$0.835 \pm 0.093$	$0.781 \pm 0.050$	0.6060
<b>Glycerol</b> (mmol · mL <sup>-1</sup> )	$2.817 \pm 0.179$	$2.728 \pm 0.291$	$2.783 \pm 0.038$	0.9509
<b>Lactate</b> (mmol · mL <sup>-1</sup> )	4.305 (3.98–7.28)	5.500 (3.95–7.73)	5.265 (3.19–7.11)	0.7831
<b>Uric Acid</b> (mmol · mL <sup>-1</sup> )	55.87 (51.1–108.3)	43.6 (38.15–68.13)	55.87 (45.64–83.12)	0.2000

Note: Results are expressed as the mean and respective standard error of the mean (SEM) or the median and 25–75 percentiles. One-way ANOVA (Tukey's post hoc test) or Kruskal-Wallis test (Dunn's post hoc) were used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ ; acclimation n = 6, cooling n = 6, recovery n = 6.

**Table 3**  
Liver substrates of *Boana pulchella* acclimation, cooling and recovery groups.

	Acclimation	Cooling	Recovery	P
<b>Glycogen</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	$0.776 \pm 0.138$	$1.282 \pm 0.186$	$1.105 \pm 0.188$	0.1528
<b>Glycerol</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	$3.658 \pm 0.965$	$2.882 \pm 0.209$	$2.659 \pm 0.2587$	0.5052
<b>Lactate</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	0.264 (0.044–0.994)	0.371 (0.360–1.169)	0.338 (0.274–0.4675)	0.0746
<b>Total proteins</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	$0.309 \pm 0.087$	$0.383 \pm 0.143$	$0.225 \pm 0.027$	0.5401
<b>Triglycerides</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	19.72 (12.93–37.1)	21.42 (19.49–25.27)	22.06 (19.48–23.54)	0.9579
<b>Uric Acid</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	0.082 (0.074–0.277)	0.099 (0.076–0.129)	0.113 (0.091–0.1418)	0.7807

Note: Results are expressed as the mean and respective standard error of the mean (SEM), or the median and 25–75 percentiles. One-way ANOVA (Tukey's post hoc test) or Kruskal-Wallis test (Dunn's post hoc) were used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ ; acclimation n = 5, cooling n = 4–5, recovery n = 5.



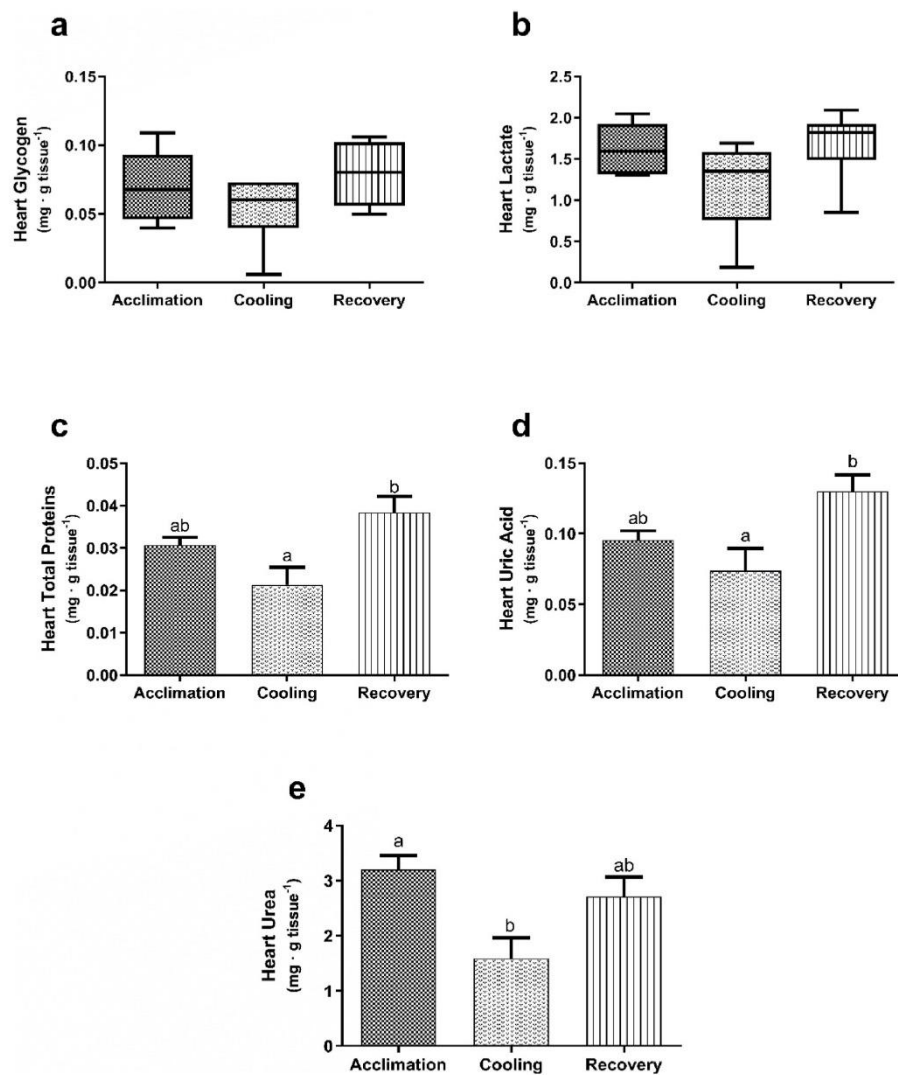
**Fig. 3.** Muscle substrates of *Boana pulchella* in acclimation, cooling and recovery. Glycogen concentration (a), lactate (b), total proteins (c), triglycerides (d), uric acid (e), and urea (f). Results are expressed as the mean and respective standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA (Tukey's post hoc) was used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ . Different letters indicate a statistically significant difference in each experimental group: acclimation  $n = 5-6$ , cooling  $n = 5$ , recovery  $n = 5$ .

than recovery animals. Urea concentration also displayed a significant difference between groups, as the cooling group exhibited lower levels compared to the recovery group ( $P = 0.0092$ , Tukey's post hoc test; Fig. 4e). However, heart glycogen and lactate levels remained consistent across groups (Fig. 4a and b).

#### 3.3.4. Brain

Brain urea concentration was statistically different between groups. The cooling ( $P = 0.0417$ , Tukey's post hoc test) and recovery ( $P =$

$0.0133$ , Tukey's post hoc test) groups displayed lower concentrations compared to the acclimation group (Fig. 5). Specifically, cooling animals showed a 22% lower urea concentration than recovery animals, and recovery animals exhibited a 28% lower concentration than acclimation animals. The brain's glycogen, lactate, total protein, and uric acid concentrations remained constant (Table 4).



**Fig. 4.** Heart substrates of *Boana pulchella* in acclimation, cooling and recovery groups. Glycogen concentration (a), lactate (b), total proteins (c), uric acid (d), and urea (e). Results are expressed as the mean and respective standard error of the mean (SEM) or the median and 25–75 percentiles. One-way ANOVA (Tukey's post hoc) or Kruskal-Wallis test (Dunn's post hoc) were used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ . Different letters indicate a statistically significant difference in each experimental group: acclimation  $n = 6$ , cooling  $n = 5-6$ , recovery  $n = 6$ .

### 3.4. Glucose metabolism

#### 3.4.1. Liver

Liver oxidation changed in the cooling and recovery groups compared to the acclimation group ( $P < 0.0001$ , Tukey's post hoc test; Fig. 6a). Animals in the acclimation group displayed the highest glucose oxidation levels, being 8.25-fold higher than cooling group levels and 10.44-fold higher than recovery group levels. Glycogen synthesis from glucose also varied significantly, with the acclimation group exhibiting higher levels than the cooling and recovery groups ( $P < 0.0001$ , Tukey's

post hoc test; Fig. 6b). Glycogenesis in the acclimation group increased by 231% compared to cooling group levels and 341% compared to recovery group levels.

#### 3.4.2. Muscle

While no significant differences were observed in glucose oxidation between groups, cooling group levels were comparatively lower (Fig. 7a). Muscle glycogenesis differed between the acclimation and recovery groups ( $P = 0.0331$ , Dunn's post hoc test; Fig. 7b), revealing reduced glycogen formation in the recovery group compared to the



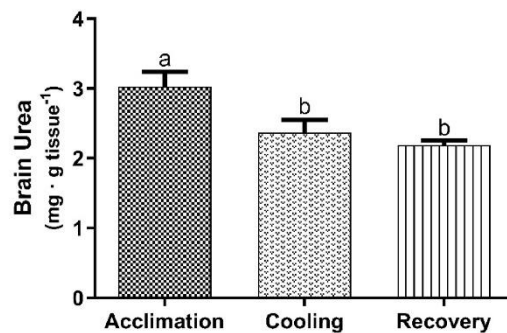


Fig. 5. Urea brain concentrations of *Boana pulchella* in acclimation, cooling and recovery groups. Results are expressed as the mean and respective standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA (Tukey's post hoc) was used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ . Different letters indicate a statistically significant difference in each experimental group: acclimation  $n = 6$ , cooling  $n = 6$ , recovery  $n = 5$ .

Table 4  
Brain substrates of *Boana pulchella* in acclimation, cooling and recovery groups.

	Acclimation	Cooling	Recovery	<i>P</i>
<b>Glycogen</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	0.057 ± 0.003	0.041 ± 0.01	0.066 ± 0.011	0.1620
<b>Lactate</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	1.965 ± 0.116	2.181 ± 0.115	1.829 ± 0.117	0.1328
<b>Total proteins</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	0.023 ± 0.001	0.023 ± 0.002	0.026 ± 0.001	0.3535
<b>Uric Acid</b> (mg · g <sup>-1</sup> )	0.065 ± 0.006	0.066 ± 0.006	0.052 ± 0.005	0.2354

Note: Results are expressed as the mean and respective standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA (Tukey's post hoc test) was used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ . Different letters indicate a significant difference in each experimental group; acclimation  $n = 6$ , cooling  $n = 5-6$ , recovery  $n = 6$ .

acclimation group.

#### 4. Discussion

The study of cold hardiness among ectotherms has been extensively documented in temperate climate frogs (Storey and Storey, 2013).

However, the physiological responses to cooling exposure in subtropical and tropical frogs remain relatively unexplored. Recent research has focused on thermal biology (Reider et al., 2021) and glucose concentration/ice formation (Carvajalino-Fernández et al., 2021) during negative temperature exposure in high-elevation tropical frogs. Nonetheless, the metabolic adaptations of subtropical frogs in subtropical zones with pronounced seasonal temperature fluctuations remain poorly understood. Our study delved into the metabolic changes during cooling exposure and recovery in the southern American frog *Boana pulchella*. Following 24 h of subzero temperature exposure, *B. pulchella* individuals did not show signs of freezing and retained their reflexes. The acclimation to 5 °C, cooling, and subsequent recovery induced distinct substrate concentrations when contrasted with those of wild animals collected during winter (De Amaral et al., 2022), underscoring the role of temperature in shaping both tissue and plasma metabolite levels. Notably, the cooling-exposed animals demonstrated reduced urea concentrations in plasma, muscle, heart, and brain, in conjunction with decreased hepatic glycolysis and glycogenesis from glucose compared to the 5 °C acclimation group. These observations suggest an evolutionary adaptive response in *B. pulchella* that reflects its ability to tolerate brief negative temperature exposures while remaining active during winter (Basso, 1990; Peltzer and Lajmanovich, 2007; Canavero et al., 2008; López et al., 2011; de Amaral et al., 2022).

It is essential to contextualise the species' ecological context to gain insights into the metabolic changes prompted by cooling exposure. *Boana pulchella*'s natural habitat witnesses briefer negative temperature spans compared to freeze-tolerant frogs inhabiting temperate regions (Storey, 1984; De Amaral et al., 2022). In this habitat, winter temperatures typically dip to zero degrees Celsius overnight, only to rebound within hours (Maluf, 2000; Bergamaschi et al., 2013)—a pattern akin to high-elevation tropical areas (Reider et al., 2021; Carvajalino-Fernández et al., 2021). This context likely accounts for *B. pulchella*'s capacity to evade freezing and sustain reflexes in subzero air temperatures. However, the physiological and behavioural mechanisms underlying this resilience in species active during winter or intermittently exposed to subzero temperatures remain underexplored. Addressing this gap, further studies concentrating on species adapted to fleeting negative-temperature periods could shed light on additional physiological adaptations that facilitate non-frozen states in winter-active frogs. Additionally, employing a protocol to assess body temperatures during subzero conditions through methods like thermal cameras (Tattersall, 2016), temperature measurement techniques (Burrows et al., 2020), and frost tolerance assessments (Reider et al., 2021) could unravel the nuances of *B. pulchella*'s thermal physiology and its avoidance of freezing. Furthermore, quantifying how this species responds to progressively lower temperatures using techniques such as ice body

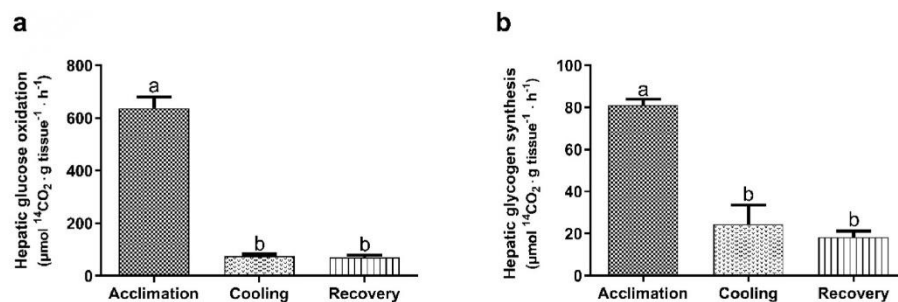


Fig. 6. Liver glucose metabolism of *Boana pulchella* in acclimation, cooling and recovery groups; (a) liver oxidation of glucose to CO<sub>2</sub> and (b) liver glycogen synthesis from glucose. Results are expressed as the mean and respective standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA (Tukey's post hoc) was used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ . Different letters indicate a statistically significant difference in each experimental group: acclimation  $n = 6$ , cooling  $n = 6$ , recovery  $n = 6$ .

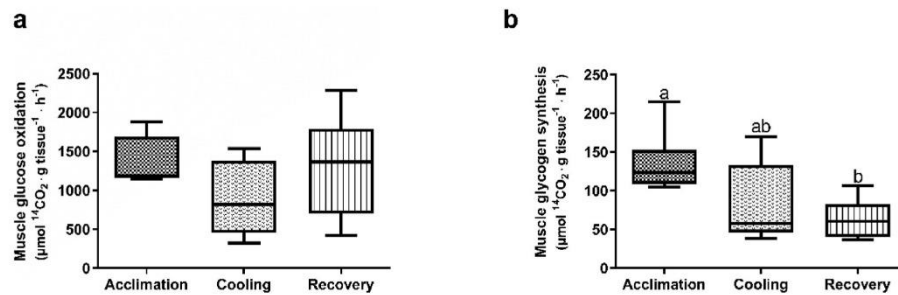


Fig. 7. Muscle glucose metabolism of *Boana pulchella* in acclimation, cooling and recovery groups; (a) muscle oxidation of glucose to CO<sub>2</sub> and (b) muscle glycogen synthesis from glucose. Results are expressed as median and 25–75 percentiles. Kruskal-Wallis test (Dunn's post hoc) was used for data analysis, and the results were considered different when  $p \leq 0.05$ . Different letters indicate a significant difference in each experimental group: acclimation  $n = 6$ , cooling  $n = 6$ , recovery  $n = 6$ .

quantification via calorimetry (Carvajalino-Fernández, 2021) could offer insights into the dynamics of *B. pulchella*'s non-freezing mechanisms.

The metabolic insights derived from our study provide valuable information about how winter-active frogs manage their physiological responses during cooling exposure. The diminished urea concentrations observed across multiple tissues in cooling-exposed *B. pulchella* individuals suggest that urea might not serve as a cryoprotectant in this species, consistent with similar findings (Costanzo and Lee, 2005). Similarly, parallels can be drawn with *Nanorana parkeri*, a frog endemic to the Tibetan Plateau, wherein lowered urea levels during winter were associated with decreased metabolic rates and delayed internal fuel depletion (Niu et al., 2022). Furthermore, the cooling-exposed frogs exhibited lower total protein concentrations in the heart and skeletal muscles than those in the recovery phase. This pattern aligns with heightened proteolysis reported in *Lithobates sylvaticus* frogs during winter (Costanzo et al., 2013), indicating *B. pulchella*'s potential to conserve energy and prevent hyperuremia by minimising protein catabolism during colder periods, thus safeguarding vital tissues like muscles and the heart.

Frogs can encounter dehydrating conditions in subzero temperatures (Costanzo and Lee, 2005), prompting urea accumulation, a universal response to hydro-osmotic challenges (Shpun et al., 1992; Jørgensen, 1997). However, Costanzo and Lee (2005) observed that overwintering wood frogs' urea levels markedly decreased as environmental water availability increased (Costanzo and Lee, 2005). It is pertinent to highlight that all experimental groups in this study were afforded unrestricted access to water during exposure, mitigating potential osmotic challenges and providing a rationale for the absence of increased urea levels. Despite this, further investigations are required to elucidate the mechanisms governing the reduction in urea concentrations during cooling and recovery in *B. pulchella*. It is worth noting that while our study maintained *B. pulchella* in winter-acclimated conditions under moist environments, the possibility of urea accumulation in natural settings such as winter or during dry exposure to cold temperatures remains an avenue for exploration.

Alternatively, in the face of osmotic challenges, frogs could employ uric acid as an alternative nitrogen waste conversion strategy, transforming it into a soluble and inert osmotic form, as it occurs with *Phyllomedusa sauvagii* (Shoemaker et al., 1972) and seasonally in the Australian tree frog *Litoria infrafrenata* (Young et al., 2012). Elevated uric acid and total protein concentrations in the heart during recovery, coupled with consistent urea concentrations between cooling and recovery, hint at a potential transformation of nitrogen waste originating from protein catabolism into uric acid to prevent osmotic damage to heart tissue.

Furthermore, the cooling exposure exerted distinct effects on

glycolysis and glycogenesis in the muscle and liver of *B. pulchella*, suggesting potential tissue-specific glycolytic adaptations. In contrast to the acclimation group, the observed lower rates of liver glycogen synthesis and glucose oxidation during both cooling and recovery likely indicate reduced glucose utilisation in this tissue, possibly as a strategy to uphold glycogen concentrations throughout this period. It is also noteworthy that winter-collected frogs exhibited higher glycogen concentrations when compared to all groups in our study (de Amaral et al., 2022), underscoring the significance of preserving these limited stores. Evidence suggests a diminished flux through the hepatic glycolytic pathway in overwintering frogs, influenced by factors like temperature and oxygen availability (Donohoe and Boutilier, 1998; Storey and Storey, 1990; Tattersall and Ultsch, 2008), with cold temperature being the main driver in freeze-intolerant frogs (Pinder et al., 1992). Collectively, these findings suggest that lower temperatures, particularly below 5 °C, promote decreased glucose utilisation for both storage and oxidation in the liver tissue of *B. pulchella*.

In contrast, glucose oxidation in the muscle remained consistent across groups. Aerobic glycolysis is a time and energy-efficient cellular process (Melkonian and Schury, 2022), so maintaining this pathway in active muscle is reasonable. Furthermore, we observed a decrease in glycogen synthesis in the recovery group compared to the acclimation group. Temperature may influence hormonal controls associated with energy sources, namely lactate, glucose, and glycogen, in skeletal muscle stores (Petersen and Gleeson, 2011). In the recovery phase, the reduced glycogen synthesis, coupled with consistent glycogen concentrations relative to the acclimation group, may indicate a metabolic shift where lactate, as opposed to glucose, is being re-purposed and converted into glycogen (Fournier and Guderley, 1992). These substrate adjustments support the sustained muscle activity required for continuous movement, foraging, mate selection, and predator evasion.

The absence of notable changes in glucose, glycerol, triglycerides, and lactate concentrations implies minimal shifts in these metabolites in *B. pulchella* frogs during cooling. Nevertheless, the animals exhibited heightened plasma glycerol levels, reduced glucose levels, and elevated liver triglyceride concentrations across all groups compared to the winter-collected field specimens (de Amaral et al., 2022). That indicates that a 5 °C acclimatisation, cooling, and recovery induces distinct metabolite modulation compared to winter field animals, potentially playing a crucial role in supplying the necessary energy to fulfil heightened energy requirements during lower temperatures. Comparable trends have been observed in the *Litoria ewingii* frog, wherein increased plasma glycerol concentrations during freezing exposure indicate glycerol's potential cryoprotective role (Rexer-Huber et al., 2011). That aligns with the cryoprotective function of glycerol in other frog species, such as *Hyla chrysocelis* and *Hyla versicolor* (Storey and Storey, 1985; Layne, 1999; Zimmerman et al., 2007), during freezing



M. de Amaral et al.

exposure.

Additionally, the glycerol component within triglycerides could be a primary precursor in gluconeogenesis and glycogen synthesis (Sunny and Bequette, 2011). Consequently, elevated hepatic triglyceride levels during cold exposure could potentially serve as a glycerol source, significantly sustaining energy supplies amid cold conditions. Hence, we postulate that these frogs might synthesise cryoprotectants if they exhibit freeze tolerance when subjected to freezing. In-depth investigations are warranted to shed light on this hypothesis and unravel the intricate dynamics that unfold during freezing within this species.

## 5. Conclusions

In summary, our study subjected the South American frog *Boana pulchella* to cold exposure and subsequent recovery, elucidating changes in substrates within plasma and tissues during these conditions. Despite 24 h at  $-2.5^{\circ}\text{C}$ , frogs remained unfrozen, suggesting unexamined adaptations or experimental limitations. Nevertheless, the observed substrate alterations during cooling exposure underscore distinct physiological responses. This resilience against subzero temperatures likely arises from species-specific adaptations facilitating survival in an environment characterised by brief periods of negative temperatures. The investigation reveals organ-specific reactions to varying temperature exposures. Notably, cooling-exposed frogs exhibited reduced urea concentrations in plasma and tissues, reflecting the need for lowered osmolyte levels in cold conditions. The diminished hepatic glucose metabolism during cooling exposure may indicate energy conservation or alternative substrate utilisation for energy production. Furthermore, the cooling ecology of subtropical frogs may align with lineages experiencing episodic daily cooling/freezing, like Páramo frog species (Carvajalino-Fernández et al., 2021). This study opens avenues for exploring the thermal capacity and adaptations of subtropical frogs. Further investigations could uncover unexplored mechanisms driving freezing resistance and enhance our understanding of subzero adaptations.

## Funding sources

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq through a doctoral's grant awarded to the first author (process #142176/2020-6).

## CRediT authorship contribution statement

**Marjoriane de Amaral:** Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Formal analysis, Investigation, Formal analysis, Conceptualization, Visualization, Writing – original draft. **Maiza Cristina Von Dentz:** Investigation. **Leonardo Airton Ressel Simões:** Investigation. **Éverton Vogt:** Investigation. **Dener Heiermann:** Resources. **Pedro Fischer:** Resources. **Patrick Colombo:** Project administration, Investigation, Resources. **Luiz Carlos Kucharski:** Conceptualization, Project administration, Resources, Investigation, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103705>.

Journal of Thermal Biology 117 (2023) 103705

## References

- Al-Attar, R., Storey, K.B., 2022. Lessons from nature: leveraging the freeze-tolerant wood frog as a to improve organ cryopreservation and biobanking. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochemistry and Molecular Biology* 261, 110747. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2022.110747>.
- Al-Attar, R., Wu, C.-W., Biggar, K.K., Storey, K.B., 2020. Carb-loading: freeze-induced activation of the glucose-responsive ChREBP transcriptional network in wood frogs. *Physiol. Biochem. Zool.* 93 (2020), 49–61. <https://doi.org/10.1086/706463>.
- Antoniazzi, C.E., López, J.A., Ghirardi, R., Armando, A.P., 2019. Biología reproductiva de *Boana pulchella* y *Boana punctata* (Anura: hylidae) en poblaciones simpátricas de humedales templados. *Caldasia* 41 (2), 245–256. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v41n2.76>.
- Basso, N.G., 1990. Estrategias adaptativas en una comunidad subtropical de anuros. In: Cuadernos de Herpetología, Serie Monografías, vol. 1. Asociación Herpetológica Argentina, La Plata, Argentina, pp. 3–70.
- Bergamaschi, H., de Melo, R.W., Guadagnin, M.R., Cardoso, L.S., et al., 2013. Boletins agrometeorológicos da estação experimental agrônoma da UFRRS, série histórica 1970–2012, 1, pp. 2–7. [https://www.ufrrs.br/agronomia/journals/files/EEA/Srie\\_Meteorologica\\_da\\_EEA-UFRRS.pdf](https://www.ufrrs.br/agronomia/journals/files/EEA/Srie_Meteorologica_da_EEA-UFRRS.pdf) (Accessed on 11 September 2023).
- Berman, D.I., Bulakhova, N.A., Meshcheryakova, E.N., 2019. The Siberian wood frog survives for months underwater without oxygen. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31974-6>.
- Both, C., Solé, M., dos Santos, T.G., et al., 2009. The role of spatial and temporal descriptors for neotropical tadpole communities in southern Brazil. *Hydrobiologia* 624 (2009), 125–138. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9685-5>.
- Bullock, T.H., 1955. Compensation for temperature in the metabolism and activity of poikilotherms. *Biol. Rev.* 30 (3), 311–342. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1955.tb01211.x>.
- Burrows, P.A., Navas, C.A., Jiménez Robles, O., Delgado, P., De la Riva, I., 2020. Climatic Heterogeneity in the Bolivian Andes: Are Frogs Trapped? *South American Journal of Herpetology* 18 (1), 1–12. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-18-00047.1>.
- Canavero, A., Arim, M., Naya Monteverde, D.E., 2008. Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. *N. West. J. Zool.* 4 (1), 29–41.
- Carvajalino-Fernández, J.M., Gomez, M.A.B., Navas, C.A., 2011. Freezing risk in tropical high elevation Anurans: an assessment based on the andean frog *Pristimantis nervicus* (strobomantidae). *S. Am. J. Herpetol.* 6 (2), 73–78. <https://doi.org/10.2994/057.006.0205>.
- Carvajalino-Fernández, J.M., Bonilla Gomez, M.A., Giraldo-Gutiérrez, L., Navas, C.A., 2021. Freeze tolerance in neotropical frogs: an intragenetic comparison using *Pristimantis* species of high elevation and medium elevation. *J. Trop. Ecol.* 37, 118–125. <https://doi.org/10.1017/S026646742100016X>.
- Cei, J.M., 1980. Amphibians of Argentina. In: *Monitore Zoologica Italiano*, vol. 2. New Series Monografia, Firenze, Italia, pp. 1–609. <https://doi.org/10.1163/156853881X00465>.
- Cogălniceanu, D., Băncilă, R.I., Plăiașu, R., Roșioru, D., Merilä, J., 2017. Small-scale spatial and temporal variation of life history traits of common frogs (*Rana temporaria*) in sub-Arctic Finland. *Polar Biol.* 40 (8), 1581–1592. <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2081-8>.
- Costanzo, J.P., 2019. Overwintering adaptations and extreme freeze tolerance in a subarctic population of the wood frog, *Rana sylvatica*. *J. Comp. Physiol. B* 189 (1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1189-7>.
- Costanzo, J.P., Lee Jr., R.E., 2005. Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog. *J. Exp. Biol.* 208 (21), 4079–4089. <https://doi.org/10.1242/jeb.01859>.
- Costanzo, J.P., Lee, R.E., Lortz, P.H., 1993. Glucose concentration regulates freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *J. Exp. Biol.* 181 (1), 245–255. <https://doi.org/10.1242/jeb.181.1.245>.
- Costanzo, J.P., do Amaral, M.C.F., Rosendale, A.J., Lee Jr., R.E., 2013. Hibernation physiology, freezing adaptation and extreme freeze tolerance in a northern population of the wood frog. *J. Exp. Biol.* 216 (18), 3461–3473. <https://doi.org/10.1242/jeb.089342>.
- Cowan, K.J., Storey, K.B., 2001. Freeze-thaw effects on metabolic enzymes in wood frog organs. *Cryobiology* 43 (1), 32–45. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2338>.
- Curi, L.M., Céspedes, J.A., Álvarez, B.B., 2014. Composición, distribución espacial y actividad de vocalización de un ensamble de anuros dentro de la región fitogeográfica del Chaco Oriental. *Rev. Mex. Biodivers.* 85, 1197–1205. <https://doi.org/10.7550/rmb.43381>.
- De Amaral, M., Von Dentz, M.C., Ohlweiler, R., Hoff, M.L.M., Heiermann, D., Colombo, P., Kucharski, L.C., 2022. Seasonal variations in the intermediate metabolism in South American tree-frog *Boana pulchella*. *J. Comp. Physiol. B* 192 (2), 297–311. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01420-7>.
- Do Amaral, M., Frisbie, J., Goldstein, D.L., Krane, C.M., 2018. The cryoprotectant system of Cope's gray treefrog, *Dryophytes chrysoscelis*: responses to cold acclimation, freezing, and thawing. *J. Comp. Physiol. B* 188 (4), 611–621. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1153-6>.
- Donohoe, P.H., Boutilier, R.G., 1998. The protective effects of metabolic rate depression in hypoxic cold submerged frogs. *Respir. Physiol.* 111 (3), 325–336. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(97\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(97)00125-4).
- Duarte, L.S., Machado, R.E., Hartz, S.M., Pillar, V.D., 2006. What saplings can tell us about forest expansion over natural grasslands. *J. Veg. Sci.* 17 (6), 799–808. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2006.tb02503.x>.
- Duellman, W.E., 1999. Distribution patterns of amphibians in South America. In: *Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective*. Johns Hopkins, Baltimore, pp. 255–328.



- Fournier, P.A., Guderley, H., 1992. Metabolic fate of lactate after vigorous activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 262 (2), R245–R254. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.262.2.R245>.
- Frost, D.R., 2023. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1. <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php/Amphibia/Anura/Hylidae/Cophomantinae/Boana/Boana-pulchella>. (Accessed 30 March 2023).
- Geise, W., Linsenmair, K.E., 1986. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, anura, Hyperoliidae) to its arid environment. *Oecologia* 68 (4), 542–548. <https://doi.org/10.1007/BF00378769>.
- Goulet, F., Hélie, P., Vachon, P., 2010. Eugenol anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights. *JAALAS* 49 (4), 460–463.
- Harvey, C.B., Ellis, C., Tate, M., 1976. Inhibition of the righting reflex in the common bullfrog (*Rana catesbeiana*) employing an operant-avoidance procedure. *Bull. Psychonomic Soc.* 7 (1), 57–58. <https://doi.org/10.3758/BF03337120>.
- Hill, R.W., Wyse, G.A., 1989. *Animal Physiology*. Harper Collins Publishers, Inc, New York, pp. 76–135.
- Hutchison, V.H., Haines, H.B., Engbreton, G., 1976. Aquatic life at high altitude: respiratory adaptations in the Lake Titicaca frog, *Telmatobius culeus*. *Respir. Physiol.* 27 (1), 115–129. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(76\)90022.0](https://doi.org/10.1016/0034-5687(76)90022.0).
- Jackson, D.C., Ullsch, G.R., 2010. Physiology of hibernation under the ice by turtles and frogs. *J. Exp. Zool.: Ecological Genetics and Physiology* 313 (6), 311–327. <https://doi.org/10.1002/jez.603>.
- Joaniss, D.R., Storey, K.B., 1996. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 271 (3), R545–R553. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.3.R545>.
- Jørgensen, C.B., 1997. Urea and amphibian water economy. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiology* 117 (2), 161–170. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00356-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00356-8).
- Kwet, A., Aquino, L., Lavilla, E., di Tada, I., 2004. *Boana pulchella* (Duméril & Bibron, 1841). The IUCN Red List of Threatened Species 2004 doi: 10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55619A11340514.en.
- Layne Jr., J.R., 1999. Freeze tolerance and cryoprotectant mobilization in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). *J. Exp. Zool.* 283 (3), 221–225. <https://doi.org/10.1002/jez.1030>.
- López, J.A., Scarabottti, P.A., Ghirardi, R., 2011. Seasonal patterns of abundance and recruitment in an amphibian assemblage from the Paraná River floodplain. *Interciencia* 36 (7), 538–544.
- Maluf, J.R.T., 2000. Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Agrometeorol.* 8, 141–150.
- Maneyro, R., 2008. Padrões de atividade espaço-temporal em uma assembleia neotropical de anuros (Doctoral dissertation, PhD Dissertation, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil).
- Maneyro, R., Carrera, S., 2012. Guía de anfibios del Uruguay. Ediciones de la Fuga.
- Marqueze, A., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2006. Effects of anoxia and post anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 332 (2), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.11.009>.
- Mata, C., 2015. Riqueza, abundância, composição de espécies e distribuição temporal de uma comunidade de anfibios anuros no Parque Eólico de Osório. In: Rio Grande do Sul, sul do Brasil. & Composição de espécies de anuros da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. <https://hmc.ufrgs.br/handle/10183/131741>. (Accessed 6 June 2023).
- Melkonian, E.A., Schury, M.P., 2022. Biochemistry, anaerobic glycolysis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing, p. 2022 [Updated 2022 Aug 8].
- Motulsky, H.J., Brown, R.E., 2006. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression—a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinf.* 7 (1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-123>.
- Nguyen, T.D., 2017. Regulation of Glutamate Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase in the Freeze Tolerant Wood Frog. Doctoral dissertation, Carleton University, *Rana sylvatica*.
- Niu, Y., Chen, Q., Storey, K.B., Teng, L., Li, X., Xu, T., et al., 2022. Physiological ecology of winter hibernation by the high-altitude frog *Nanorana parkeri*. *Physiol. Biochem. Zool.* 95, 201–211. <https://doi.org/10.1086/718764>.
- Oliveira, V., 2015. Distribuição espaço-temporal de anfibios anuros em uma localidade da serra do sudeste, pampa gaúcho. TCC.
- Orizaola, G., Quintela, M., Laurila, A., 2010. Climatic adaptation in an isolated and genetically impoverished amphibian population. *Ecography* 33 (4), 730–737. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.06033.x>.
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, C.R., 2007. Amphibians. In: Iriando, M.H., Paggi, J.C., Parma, M.J. (Eds.), *El Río Paraná Medio*. Springer, Heidelberg, Berlin, pp. 327–340.
- Petersen, A.M., Gleason, T.T., 2011. Acclimation temperature affects the metabolic response of amphibian skeletal muscle to insulin. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 160 (1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.005>, 2011 Sep.
- Pimm, S.L., Jenkins, C.N., Abell, R., Brooks, T.M., Gittleman, J.L., Joppa, L.N., Sexton, J. O., 2014. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science* 344 (6187), 1246752. <https://doi.org/10.1126/science.1246752>.
- Pinder, A.W., Storey, K.B., Ullsch, G.R., 1992. Estivation and hibernation. In: *Environmental Physiology of the Amphibians*, vol. 250. University of Chicago Press, pp. 250–274.
- Reider, K.E., Larson, D.J., Barnes, B.M., Donnelly, M.A., 2021. Thermal adaptations to extreme freeze-thaw cycles in the high tropical Andes. *Biotropica* 53 (2021), 296–306. <https://doi.org/10.1111/btp.12875>.
- Rexer Huber, K.M., Bishop, P.J., Wharton, D.A., 2011. Skin ice nucleators and glycerol in the freeze-tolerant frog *Litoria ewingii*. *J. Comp. Physiol. B* 181 (6), 781–792. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0561-7>.
- Rodríguez, C.Y., Bustos, D.A., Sanabria, E.A., 2019. Adaptation of the andean toad *Rhinella spinulosa* (Anura: bufonidae) at low temperatures: the role of glucose as cryoprotectant. *Physiol. Biochem. Zool.* 92 (5), 473–480. <https://doi.org/10.1086/705122>.
- Rosendale, A.J., Lee Jr., R.E., Costanzo, J.P., 2015. Seasonal variation and freezing response of glucose transporter 2 in liver of the wood frog: implications for geographic variation in freeze tolerance. *J. Zool.* 297 (2), 132–138. <https://doi.org/10.1111/jzo.12255>.
- Santos, T.G.D., Kopp, K., Spies, M.R., Trevisan, R., Cechin, S.Z., 2008. Distribuição temporal e espacial de anuros em área de Pampa, Santa Maria, RS. *Iheringia. Série Zoológica* 98, 244–253. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212008000200013>.
- Schmid, W.D., 1982. Survival of frogs in low temperature. *Science* 215 (4533), 697–698. <https://doi.org/10.1126/science.7058335>.
- Shekhovtsov, S.V., Bulakhova, N.A., Tsentolovich, Y.P., Zelentsova, E.A., Yanshole, L.V., Meshcheryakova, E.N., Berman, D.I., 2020. Metabolic response of the Siberian wood frog *Rana anurenensis* to extreme hypoxia. *Sci. Rep.* 10 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71616-4>.
- Schoemaker, V.H., Balding, D., Ruibal, R., McClanahan Jr., L.L., 1972. Uricotelism and low evaporative water loss in a South American frog. *Science* 175 (4025), 1018–1020. <https://doi.org/10.1126/science.175.4025.1018>.
- Shpun, S., Hoffman, J., Katz, U., 1992. Anuran amphibia which are not acclimable to high salt, tolerate high plasma urea. *Comp. Biochem. Physiol.* 103 (3), 473–477. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90274.t](https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90274.t).
- Sinsch, U., 1984. Thermal influences on the habitat preference and the diurnal activity in three European *Rana* species. *Oecologia* 64 (1), 125–131. <https://doi.org/10.1007/BF00377554>.
- Storey, K.B., 1984. Freeze tolerance in the frog, *Rana sylvatica*. *Experientia* 40 (11), 1261–1262. <https://doi.org/10.1007/BF01946664>.
- Storey, K.B., 1987. Organ specific metabolism during freezing and thawing in a freeze-tolerant frog. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 253 (2), R292–R297. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1987.253.2.R292>.
- Storey, J.M., Storey, K.B., 1985. Adaptations of metabolism for freeze tolerance in the gray tree frog, *Hyla versicolor*. *Can. J. Zool.* 63 (1), 49–54. <https://doi.org/10.1139/z85-009>.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q. Rev. Biol.* 65 (2), 145–174. <https://doi.org/10.1086/416717>.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 2013. Molecular biology of freezing tolerance. *Compr. Physiol.* 3 (3), 1283–1308. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130007>.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 2017. Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. *Physiol. Rev.* 97, 623–665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2016>.
- Storey, J.M., Storey, K.B., 2019. In defense of proteins: chaperones respond to freezing, anoxia, or dehydration stress in tissues of freeze tolerant wood frogs. *J. Exp. Zool.: Ecological and Integrative Physiology* 331 (7), 392–402. <https://doi.org/10.1002/jez.2306>.
- Storey, J.M., Wu, S., Storey, K.B., 2021. Mitochondria and the frozen frog. *Antioxidants* 10 (4), 543. <https://doi.org/10.3390/antiox10040543>.
- Sunny, N.E., Bequette, B.J., 2011. Glycerol is a major substrate for glucose, glyoxen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos. *J. Anim. Sci.* 89, 3945–3953. <https://doi.org/10.2527/jas.2011.3985>.
- Tattersall, G.J., 2016. Infrared thermography: a non-invasive window into thermal physiology. *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 202 (2016 Dec), 78–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.02.022>.
- Tattersall, G.J., Ullsch, G.R., 2008. Physiological ecology of aquatic overwintering in rainforest frogs. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* 83 (2), 119–140, 2008 May.
- Thomas, J.A., Schlander, K.K., Larner, J., 1968. A rapid filter paper assay for UDP-glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. *Anal. Biochem.* 25, 486–499. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90127-9).
- Torres, L.L.S., Gamaro, G.D., Silveira-Cucco, S.N., Michalowski, M.B., Corrêa, J.B., Perry, M.L.S., Dalmaç, C., 2001. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (1), 111–116. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000100013>.
- Van Beurden, E.K., 1980. Energy metabolism of dormant Australian water-holding frogs (*Cyclorana platycephalus*). *Copeia* 1980 (4), 787–799. <https://doi.org/10.2307/1444458>.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Anal. Biochem.* 11, 256–265. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90013.8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90013.8).
- Varma, A., Storey, K.B., 2023. Hepatic citrate synthase suppression in the freeze-tolerant wood frog (*Rana sylvatica*). *Int. J. Biol. Macromol.* 242 (Pt 1), 124718. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124718>, 2023 May 5.
- Weber, R.E., Ostojic, H., Fago, A., Dewilde, S., Van Hauwaert, M.L., Moens, L., Monge, C., 2002. Novel mechanism for high-altitude adaptation in hemoglobin of the Andean frog *Telmatobius perrivianus*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283 (5), R1052–R1060. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00292.2002>.
- Wells, K.D., 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago.
- Ximenez, S.D.S., Tozetti, A.M., 2015. Seasonality in anuran activity and calling season in a Brazilian subtropical wetland. *Zool. Stud.* 54 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40555-015-0125-8>.
- Young, S., Warner, J., Speare, R., Berger, L., Skerratt, L.F., Muller, R., 2012. Hematologic and plasma biochemical reference intervals for health monitoring of wild Australian

M. de Amaral et al.

Journal of Thermal Biology 117 (2023) 103705

- tree frogs. *Vet. Clin. Pathol.* 41 (4), 478–492. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2012.00470.x>.
- Zhang, J., Storey, K.B., 2012. Cell cycle regulation in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Cell Cycle* 11 (9), 1727–1742. <https://doi.org/10.4161/cc.19880>.
- Zhang, J., Gupta, A., Storey, K.B., 2021. Freezing stress adaptations: critical elements to activate Nrf2 related antioxidant defense in liver and skeletal muscle of the freeze tolerant wood frogs. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochemistry and Molecular Biology* 254, 110573. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110573>.
- Zimmerman, S.L., Frisbie, J., Goldstein, D.L., West, J., Rivera, K., Krane, C.M., 2007. Excretion and conservation of glycerol, and expression of aquaporins and glyceroporins, during cold acclimation in Cope's gray tree frog *Hyla chrysoscelis*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292 (1), R544–R555. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00434>.

#### **4.2 Artigo 2 (exposição à desidratação)**

Título: ***Coping with dry spells: investigating oxidative balance and metabolic responses in frogs during dehydration and rehydration exposure***

Periódico: ***Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*** (ISSN: 1531-4332)

Página URL do periódico: <https://www.sciencedirect.com/journal/comparative-biochemistry-and-physiology-part-a-molecular-and-integrative-physiology>

Qualis: **A1**

Fator de Impacto: **2.3**

Status: **Em revisão - Submetido para publicação em 19 de abril de 2024.**

O e-mail confirmando a submissão do artigo está disponível no anexo IV deste documento.

### **4.3 Artigo 3 (gliconeogênese durante exposição a temperaturas negativas e desidratação)**

Título: ***Gluconeogenesis in frogs during cooling and dehydration exposure: new insights into tissue plasticity of the gluconeogenic pathway dependent on abiotic factors***

Periódico: ***Journal of Experimental Biology*** (ISSN: 1477-9145)

Página URL do periódico: <https://journals.biologists.com/jeb>

Qualis: **A1**

Fator de Impacto: **2.8**

Status: **Aceito para publicação**

Acesso: <https://doi.org/10.1242/jeb.247259>

## 5 DISCUSSÃO GERAL

A análise das adaptações fisiológicas de espécies frente a estresses ambientais é essencial para a compreensão dos mecanismos subjacentes à sobrevivência em ambientes desafiadores. No contexto dos anuros, notadamente *Boana pulchella*, tem a capacidade de modular seus processos metabólicos diante de condições extremas, como temperaturas negativas, desidratação e anóxia desempenha um papel crucial em sua viabilidade ecológica. Os resultados apresentados nessa Tese revelam uma série de respostas adaptativas que abrangem desde alterações nos substratos metabólicos, vias metabólicas e até ajustes na atividade enzimática em diferentes tecidos.

Nesta discussão, faremos uma análise geral dos resultados provenientes dos três experimentos nos quais *B. pulchella* foi submetida, baixas temperaturas, desidratação e anóxia, examinando as respostas metabólicas específicas desses anfíbios e discutindo suas implicações significativas para a compreensão da fisiologia dessas espécies. Além disso, esses resultados têm importantes implicações para nossa compreensão da ecologia de *B. pulchella*, bem como para a conservação desses anuros em face das mudanças ambientais globais. Em última análise, esses estudos destacam a necessidade contínua de investigar as adaptações fisiológicas das espécies às mudanças ambientais para orientar eficazmente os esforços de conservação e manejo de populações vulneráveis.

Estudos sobre as adaptações ao frio entre os ectotérmicos tem sido amplamente discutido na literatura em anuros de clima temperado (Storey e Storey, 2013, 2017). No entanto, pouco se sabe sobre como os anuros subtropicais enfrentam ocasiões de baixas temperaturas, apesar de muitos viverem em ambientes onde períodos de temperaturas negativas são comuns. Quando exposta a -2.5 °C por 24 h,

*B. pulchella* não apresentou sinais de congelamento e manteve seus reflexos iguais ao do grupo controle. Esse comportamento corresponde com a ecologia dessa espécie, uma vez que em seu habitat natural, *B. pulchella* experimenta alguns breves períodos de temperaturas negativas que normalmente ocorrem durante as noites de inverno (de Amaral et al., 2022). Além disso, é importante lembrar que essa espécie concentra sua atividade justamente nas épocas mais frias do ano, permanecendo ativa no inverno (Basso, 1990; Peltzer e Lajmanovich, 2007; Canavero et al., 2008; López et al., 2011; de Amaral et al., 2022). É essencial, portanto, que o animal não desencadeie um processo de congelamento, uma vez que em poucas horas as temperaturas voltam a ficar positivas (Maluf, 2000; Bergamaschi et al., 2013), e desencadear um processo com tantos mecanismos seria um gasto energético desnecessário. Portanto, pequenos ajustes fisiológicos podem ser importantes para manejar a exposição ao frio durante esses períodos (de Amaral et al., 2022).

As percepções metabólicas derivadas de nosso estudo podem, portanto, fornecer informações de como os anuros que são ativos no inverno gerenciam suas respostas fisiológicas durante a exposição ao resfriamento. Primeiramente, *B. pulchella* apresentou concentrações diminuídas de ureia em vários tecidos sugerindo que a ureia pode não servir como um anticongelante nesta espécie. Essa resposta pode ser associada a uma diminuição da taxa metabólica e ao esgotamento retardado de combustível interno, como já relatado nas rãs endêmicas do Planalto Tibetano *Nanorana parkeri* durante o inverno (Niu et al., 2022b). Além disso, os anuros podem enfrentar condições desidratantes em temperaturas subzero (Costanzo e Lee, 2005), o que geralmente leva ao acúmulo de ureia, uma resposta comum a desafios hidro-osmóticos (Shpun et al., 1992; Jørgensen, 1997). No entanto, observou-se que os níveis de ureia diminuía em *L. sylvaticus* hibernantes conforme a disponibilidade de

água ambiental aumentava (Costanzo e Lee, 2005). Como todos os grupos experimentais neste estudo tiveram acesso irrestrito à água, isso também pode explicar a ausência de aumento nos níveis de ureia, mitigando assim os desafios osmóticos potenciais. Alternativamente, os anuros podem transformar a ureia em ácido úrico, uma forma inerte e menos solúvel, em resposta a desafios osmóticos como estratégia de conversão de resíduos nitrogenados, como observado em *Phyllomedusa sauvagii* e sazonalmente em *Litoria infrafrenata* (Shoemaker et al., 1972; Young et al., 2012). As concentrações elevadas de ácido úrico e proteína total no coração durante a recuperação, juntamente com concentrações consistentes de ureia entre o resfriamento e a recuperação, sugerem a possível transformação de resíduos nitrogenados do catabolismo proteico em ácido úrico como uma forma de proteger o tecido cardíaco contra danos osmóticos.

Além disso, a exposição ao resfriamento exerceu efeitos distintos na glicólise e glicogênese no músculo e no fígado de *B. pulchella*, sugerindo potenciais adaptações glicolíticas específicas para cada tecido. No fígado, as taxas mais baixas de síntese de glicogênio hepático e oxidação de glicose durante o resfriamento e a recuperação provavelmente indicam uma redução na utilização de glicose neste tecido, possivelmente como estratégia para manter as concentrações de glicogênio ao longo desse período. Evidências sugerem um fluxo diminuído através da via glicolítica hepática em sapos que hibernam, influenciado por fatores como temperatura e disponibilidade de oxigênio (Donohoe e Boutilier, 1998; Storey e Storey, 1990; Tattersall e Ultsch, 2008), sendo a temperatura baixa o principal impulsionador em sapos intolerantes ao congelamento (Pinder et al., 1992). É digno de nota que os indivíduos coletados no inverno exibiram concentrações mais altas de glicogênio (de Amaral et al., 2022), destacando a importância de preservar essas reservas no frio.

Portanto, esses achados sugerem que temperaturas mais baixas, especialmente abaixo de 5 °C, promovem uma diminuição na utilização de glicose tanto para armazenamento quanto para oxidação no tecido hepático de *B. pulchella*.

Por outro lado, a oxidação de glicose no músculo permaneceu a mesma entre os grupos. A glicólise aeróbica é um processo celular eficiente em tempo e energia (Melkonian e Schury, 2022), então manter essa via no músculo ativo é razoável para esses animais ativos. Observou-se uma diminuição na síntese de glicogênio no grupo de recuperação em comparação com o grupo de aclimação, possivelmente devido à conversão de lactato em glicogênio (Petersen e Gleeson, 2011; Fournier e Guderley, 1992). Esses ajustes metabólicos suportam a atividade muscular sustentada necessária para várias atividades vitais nesse período, incluindo a reprodução e busca por alimento.

Assim como na exposição a baixas temperaturas, quando exposta a desidratação com uma perda de 40% de água corporal e um subsequente período de reidratação de 24 horas, identificamos variações no metabolismo em *B. pulchella*. Identificar, portanto, essas variações são importantes uma vez que a restrição hídrica e, conseqüentemente, a desidratação são condições que podem comprometer populações e levar ao declínio das espécies de anuros (Lertzman-Lepofsky et al., 2020; Greenberg e Palen, 2021; Beranek, 2022). Em linhas gerais, a desidratação modificou a massa corporal, e no encéfalo, fígado e músculo alterou a concentração de substratos metabólicos. No músculo e no coração, houve uma mudança nas enzimas antioxidantes, e no músculo e no fígado, a gliconeogênese também foi alterada. Esses resultados sugerem que *B. pulchella* precisa fazer uso de certos mecanismos metabólicos para lidar com períodos de exposição à restrição hídrica para sobreviver.



Sabe-se que a desidratação em anuros resulta em perda de água corporal, refletida pela redução de peso. Durante a recuperação, a rápida restauração do peso corporal pode ser facilitada pela permeabilidade osmótica aumentada da pele pélvica, estimulada pelo hormônio antidiurético arginina vasotocina (AVT; Bentley e Main, 1972; Bentley e Yorio, 1979). O AVT se liga a um receptor específico, o receptor tipo V2, localizado na membrana basolateral das células epiteliais da mancha pélvica, ativando-o. Esse receptor ativado estimula a adenilato ciclase (AC), uma proteína de membrana, que converte o ATP em AMPc. O AMPc, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA), uma proteína citoplasmática. A PKA tem dois efeitos na célula: a curto prazo, atua sobre vesículas citoplasmáticas que armazenam as aquaporinas AQP2 e AQP3, promovendo a translocação dessas vesículas para a membrana apical da célula, aumentando a densidade dessas aquaporinas na membrana. E a longo prazo, estimula a transcrição de RNAm para AQP2 e AQP3. Dessa maneira, a água é transportada do citoplasma para o interstício através das AQP3BL, aquaporinas ortólogas às AQP3 de mamíferos, que estão ancoradas permanentemente na membrana basolateral da célula. Do interstício, a água passa para o sangue através de AQP1, presente na membrana plasmática das células do endotélio capilar (Tanii et al., 2002; Hasegawa et al., 2003; Junior e Gomes, 2012). Diante disso, estudos analisando a expressão desses transportadores durante os períodos de desidratação e reidratação seriam interessantes para complementar esses resultados. Além disso, embora a desidratação afete o peso corporal, o conteúdo de água dos órgãos permaneceu constante, indicando uma perda de água principalmente de espaços extracelulares ou volume plasmático (Hillman, 1978; Churchill e Storey, 1994). Esse fenômeno foi facilmente confirmado durante a dissecação, onde a grande quantidade de líquido normalmente encontrada na

cavidade abdominal e no sistema circulatório havia desaparecido nos estágios mais avançados de desidratação. Resultados semelhantes também foram observados em várias espécies, incluindo *L. sylvaticus*, *P. crucifer* e *R. pipiens*, sugere uma estratégia geral de resistência à desidratação em anfíbios (Churchill e Storey, 1993, 1994, 1995).

Durante o período de desidratação, o encéfalo exibiu altas concentrações de ureia e lactato, substratos já conhecidos por seu papel osmoprotetor em anfíbios submetidos a estresse de desidratação (Storey et al., 2021). Esses achados sugerem que a ureia elevada pode também diminuir o metabolismo em certos tecidos, conservando assim reservas de energia limitadas (Costanzo e Lee, 2005). *R. sylvatica*, desidratada em temperaturas semelhantes às de *B. pulchella*, respondeu acumulando vários solutos, incluindo ureia, e induzindo uma resposta hipometabólica induzida pela ureia (Muir et al., 2007). Além disso, a regulação de osmólitos, como a ureia, pode inibir a síntese de proteínas durante a desidratação para conservar energia e estabelecer um estado hipometabólico (Wu et al., 2017). A diminuição da capacidade cardiovascular durante a desidratação compromete a entrega de oxigênio, levando a uma queda no metabolismo aeróbico e acúmulo de lactato (Hillman, 1978). Em animais desidratados, como *P. crucifer*, observou-se um aumento significativo na concentração de lactato no encéfalo, indicando um possível papel do lactato como substrato neuroprotetor e energético anaeróbico durante o estresse de privação de água (Churchill e Storey, 1994; Berthet et al., 2009; Katzenback et al., 2014; Childers e Storey, 2016, 2019). Em *Xenopus laevis*, mudanças nos níveis de ureia induzidas pela desidratação, juntamente com modificações pós-traducionais enzimáticas, aumentaram e melhoraram a função da lactato desidrogenase (LDH), evidenciando uma interação entre os substratos ureia e lactato (Katzenback et al., 2014).

Ademais, o tecido hepático de *B. pulchella* apresentou um aumento da glicogênese após a reidratação em comparação com o controle, enquanto os níveis de lactato diminuíram. Isso sugere dois caminhos possíveis para a utilização do lactato. Primeiro, o lactato pode ser usado para a glicólise anaeróbica, apoiando as demandas de ATP no animal desidratado (Dawson et al., 2018; Hawkins et al., 2019). Em segundo, o lactato pode ser convertido em glicogênio durante a desidratação como uma estratégia para reter a água tecidual, utilizando-se do lactato como substrato para a gliconeogênese, conforme sugerido pelos nossos resultados no artigo da gliconeogênese. A síntese de glicogênio durante a desidratação é uma estratégia importante para armazenar água e evitar sua perda, uma vez que o glicogênio requer moléculas de água para ser sintetizado e armazenado (Sherman et al., 1982; King et al., 2018). Observou-se também uma maior concentração de glicogênio muscular durante a reidratação, o que reafirma a hipótese de que a glicogênese é um mecanismo potencial para a conservação de água tecidual. A maior glicogênese muscular durante a desidratação pode ser atribuída à maior disponibilidade de lactato para uso neste tecido através do próprio metabolismo muscular. Esses resultados, juntos com a manutenção da concentração de ureia no tecido hepático e muscular, sugerem uma estratégia para a osmorregulação, prevenção de danos teciduais e manutenção da atividade e integridade nesses tecidos.

Quanto ao equilíbrio oxidativo, ele apresentou variações durante a desidratação e reidratação entre os tecidos, indicando diferentes respostas ao estresse. Enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) auxiliam o animal na preparação para o estresse oxidativo experimentado durante os períodos de desidratação e reidratação (Wu et al., 2017). O encéfalo não mostrou

diferenças na atividade da CAT, sugerindo que a ação neuroprotetora pode derivar de outros mecanismos, como a acumulação de lactato em si e/ou outros componentes do sistema antioxidante não analisados (Ighodaro e Akinloye, 2018). Além disso, a ureia reduziu a atividade da CAT nos corações de sapos em estivação (Storey, 2002), e esse efeito poderia estar ocorrendo nos encéfalos de *B. pulchella*, uma vez que observamos uma concentração mais alta de ureia durante a desidratação. O aumento da atividade da CAT no coração após um período estivação já é relatado em anuros (Grundy e Storey, 1998; Feidantsis et al., 2013). Isso provavelmente ocorre porque, com a reidratação, o volume plasmático aumenta, levando a um aumento do fluxo sanguíneo e conseqüentemente a um rápido aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) quando o oxigênio é reintroduzido (Wu et al., 2017). Assim, o coração recebe esse fluxo instantaneamente e deve lidar com as ROS. Portanto, o aumento da CAT durante a reidratação é indicativo da ação desse mecanismo de defesa. No tecido muscular, por sua vez, conseguimos reafirmar a importância de enzimas de defesa de primeira linha como SOD e CAT durante a reidratação, com o papel de mitigar os danos da rápida geração de ROS devido a um aumento rápido no consumo de oxigênio nos estágios iniciais da reidratação e reoxigenação (Hermes-Lima et al., 1998, Hermes-Lima et al., 2001). A atividade da glutathione S-transferase (GST), que desempenha um papel na desintoxicação de xenobióticos e produtos de peroxidação lipídica (Singhal et al., 1992), não foi afetada pela desidratação no músculo de *B. pulchella*. Além disso, os níveis de produtos de peroxidação lipídica (TBARS) também não mudaram entre os grupos, consistentes com os achados em *R. pipens* (Hermes-Lima e Storey, 1998). Esses resultados indicam que a reidratação aumentou a resposta antioxidante contra, possivelmente, o aumento da formação de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio e, assim, prevenindo a peroxidação lipídica.

Essas respostas representam uma vantagem adaptativa para manter a viabilidade tecidual para a mobilidade após a desidratação.

A análise dos ajustes na via da gliconeogênese durante a exposição a temperaturas baixas e desidratação merecem uma atenção especial nessa discussão, uma vez que os achados são importantes no contexto geral do metabolismo dos anuros. Sabe-se que a preferência por um substrato energético pode variar dependendo de fatores como a estação do ano e as condições ambientais, como temperatura e umidade (King et al., 1995; Kiss et al., 2009; de Amaral et al., 2022, 2023; Hawkins et al., 2019; Park e Do, 2020; Yoldas and Erismis, 2021). A via gliconeogênica desempenha um papel crucial nessas adaptações, mas poucos estudos investigaram sua atividade nos tecidos de anfíbios. Nosso estudo é o primeiro a avaliar a atividade gliconeogênica usando substratos radiomarcados no fígado, músculos e rins de anuros adultos durante exposição ao frio, desidratação, e anóxia, ressaltando um avanço na elucidação dos mecanismos adjacentes a essas exposições.

Resumidamente, observamos que durante a exposição ao frio e até 24 horas depois, a via gliconeogênica exibe atividade reduzida no fígado de *B. pulchella*, corroborando com os resultados encontrados na literatura onde a diminuição na gliconeogênese durante temperaturas frias já foi sugerida. Durante o congelamento, por exemplo, a atividade da frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase), uma enzima chave na regulação da gliconeogênese, diminui significativamente em *L. sylvaticus*, indicando supressão da gliconeogênese hepática (Varma e Storey, 2022). Em *R. catesbeiana*, a fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólica (PEPCK-C), outra enzima importante na gliconeogênese, exibe máxima atividade durante o verão para rãs adultas em comparação com os meses mais frios (Rexer-Huber et al., 2011). Esses achados

sugerem que durante os estados frios, o fígado experimenta supressão da gliconeogênese a partir de substratos como glicerol e lactato, enquanto a alanina se torna o substrato preferencial. A estabilidade da atividade gliconeogênica via alanina no fígado pode ser atribuída aos hábitos alimentares carnívoros desses animais, que fornecem uma fonte rica desse substrato (Schermerhorn, 2013). Além disso, a atividade da gliconeogênese a partir de lactato e glicerol continua reduzida pelo menos 24 horas após a exposição ao frio, sugerindo um tempo prolongado para restabelecer a atividade da via.

Por outro lado, o lactato geralmente se acumula no fígado de sapos congelados, indicando que a glicólise anaeróbica ocorre durante o congelamento ou hibernação (Storey, 1984; Storey e Storey, 1984; Storey e Storey, 1986; Niu et al., 2023b). Portanto, durante o resfriamento e a recuperação, a redução da gliconeogênese a partir do lactato no fígado pode sugerir que o lactato é provavelmente utilizado por meio da glicólise anaeróbica para fornecer energia a esse tecido. Da mesma forma, durante a exposição à desidratação, a diminuição da gliconeogênese a partir do lactato no fígado durante a recuperação pode estar associada a uma estratégia para fornecer energia para restabelecer o metabolismo. Na fase de recuperação da desidratação, a atividade da lactato desidrogenase (LDH), a enzima responsável pela última etapa da glicólise anaeróbica que converte piruvato em lactato, foi menos ativa no fígado desidratado de *Xenopus laevis* (Childers e Storey, 2019). Isso sugere que uma parte significativa do piruvato formado via glicólise pode ser direcionada para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), favorecendo um retorno à fosforilação oxidativa (Childers e Storey, 2019) e talvez menos lactato esteja sendo direcionado para a via de gliconeogênese. Além disso, embora o fígado seja um local primário para a reciclagem de lactato a partir do músculo, o lactato pode não

ser mais capaz de chegar ao fígado durante a exposição ao frio e a recuperação. O lactato pode ser reciclado dentro do próprio músculo, como anteriormente relatado em situações pós-exercício (Fournier e Guderley, 1992; Gleeson e Dalessio, 1990). Essa redução na transferência de lactato do fígado para o músculo pode diminuir a atividade de gliconeogênese a partir desse precursor no fígado. Reciclar lactato dentro do músculo pode ser uma adaptação estratégica para conservar energia, evitando os gastos associados ao ciclo de Cori ou a perda potencial de lactato durante as transferências fígado-músculo. Essa abordagem permite a geração rápida de energia diretamente dentro do músculo durante a exposição ao estresse, o que é particularmente crucial para *B. pulchella*. Essa perereca permanece ativa durante o inverno (Maneyro e Carreira, 2012; de Amaral et al., 2022), e otimizar os recursos energéticos é essencial para sustentar atividades como a vocalização. Além disso, esse animal habita áreas de agricultura extensiva, onde poças podem desaparecer devido a atividades de plantio (Brodeur et al., 2012). Portanto, a adaptação a períodos secos e a otimização dos recursos energéticos durante esses períodos podem garantir a sobrevivência dos indivíduos.

A gliconeogênese, em anuros, não se restringe ao fígado e ao rim. *R. catesbeiana*, por exemplo, mostrou uma via gliconeogênica na retina (Goldman, 1988), enquanto sapos *Bufo marinus* exibiram atividade gliconeogênica na bexiga urinária (Morrison, 1972) e na mucosa gástrica (Finol e Chacin, 1980). Estudos sugeriram que *R. pipiens* poderia reciclar lactato diretamente para glicogênio muscular após atividade vigorosa e em *R. catesbeiana* a gliconeogênese muscular a partir de lactato foi sugerida (Petersen e Gleeson, 2011). Nosso estudo amplia essa compreensão, mostrando que a via gliconeogênica ocorre não apenas a partir de lactato, mas também de alanina no músculo de *B. pulchella*. Embora *R. catesbeiana*

tenha mostrado capacidade gliconeogênica a partir de lactato no músculo, essa capacidade não variou entre condições térmicas diferentes. Em nossos estudos, *B. pulchella* apresentou maiores concentrações de lactato muscular comparado a *R. catesbeiana*, mesmo durante o resfriamento. Esses achados sugerem que o lactato muscular pode ser um substrato essencial reciclado dentro do tecido muscular durante o estresse, possivelmente via gliconeogênese, resultando na produção de energia como glicose ou armazenado como glicogênio (Gleeson, 1985; Gleeson e Dalessio, 1990).

Essa hipótese desafia a compreensão convencional da gliconeogênese a partir do lactato, que geralmente envolve o fígado em mamíferos, onde o lactato é exportado, e a gliconeogênese ocorre no fígado através do ciclo de Cori (Cori e Cori, 1946; Cori, 1981). Em contraste, nossos achados sugerem que em anuros, especialmente em *B. pulchella*, a gliconeogênese a partir do lactato pode ocorrer dentro do tecido muscular. Além disso, a observação de que *B. pulchella* permanece ativa durante a exposição ao frio (de Amaral et al., 2023) e durante todo o inverno em seu habitat natural (Maneyro e Carreira, 2012; Ximenez e Tozetti, 2015) apoia a ideia de que as baixas temperaturas não impactam significativamente a gliconeogênese muscular. Essa resiliência às condições frias pode representar uma adaptação metabólica evoluída em anuros que habitam ambientes mais frios.

Por fim, referente aos dados preliminares do experimento com os animais submetidos à anóxia, eles já nos indicam que *B. pulchella* também apresenta variações metabólicas durante a exposição a um ambiente com restrição de oxigênio. Primeiramente, a concentração plasmática de lactato foi maior durante a anóxia. Esse dado não é incomum, já que o acúmulo de lactato, um produto anaeróbico, nos tecidos e plasma é uma resposta recorrente em anuros expostos a ambientes hipóxicos ou



anóxicos (Armentrout, 1969; Donohoe e Boutilier, 1999; Currie et al., 2001; Stewart et al., 2004; Shekhovtsov et al., 2020). Demais análises estão sendo conduzidas para mensurar a concentração dos substratos metabólicos, como o lactato, no fígado, músculo, coração e no encéfalo afim de identificar se esse aumento ocorre também nos tecidos.

Como já mencionado anteriormente, em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, sugere-se que o lactato possa ser empregado, nos anuros, tanto como substrato para a oxidação quanto na via da gliconeogênese para a produção de glicose (Donohoe e Boutilier, 1999). Os tecidos que têm acesso a algum oxigênio podem utilizar o lactato diretamente, enquanto o lactato pode ser transportado para o fígado e convertido em glicose para os tecidos que dependem desse carboidrato, como o encéfalo. Sugerimos, ainda, que esse lactato convertido em glicose pode ser estocado no fígado como glicogênio, uma vez que glicogênio hepático foi maior durante a anóxia em *B. pulchella*. Durante a recuperação da anóxia, um processo crucial é a eliminação dos produtos finais, principalmente o lactato. Portanto, há um mecanismo efetivo que consegue regularizar a concentração na recuperação para níveis do controle. No estudo de invertebrados, Ellington (1983) sugeriu que esses produtos podem ser eliminados por três métodos possíveis: oxidação completa, conversão de volta em produtos de armazenamento, como o glicogênio, e/ou excreção. No entanto, o mecanismo adotado por *Boana pulchella* para realizar essa rápida eliminação ainda deve ser elucidado.

Além disso, especialmente em órgãos vitais como o encéfalo, o lactato pode ter um papel neuroprotetor durante períodos de anóxia ou hipóxia (Roumes et al., 2021). Antigamente, o lactato era considerado um produto final residual e sem utilidade do metabolismo energético anaeróbico e que às vezes poderia se tornar

prejudicial (Shurr, 2006). Hoje, ele já é considerado uma molécula com diversas funções, inclusive, como sendo um possível substrato energético alternativo para os neurônios e assumindo um papel crucial na homeostase energética do encéfalo (Annoni et al., 2021). Diante disso, nossos resultados apontam que *B. pulchella* diminui a gliconeogênese a partir de lactato no encéfalo durante a anóxia indicando que o lactato, de fato, é o substrato preferencial no encéfalo (e não a glicose) e que o lactato pode estar sendo utilizado como substrato energético, gerando 2 moles de ATP por mol de glicose, como já hipotetizado por Shurr (2006). Durante a recuperação, o lactato pode ser convertido a piruvato na mitocôndria, mediado por LDH, fornecendo piruvato para o ciclo do ácido tricarboxílico mitocondrial (Shurr, 2006; Rogatzki et al., 2015). Não podemos esquecer que esses são resultados preliminares, e uma melhor predição será obtida quanto completada as demais mensurações metabólicas desse experimento.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

É inegável que o entendimento dos ajustes metabólicos de anfíbios a diferentes exposições a desafios fisiológicos e estressores ambientais é uma vasta área que merece cada vez mais estudos. De forma geral, os resultados encontrados nessa Tese sugerem que fatores ambientais influenciam as concentrações de substratos metabólicos, as vias oxidativas e de síntese de glicose, as vias gliconeogênicas e o balanço oxidativo em *Boana pulchella*.

Em *B. pulchella* identificamos, pela primeira vez, a existência da gliconeogênese no músculo a partir de alanina e lactato. Ademais, há uma plasticidade tecidual para essa via e uma utilização de substratos preferenciais dependendo das condições ambientais. Durante a exposição a temperaturas subnegativas, a resiliência encontrada ao congelamento provavelmente decorre de adaptações específicas da espécie que facilitam a sobrevivência em um ambiente caracterizado por breves períodos de temperaturas negativas. Adaptações metabólicas como concentrações reduzidas de ureia e diminuição do metabolismo de glicose hepática durante a exposição ao resfriamento podem indicar uma necessidade de níveis reduzidos de osmólitos em condições de frio e a conservação de energia durante esse período. Durante a desidratação, sintetizar glicogênio e manter esses estoques nos tecidos parece ser uma estratégia para preservar a água tecidual. O equilíbrio oxidativo também exibiu atividades tecido-específicas de enzimas antioxidantes. A CAT no coração e no músculo, e SOD no músculo, parecem ser enzimas importantes durante a reidratação para lidar com ROS e prevenir o estresse oxidativo mantendo os tecidos funcionais durante a desidratação e na reidratação. Sugerimos, ainda, um papel importante do lactato como agente neuroprotetor quando exposto a desidratação e a anóxia. Essas respostas fisiológicas integradas

possivelmente auxiliam esses animais a lidarem com o estresse ambiental ao qual foi exposto e, provavelmente, atuando em conjunto com outras estratégias fisiológicas, anatômicas ou comportamentais, possibilita a sobrevivência desses organismos em ambientes desafiadores. Além disso, esse estudo traz importantes resultados para o entendimento da dinâmica dos ajustes metabólicos em anuros subtropicais, fomentando a literatura existente e fornecendo dados para novos estudos. Sem dúvida, estudos adicionais devem ser realizados para descrever e elucidar por completo os mecanismos fisiológicos dessa espécie e em outras espécies de anuros, a fim de preencher as lacunas existentes na literatura acerca da Ecofisiologia de anuros subtropicais.

Para avançar no entendimento das adaptações fisiológicas dos anfíbios a diferentes condições ambientais, projetamos algumas perspectivas a partir dos resultados aqui obtidos. Primeiramente, como perspectiva a curto prazo, projetamos finalizar as mensurações do experimento de exposição à anóxia realizando a determinação da concentração dos substratos teciduais, como glicogênio, ureia e lactato, bem como a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST) e algum marcador de dano oxidativo (TBARS, por exemplo). Como perspectivas futuras, seria interessante realizar experimentos que explorassem a interação dos fatores estressores estudados, como exposição simultânea a temperaturas extremas e desidratação. Essa abordagem permitiria uma compreensão mais holística e realista das estratégias de sobrevivência desses animais diante de desafios ambientais múltiplos e simultâneos que são expostos em seus ambientes naturais. Além disso, experimentos direcionados para análises de metaboloma e atividades de enzimas específicas das vias aqui estudadas, por exemplo, atividade da PEPCCK, poderiam esclarecer os mecanismos bioquímicos subjacentes às respostas observadas. Ao

utilizar técnicas avançadas de metabolômica, poderíamos identificar padrões metabólicos únicos associados à resistência ao frio, à desidratação e a anóxia em *Boana pulchella*. Da mesma forma, a realização de experimentos focados na avaliação de enzimas específicas poderia elucidar o papel preciso dessas moléculas na resposta fisiológica dos anuros a diferentes estressores ambientais. Outra perspectiva é determinar a expressão dos transportadores de glicose, como o GLUT2, nos tecidos dos diferentes grupos experimentais. Análises de PCR do gene *slc2a2* (a isoforma mais expressa de GLUT2 em hepatócitos de outras espécies de anuros) já estão sendo conduzidas para obtenção das sequências parciais desse gene para futuras quantificações. Ademais, objetiva-se futuramente realizar a mensuração das alterações metabólicas durante a exposição a estressores em outras espécies de anuros e utilizar esses dados como uma ferramenta potente para conservação dessas espécies. Em conjunto, essas abordagens experimentais mais detalhadas e integradas têm o potencial de fornecer uma compreensão mais profunda das adaptações fisiológicas dos anfíbios a ambientes variáveis e desafiadores, além de lançar luz sobre possíveis estratégias de conservação em face das mudanças climáticas e ambientais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, O. A., Hadj-Moussa, H., Storey, K. B., 2016. Regulation of SMAD transcription factors during freezing in the freeze tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 201, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.07.003>
- Al-Attar, R., Wu, C.-W., Biggar, K.K., Storey, K.B., 2020. Carb-loading: freeze-induced activation of the glucose-responsive ChREBP transcriptional network in wood frogs. *Physiol. Biochem. Zool.* 93 (2020), 49–61. <https://doi.org/10.1086/706463>
- Angilletta, M. J., 2009. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis.
- Angilletta Jr, M. J., Niewiarowski, P. H., Navas, C. A., 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of thermal Biology*, 27(4), 249-268. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(01\)00094-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(01)00094-8)
- Angilletta, M.J., Jr, Steury, T.D., Sears, M.W., 2004. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integrative and Comparative Biology*, 44, 498–50. <https://doi.org/10.1093/icb/44.6.498>
- Annoni, F., Peluso, L., Gouvêa Bogossian, E., Creteur, J., Zanier, E. R., Taccone, F. S., 2021. Brain protection after anoxic brain injury: Is lactate supplementation helpful?. *Cells*, 10(7), 1714. <https://doi.org/10.3390/cells10071714>
- Armentrout, D., 1969. Some physiological responses to anoxia in the great plains toad, *Bufo cognatus* (Doctoral dissertation, Texas Tech University).
- Basso, N. G., 1988. Estrategias adaptativas de una comunidad subtropical de anuros (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Barbeau, T. R., Lillywhite, H. B., 2005. Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hylid tree frogs of Florida. *Journal of Experimental Biology*, 208(11), 2147-2156. <https://doi.org/10.1242/jeb.01623>
- Bentley, P. J., 1966. Adaptations of Amphibia to Arid Environments: Novel physiological mechanisms not seen in fish aid frogs and toads to conserve water and live in deserts. *Science*, 152(3722), 619-623. <https://doi.org/10.1126/science.152.3722.619>
- Bentley, P. J., 1969. Neurohypophyseal hormones in amphibia: A comparison of their actions and storage. *General and Comparative Endocrinology*, 13(1), 39-44.

- Bentley, P. J., Main, A. R., 1972. Zonal differences in permeability of the skin of some anuran Amphibia. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 223(2), 361-363. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1972.223.2.361>
- Bentley, P. J., Yorio, T., 1979. Do frogs drink?. *Journal of Experimental Biology*, 79(1), 41-46. <https://doi.org/10.1242/jeb.79.1.41>
- Bentley, P. J., 1998. *Comparative vertebrate endocrinology*. Cambridge University Press.
- Beranek, C.T., Sanders, S., Clulow, J. et al., 2022. Factors influencing persistence of a threatened amphibian in restored wetlands despite severe population decline during climate change driven weather extremes. *Biodivers Conserv* 31, 1267–1287. <https://doi.org/10.1007/s10531-022-02387-9>
- Bergamaschi, H., Melo, R. D., Guadagnin, M. R., Cardoso, L. S., Silva, M. D., Comiran, F., ...Brauner, P. C., 2013. Boletins agrometeorológicos da estação experimental agrônômica da UFRGS: série histórica 1970-2012. Porto Alegre: Editora UFRGS.
- Bernarde, P. S., 2012. *Anfíbios e répteis: introdução ao estudo da herpetofauna brasileira*. Anolis Books.
- Berman, D. I., Bulakhova, N. A., Meshcheryakova, E. N., 2019. The Siberian wood frog survives for months underwater without oxygen. *Scientific reports*, 9(1), 13594. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31974-6>
- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P. J., Hirt, L., 2009. Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow & metabolism*, 29(11), 1780-1789. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.9>
- Bertoluci, J., 1998. Annual patterns of breeding activity in Atlantic rainforest anurans. *Journal of Herpetology*, 32(4), 607-611. <https://doi.org/10.2307/1565223>
- Bickler, P. E., & Buck, L. T., 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 145-170. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.162529>
- Blaylock, L. A., Ruibal, R., Platt-Aloia, K., 1976. Skin structure and wiping behavior of phyllomedusine frogs. *Copeia*, 283-295. <https://doi.org/10.2307/1443948>
- Boyland, E., Chasseaud, L.F., 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32:172–129. <https://doi.org/10.1002/9780470122778.ch5>

- Boveris, A., 1984. [57] Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 429-435). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05060-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05060-6)
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134(3), 707-716. <https://doi.org/10.1042/bj1340707>
- Bovo, R. P., 2015. Fisiologia térmica e balanço hídrico em anfíbios anuros. 135 f. Tese - (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015. < <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/92ef1cb8-c1e7-4a86-aab8-da24646e1e27/content> > Acesso em 18 de março de 2024.
- Brattstrom, B. H., 1963. A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology*, 44(2), 238-255. <https://doi.org/10.2307/1932171>
- Brodeur, J. C., Candiotti, J. V., Soloneski, S., Larramendy, M. L., Ronco, A. E., 2012. Evidence of reduced feeding and oxidative stress in common tree frogs (*Hypsiboas pulchellus*) from an agroecosystem experiencing severe drought. *Journal of Herpetology*, 46(1), 72-78. <https://doi.org/10.1670/10-200>
- Buckley, L. B., Jetz, W., 2007. Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1614), 1167-1173. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0436>
- Buege, J. A., Aust, S. D., 1978. [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). Academic press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Bulakhova, N. A., Meshcheryakova, E. N., & Berman, D. I., 2023. Pallas' spadefoot *Pelobates vespertinus* (Pelobatidae, Amphibia) tolerates extreme hypoxia. *The European Zoological Journal*, 90(1), 431-442. <https://doi.org/10.1080/24750263.2023.2217201>
- Burke, R. L., Hussain, A. A., Storey, J. M., Storey, K. B., 2002. Freeze tolerance and supercooling ability in the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, introduced to Long Island, New York. *Copeia*, 2002(3), 836-842. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2002\)002\[0836:FTASAI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2002)002[0836:FTASAI]2.0.CO;2)



- Cai, Q., Storey, K. B., 1997. Upregulation of a novel gene by freezing exposure in the freeze-tolerant wood frog (*Rana sylvatica*). *Gene*, 198(1-2), 305-312. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00332-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00332-6)
- Cai, Q., Greenway, S. C., Storey, K. B., 1997. Differential regulation of the mitochondrial ADP/ATP translocase gene in wood frogs under freezing stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1353(1), 69-78. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(97\)00057-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(97)00057-2)
- Caldart, V. M., Loebens, L., Brum, A. J. C., Bataioli, L., Cechin, S. Z., 2019. Reproductive cycle, size and age at sexual maturity, and sexual dimorphism in the stream-breeding frog *Crossodactylus schmidti* (Hylodidae). *South american journal of herpetology*, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-17-00060.1>
- Campbell, C.R., Voyles, J., Cook, D.I. et al., 2012. Frog skin epithelium: electrolyte transport and chytridiomycosis. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 431–434. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.002>
- Canavero, A., Arim, M., Naya Monteverde, D. E., 2008. Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. *North-Western Journal of Zoology* Vol. 4, No. 1, 2008, pp.29-41.
- Cartledge, V. A., Withers, P. C., Thompson, G. G., McMaster, K. A., 2006. Water relations of the burrowing sandhill frog, *Arenophryne rotunda* (Myobatrachidae). *Journal of Comparative Physiology B*, 176, 295-302. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0051-x>
- Carvajalino-Fernández, J. M., Gomez, M. A. B., Navas, C. A., 2011. Freezing risk in tropical high-elevation anurans: an assessment based on the Andean frog *Pristimantis nervicus* (Strobomantidae). *South American Journal of Herpetology*, 6(2), 73-78. <https://doi.org/10.2994/057.006.0205>
- Carvajalino-Fernández, J. M., Gomez, M. A. B., Giraldo-Gutiérrez, L., Navas, C. A., 2021. Freeze tolerance in neotropical frogs: an intrageneric comparison using *Pristimantis* species of high elevation and medium elevation. *Journal of Tropical Ecology*, 37(3), 118-125. <https://doi.org/10.1017/S026646742100016X>
- Childers, C. L., Storey, K. B., 2016. Post-translational regulation of hexokinase function and protein stability in the aestivating frog *Xenopus laevis*. *The Protein Journal*, 35, 61-71. <https://doi.org/10.1007/s10930-016-9647-0>

- Childers, C. L., & Storey, K. B., 2019. Purification and characterization of a urea sensitive lactate dehydrogenase from skeletal muscle of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Physiology B*, 189, 271-281. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1200-3>
- Churchill, T. A., Storey, K. B., 1993. Dehydration tolerance in wood frogs: a new perspective on development of amphibian freeze tolerance. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 265(6), R1324-R1332. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.6.R1324>
- Churchill, T. A., Storey, K. B., 1994. Effects of dehydration on organ metabolism in the frog *Pseudacris crucifer*: hyperglycemic responses to dehydration mimic freezing-induced cryoprotectant production. *Journal of Comparative Physiology B*, 164, 492-498. <https://doi.org/10.1007/BF00714587>
- Churchill, T. A., Storey, K. B., 1995. Metabolic effects of dehydration on an aquatic frog, *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Biology*, 198(1), 147-154. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.1.147>
- Churchill, T. A., Storey, K. B., 1996. Organ metabolism and cryoprotectant synthesis during freezing in spring peepers *Pseudacris crucifer*. *Copeia*, 517-525. <https://www.jstor.org/stable/1447515>
- Claussen, D. L., Townsley, M. D., Bausch, R. G., 1990. Supercooling and freeze-tolerance in the European wall lizard, *Podarcis muralis*, with a revisional history of the discovery of freeze-tolerance in vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B*, 160, 137-143. <https://doi.org/10.1007/BF00300945>
- Costanzo, J. P., Lee JR, R. E., Lortz, P. H., 1993. Glucose concentration regulates freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Biology*, 181(1), 245-255. <https://doi.org/10.1242/jeb.181.1.245>
- Costanzo, J. P., Grenot, C., Lee, R. E., 1995. Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Comparative Physiology B*, 165, 238-244. <https://doi.org/10.1007/BF00260815>
- Costanzo, J. P., Lee Jr, R. E., 2005. Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog. *Journal of Experimental Biology*, 208(21), 4079-4089. <https://doi.org/10.1242/jeb.01859>

- Costanzo, J. P., do Amaral, M. C. F., Rosendale, A. J., Lee Jr, R. E., 2013. Hibernation physiology, freezing adaptation and extreme freeze tolerance in a northern population of the wood frog. *Journal of Experimental Biology*, 216(18), 3461-3473. <https://doi.org/10.1242/jeb.089342>
- Costanzo, J. P., do Amaral, M. C. F., Rosendale, A. J., Lee Jr, R. E., 2013. Hibernation physiology, freezing adaptation and extreme freeze tolerance in a northern population of the wood frog. *Journal of Experimental Biology*, 216(18), 3461-3473. <https://doi.org/10.1242/jeb.089342>
- Costanzo, J. P., do Amaral, M., Rosendale, A. J., Lee, R. E., 2014. Seasonality of freeze tolerance in a subarctic population of the wood frog, *Rana sylvatica*. *International journal of zoology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/750153>
- Cree, A., 1988. Effects of arginine vasotocin on water balance of three leiopelmatid frogs. *General and comparative endocrinology*, 72(3), 340-350.
- Christiansen, J., Penney, D., 1973. Anaerobic glycolysis and lactic acid accumulation in cold submerged *Rana pipiens*. *Journal of comparative physiology*, 87, 237-245.
- Cori, C.F., Cori, G.T., 1946. Carbohydrate Metabolism. *Annual Review of Biochemistry* 1946 15:1, 193-218. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.15.070146.001205>
- Cori CF., 1981. The glucose-lactic acid cycle and gluconeogenesis. *Curr Top Cell Regul.* 1981; 18: 377-87.
- Currie, S., & Boutilier, R. G. (2001). Strategies of Hypoxia and Anoxia Tolerance in Cardiomyocytes from the Overwintering Common Frog, *Rana temporaria*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74(3), 420–428. doi:10.1086/320424
- Davenport, J., 2012. Environmental stress and behavioural adaptation. Springer Science & Business Media.
- Dawson, N. J., Biggar, Y., Malik, A. I., Storey, K. B., 2018. Increased transcript levels and kinetic function of pyruvate kinase during severe dehydration in aestivating African clawed frogs, *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.01.003>
- de Amaral, M., Von Dentz, M. C., Ohlweiler, R., Hoff, M. L. M., Heiermann, D., Colombo, P., Kucharski, L. C., 2022. Seasonal variations in the intermediate metabolism in south

- american tree-frog *Boana pulchella*. *Journal of Comparative Physiology B*, 192(2), 297-311. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01420-7>
- de Amaral, M., Von Dentz, M. C., Simões, L. A. R., Vogt, É., Heiermann, D., Fischer, P., Colombo, P., Kucharski, L. C., 2023. Metabolic changes in the subtropical frog *Boana pulchella* during experimental cooling and recovery conditions. *Journal of Thermal Biology*, 117, 103705. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103705>
- de Amaral, M., Carvajalino-Fernández, J. M., Nicieza, A. G., Tejado, M., 2024. Urea and glucose modulation during freezing exposure in three temperate frogs reveals specific targets in relation to climate. *Journal of Thermal Biology*, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2024.103854>
- Do Amaral, M., Frisbie, J., Goldstein, D.L., Krane, C.M., 2018. The cryoprotectant system of Cope's gray treefrog, *Dryophytes chrysoscelis*: responses to cold acclimation, freezing, and thawing. *J. Comp. Physiol. B* 188 (4), 611–621. <https://doi.org/10.1007/s00360-018-1153-6>.
- Donohoe, P. H., Boutilier, R. G., 1998. The protective effects of metabolic rate depression in hypoxic cold submerged frogs. *Respiration physiology*, 111(3), 325-336. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(97\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(97)00125-4)
- Donohoe, P. H., Boutilier, R. G., 1999. The use of extracellular lactate as an oxidative substrate in the oxygen-limited frog. *Respiration physiology*, 116(2-3), 171-179. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(99\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(99)00036-5)
- Duellman, W.E., 1989. Alternative life-history styles in anuran amphibians: evolutionary and ecological implications. In: Bruton, M.N (Ed.), *Alternative life-history styles of animals*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.101-126.
- Duellman, W. E., Trueb, L., 1994. *Biology of amphibians*. JHU press.
- Duellman, W.E., Trueb, L., 1986. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York.
- Edwards, J.R., Jenkins, J.L., Swanson, D.L., 2004. 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, 521–531. <https://doi.org/10.1002/jez.a.81>
- Eggena P. 1987. Hydroosmotic responses to short pulses of vasotocin hy toad hiadder. *Am I Pbysiol* 252:E705-E711

- Ellington, W. R., 1983. The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. *Journal of Experimental Zoology*, 228(3), 431-444. <https://doi.org/10.1002/jez.1402280305>
- Feder, M. E., Burggren, W. W., 1992. Environmental physiology of the amphibians. University of Chicago Press.
- Feidantsis, K., Anestis, A., Michaelidis, B., 2013. Seasonal variations of anti-/apoptotic and antioxidant proteins in the heart and gastrocnemius muscle of the water frog *Pelophylax ridibundus*. *Cryobiology*, 67(2), 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.009>
- Finn, R.N., Cerdà, J., 2018. Aquaporin. In: Choi, S. (eds) Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4\\_101692](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101692)
- Finol, J., Chacin, J., 1980. Gluconeogenesis in toad gastric mucosa. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65B, pp. 651-656. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90174-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90174-1)
- Fontana, D. C., Berlato, M. A., 2003. El Niño e La Niña: Impactos no Clima, na Vegetação e na Agricultura do Rio Grande do Sul; Aplicações de Previsões Climáticas na Agricultura.
- Fournier, P. A., Guderley, H. E. L. G. A., 1992. 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. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.262.2.R245>
- Frost, D. R., 2024. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.2 (Date of access). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>
- Gleeson, T.T., 1985. Glycogen synthesis from lactate in skeletal muscle of the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *J. comp. Physiol.* 156, 277–283, 1985. <https://doi.org/10.1007/BF00695783>
- Gleeson, T.T., Dalessio, P.M., 1990. Lactate: a substrate for reptilian muscle gluconeogenesis following exhaustive exercise. *J Comp Physiol B* 160, 331–338. <https://doi.org/10.1007/BF00302600>

- Goldman, S.S., 1988. Gluconeogenesis in the amphibian retina. Lactate is preferred to glutamate as the gluconeogenic precursor. *Biochem J.* Sep 1;254(2):359-65.. PMID: 2902849, 1988. <https://doi.org/10.1042/bj2540359>
- Gomez, N. A., Acosta, M., Zaidan III, F., Lillywhite, H. B., 2006. Wiping behavior, skin resistance, and the metabolic response to dehydration in the arboreal frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(6), 1058-1068. <https://doi.org/10.1086/507659>
- Goulet, F., Hélie, P., Vachon, P., 2010. Eugenol anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49(4), 460-463.
- Greenberg, D. A., Palen, W. J., 2021. Hydrothermal physiology and climate vulnerability in amphibians. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1945), 20202273. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2273>
- Greenway, S. C., Storey, K. B., 2000. Activation of mitogen-activated protein kinases during natural freezing and thawing in the wood frog. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 209, 29-37. <https://doi.org/10.1023/a:1007077522680>
- Gross, J. A., Cassol, R., 2015. Índice de anomalia de chuva do estado o Rio Grande do Sul. *Ambiência*, 11(3).
- Grundy, J. E., Storey, K. B., 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. *Journal of Comparative Physiology B*, 168, 132-142. <https://doi.org/10.1007/s003600050129>
- Gupta, A., Storey, K. B., 2020. Regulation of antioxidant systems in response to anoxia and reoxygenation in *Rana sylvatica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 243, 110436. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110436>
- Guschina, I. A., Harwood, J. L., 2006. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. *FEBS letters*, 580(23), 5477-5483. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.066>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)

- Haddad, C.F.B., Sazima, I., 1992. Anfíbios anuros da Serra do Japi. In: Morellato LPC (ed) História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. Editora da Unicamp/Fapesp, Campinas, Brazil, pp 188–211
- Hasegawa, T., Tanii, H., Suzuki, M., Tanaka, S., 2003. Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin-dependent water-channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3. *Endocrinology*, 144(9), 4087-4096. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0418>
- Harvey, C. B., Ellis, C., Tate, M., 1976. Inhibition of the righting reflex in the common bullfrog (*Rana catesbiana*) employing an operant-avoidance procedure. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 7, 57-58.
- Hawkins, L. J., Wang, M., Zhang, B., Xiao, Q., Wang, H., Storey, K. B., 2019. Glucose and urea metabolic enzymes are differentially phosphorylated during freezing, anoxia, and dehydration exposures in a freeze tolerant frog. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 30, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.cbcd.2019.01.009>
- Heatwole, H., Torres, F., De Austin, S. B., Heatwole, A., 1969. Studies on anuran water balance—I. Dynamics of evaporative water loss by the coqui, *Eleutherodactylus portoricensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 28(1), 245-269. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91342-5](https://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91342-5)
- Heyer, R., Donnelly, M. A., Foster, M., McDiarmid, R. (Eds.), 2014. Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution.
- Hermes-Lima, M. A. R. C. E. L., Storey, K. B., 1996. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271(4), R918-R925. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.4.R918>
- Hermes-Lima, M., Storey, K. B., 1998. Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Molecular and cellular biochemistry*, 189, 79-89. <https://doi.org/10.1023/A:1006868208476>
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M., Storey, K. B., 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In *Cell and molecular response to stress* (Vol. 2, pp. 263-287). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1568-1254\(01\)80022-X](https://doi.org/10.1016/S1568-1254(01)80022-X)



- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4), 537-556. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00080-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00080-7)
- Hillman, S. S., 1978. The roles of oxygen delivery and electrolyte levels in the dehydrational death of *Xenopus laevis*. *Journal of comparative physiology*, 128, 169-175. <https://doi.org/10.1007/BF00689481>
- Hillman, S. S., 1980. Physiological correlates of differential dehydration tolerance in anuran amphibians. *Copeia*, 125-129. <https://doi.org/10.2307/1444142>
- Hillman, S. S., Withers, P. C., Drewes, R. C., Hillyard, S. D., 2008. *Ecological and environmental physiology of amphibians*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570325.001.0001>,.
- Hutchison, V. H., Haines, H. B., & Engbretson, G., 1976. Aquatic life at high altitude: respiratory adaptations in the Lake Titicaca frog, *Telmatobius culeus*. *Respiration physiology*, 27(1), 115-129. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(76\)90022-0](https://doi.org/10.1016/0034-5687(76)90022-0)
- Ighodaro, O. M., Akinloye, O. A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Jenkins, C. N., Pimm, S. L., & Joppa, L. N., 2013. Global patterns of terrestrial vertebrate diversity and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), E2602-E2610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302251110>
- Joanisse, D. R., Storey, K. B., 1996. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271(3), R545-R553. <https://doi.org/10.1152/ajprequ.1996.271.3.R545>
- Jørgensen, C. B., 1997. Urea and amphibian water economy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(2), 161-170. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00356-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00356-8)
- Junior, B. T., Gomes, F. R., 2012. Balanço hídrico e a distribuição geográfica dos anfíbios. *Revista da Biologia*, 8, 49-57.



- Katzenback, B. A., Dawson, N. J., Storey, K. B., 2014. Purification and characterization of a urea sensitive lactate dehydrogenase from the liver of the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *Journal of Comparative Physiology B*, 184, 601-611. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0824-1>
- King, P.A., Rosholt, M.N., Storey, K.B., 1995. Seasonal changes in plasma membrane glucose transporters enhance cryoprotectant distribution in the freeze-tolerant wood frog. *Canadian Journal of Zoology*. 73(1): 1-9, 1995. <https://doi.org/10.1139/z95-001>
- King, R. F., Jones, B., O'Hara, J. P., 2018. The availability of water associated with glycogen during dehydration: a reservoir or raindrop?. *European journal of applied physiology*, 118, 283-290. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3768-9>
- Kiss, A. C. I., de Carvalho, J. E., Navas, C. A., Gomes, F. R., 2009. Seasonal metabolic changes in a year-round reproductively active subtropical tree-frog (*Hypsiboas prasinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152(2), 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.09.011>
- Kling, K. B., Costanzo, J. P., Lee, R. E., 1994. Post-freeze recovery of peripheral nerve function in the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Journal of Comparative Physiology B*, 164, 316-320. <https://doi.org/10.1007/BF00346449>
- Knickerbocker, D. L., Lutz, P. L., 2001. Slow ATP loss and the defense of ion homeostasis in the anoxic frog brain. *Journal of Experimental Biology*, 204(20), 3547-3551. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.20.3547>
- Kültz, D., 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 225-257 <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635>
- Kuzmin, S.L., 1999. *The amphibians of the former Soviet Union*. Sofia, Bulgaria: Pensoft.
- Kwet, A., Aquino, L., Lavilla, E. and di Tada, I., 2004. *Hypsiboas pulchellus*. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.1. <<http://www.iucnredlist.org>> (accessed in March 2024).
- Kwet, A., Di-Bernardo, M., 1999. *Pró-Mata–Anfíbios*. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Larson, D. J., Middle, L., Vu, H., Zhang, W., Serianni, A. S., Duman, J., & Barnes, B. M., 2014. Wood frog adaptations to overwintering in Alaska: new limits to freezing tolerance. *Journal of Experimental Biology*, 217(12), 2193-2200. <https://doi.org/10.1242/jeb.101931>

- Lewbart, G. A., 2019. 51 - Euthanasia of Ectotherms. Editor(s): R. Eric Miller, Nadine Lamberski, Paul P. Calle, Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 9, W.B. Saunders, 2019, Pages 357-363, ISBN 9780323552288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55228-8.00051-5>
- Lertzman-Lepofsky, G.F., Kissel, A.M., Sinervo, B., Palen, W.J., 2020. Water loss and temperature interact to compound amphibian vulnerability to climate change. *Global Change Biology*. 26: 4868– 4879. <https://doi.org/10.1111/gcb.15231>
- Lillywhite, H. B., Navas, C. A., 2006. Animals, energy, and water in extreme environments: perspectives from Ithala 2004. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(2), 265-273. <https://doi.org/10.1086/499987>
- Lima, É. S., Abdalla, D. S. P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Braz J Pharm Sci*, 37(3), 293-303.
- López, J. A., Scarabotti, P. A., Ghirardi, R., 2011. Seasonal patterns of abundance and recruitment in an amphibian assemblage from the Paraná River floodplain. *Interciencia*, 36(7), 538-544.
- Luedtke, J. A., Chanson, J., Neam, K., Hobin, L., Maciel, A. O., Catenazzi, A., ..., Stuart, S. N., 2023. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, 622(7982), 308-314. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06578-4>
- Lung, Z. D., & Storey, K. B., 2022. DNA damage and repair responses to freezing and anoxia stresses in wood frogs, *Rana sylvatica*. *Journal of Thermal Biology*, 107, 103274. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103274>
- Lutz, P. L., Reiners, R., 1997. Survival of energy failure in the anoxic frog brain: delayed release of glutamate. *Journal of experimental biology*, 200(22), 2913-2917. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.22.2913>
- Luu, B. E., Hawkins, L. J., Storey, K. B., 2021. Insights from a vertebrate model organism on the molecular mechanisms of whole-body dehydration tolerance. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(6), 2381-2392. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04072-x>
- MacCracken, J. G., Stebbings, J. L., 2012. Test of a body condition index with amphibians. *Journal of Herpetology*, 46(3), 346-350. <https://doi.org/10.1670/10-292>

- Madliger, C. L., Love, O. P., Hultine, K. R., Cooke, S. J., 2018. The conservation physiology toolbox: status and opportunities. *Conservation Physiology*, 6(1), coy029. <https://doi.org/10.1093/conphys/coy029>
- Malik, A. I., Storey, K. B., 2009. Activation of antioxidant defense during dehydration stress in the African clawed frog. *Gene*, 442(1-2), 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.04.007>
- Maluf, J. R. T., 2000. Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Agrometeorol*, 8(1), 141-150.
- Maneyro, R., 2008. Padrões de atividade espaço-temporais em uma assembléia neotropical de anuros (Doctoral dissertation, PhD Dissertation, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil).
- Maneyro, R., Carreira, S., 2012. Guía de anfibios del Uruguay. Ediciones de la Fuga.
- Marqueze, A., Kucharski, L. C., Da Silva, R. S. M., 2006. Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 332(2), 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.11.009>
- Martof, B. S., Humphries, R. L., 1959. Geographic variation in the wood frog *Rana sylvatica*. *The American Midland Naturalist*, 61(2), 350-389. <https://doi.org/10.2307/2422506>
- McClanahan, L. L., Ruibal, R., Shoemaker, V. H., 1994. Frogs and toads in deserts. *Scientific American*, 270(3), 82-88.
- Melkonian, E. A., Schury, M. P., 2019. Biochemistry, anaerobic glycolysis. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023. PMID: 31536301
- Morrison, A.D., Goodman, D.B., Rasmussen, H., Winegrad, A.I., 1972. Gluconeogenesis in toad urinary bladder. *Biochim Biophys Acta*. Jun 26;273(1):122-31, 1972. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(72\)90199-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(72)90199-7)
- Motulsky, H. J., Brown, R. E., 2006. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression—a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC bioinformatics*, 7, 1-20. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-123>

- Muir, T. J., Costanzo, J. P., Lee, R. E., 2007. Osmotic and metabolic responses to dehydration and urea-loading in a dormant, terrestrially hibernating frog. *Journal of Comparative Physiology B*, 177, 917-926. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0190-3>
- Navas, C. A., 1997. Thermal extremes at high elevations in the Andes: physiological ecology of frogs. *Journal of Thermal Biology*, 22(6), 467-477. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(97\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(97)00065-X)
- Navas, C. A., 1996a. Implications of microhabitat selection and patterns of activity on the thermal ecology of high elevation neotropical anurans. *Oecologia*, 108, 617-626. <https://doi.org/10.1007/BF00329034>
- Navas, C. A., 1996b. The effect of temperature on the vocal activity of tropical anurans: a comparison of high and low-elevation species. *Journal of Herpetology*, 488-497. <https://doi.org/10.2307/1565691>
- Navas, C. A., 1996c. Thermal dependency of field locomotor and vocal performance of high-elevation anurans in the tropical Andes. *Journal of Herpetology*, 478-487. <https://doi.org/10.2307/1565690>
- Navas, C. A., Antoniazzi, M. M., Jared, C., 2004. A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. In *International congress series* (Vol. 1275, pp. 298-305). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.08.061>
- Navas, C. A., Gomes, F. R., Carvalho, J. E., 2008. Thermal relationships and exercise physiology in anuran amphibians: integration and evolutionary implications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(3), 344-362. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.07.003>
- Navas, C. A., Carvalho, J. E., 2010. *Aestivation*. Berlin, Germany: Springer.
- Niu, Y., Cao, W., Storey, K. B., He, J., Wang, J., Zhang, T., ... Chen, Q., 2020. Metabolic characteristics of overwintering by the high-altitude dwelling Xizang plateau frog, *Nanorana parkeri*. *Journal of Comparative Physiology B*, 190, 433-444. <https://doi.org/10.1007/s00360-020-01275-4>
- Niu, Y., Zhang, X., Zhang, H., Xu, T., Zhu, L., Storey, K. B., Chen, Q., 2021. Metabolic responses of plasma to extreme environments in overwintering Tibetan frogs *Nanorana parkeri*: A metabolome integrated analysis. *Frontiers in Zoology*, 18(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12983-021-00428-7>

- Niu, Y., Zhang, X., Storey, K. B., 2022. Physiological and biochemical adaptations to high altitude in Tibetan frogs, *Nanorana parkeri*. *Frontiers in Physiology*, 13, 942037. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.942037>
- Niu, Y., Chen, Q., Storey, K. B., Teng, L., Li, X., Xu, T., Zhang, H., 2022. Physiological ecology of winter hibernation by the high-altitude frog *Nanorana parkeri*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 95(3), 201-211. <https://doi.org/10.1086/718764>
- Niu, Y., Li, X., Zhang, H., Xu, T., Wei, D., An, Z., Storey, K. B., 2023a. Hepatic transcriptome and gut microbiome provide insights into freeze tolerance in the high-altitude frog, *Nanorana parkeri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 48, 101147. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2023.101147>
- Niu, Y., Zhang, X., Men, S., Storey, K.B., Chen, Q., 2023b. Integrated analysis of transcriptome and metabolome data reveals insights for molecular mechanisms in overwintering Tibetan frogs, *Nanorana parkeri*. *Front Physiol.* Jan 9;13:1104476. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1104476>
- Ogushi, Y., Tsuzuki, A., Sato, M., Mochida, H., Okada, R., Suzuki, M., ... Tanaka, S., 2010. The water-absorption region of ventral skin of several semiterrestrial and aquatic anuran amphibians identified by aquaporins. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 299(5), R1150-R1162. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00320.2010>
- Oliveira, G. T., Da Silva, R. S., 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comparative biochemistry and physiology part A: physiology*, 118(4), 1429-1435. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00241-7](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00241-7)
- Oliveira, G. T., Eichler, P., Rossi, I. C., Da Silva, R. S., 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 301(3), 240-248. <https://doi.org/10.1002/jez.a.20026>
- Park, J-K., Do, Y., 2020. Physiological Response of *Pelophylax nigromaculatus* Adults to Salinity Exposure. *Animals*. 2020; 10(9):1698. <https://doi.org/10.3390/ani10091698>

- Peig, J., Green, A. J., 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, 118(12), 1883-1891. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., 2007. Amphibians. In *The middle Paraná River: limnology of a subtropical wetland* (pp. 327-340). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Petersen, A. M., Gleeson, T. T., 2011. Acclimation temperature affects the metabolic response of amphibian skeletal muscle to insulin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(1), 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.005>
- Petranka, J.W., 1979. The effects of severe winter weather on *Plethodon dorsalis* and *Plethodon richmondi* populations in central Kentucky. *Journal of Herpetology* 13: 369-371.
- Pimm, S. L., Jenkins, C. N., Abell, R., Brooks, T. M., Gittleman, J. L., Joppa, L. N., ... & Sexton, J. O., 2014. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *science*, 344(6187), 1246752. <https://doi.org/10.1126/science.1246752>
- Pinder, A.W., Storey, K.B., Ultsch, G.R. 1992. Estivation and hibernation. In *Environmental physiology of the amphibians*, ed. M. E. Feder and W. W. Burggren, 250–74. Chicago: University of Chicago Press.
- Pough, F. H., 2007. Amphibian Biology and Husbandry. *ILAR Journal*, Volume 48, Issue 3, Pag 203–213.
- Puchalski, L. A., 2000. Efeitos associados ao El Niño e La Niña na temperatura média, precipitação pluvial e no déficit hídrico no Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 83
- Reider, K. E., Larson, D. J., Barnes, B. M., & Donnelly, M. A., 2021. Thermal adaptations to extreme freeze–thaw cycles in the high tropical Andes. *Biotropica*, 53(1), 296-306. <https://doi.org/10.1111/btp.12875>
- Rexer-Huber, K.M., Bishop, P.J., Wharton, D.A., 2011. Skin ice nucleators and glycerol in the freezing-tolerant frog *Litoria ewingii*. *J Comp Physiol B*. 2011 Aug;181(6):781-92. PMID: 21373937. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0561-7>

- Roberts, J. D., 1990. The biology of *Arenophryne rotunda* (Anura: Myobatrachidae): a burrowing frog from Shark Bay, Western Australia. Research in Shark Bay. Report of the France-Australe Bicentenary Expedition Committee. Western Australian Museum.
- Rodríguez, C. Y., Bustos, D. A., Sanabria, E. A., 2019. Adaptation of the Andean toad *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) at low temperatures: The role of glucose as cryoprotectant. *Physiological And Biochemical Zoology*, 92(5), 473-480. <http://dx.doi.org/10.1086/705122>
- Rogatzki, M. J., Ferguson, B. S., Goodwin, M. L., Gladden, L. B., 2015. Lactate is always the end product of glycolysis. *Frontiers in neuroscience*, 9, 125097. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00022>
- Rosendale, A. J., Costanzo, J. P., Lee Jr, R. E., 2012. Seasonal variation and response to osmotic challenge in urea transporter expression in the dehydration-and freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 317(7), 401-409. <https://doi.org/10.1002/jez.1733>
- Rosendale, A. J., Lee Jr, R. E., Costanzo, J. P., 2015. Seasonal variation and freezing response of glucose transporter 2 in liver of the wood frog: implications for geographic variation in freeze tolerance. *Journal of Zoology*, 297(2), 132-138. <https://doi.org/10.1111/jzo.12255>
- Rossa-Feres, D. D. C., Jim, J., 1994. Distribuição sazonal em comunidades de anfíbios anuros na região de Botucatu, São Paulo. *Revista Brasileira de Biologia*, 54(2), 323-334.
- Roufayel, R., Biggar, K.K., Storey, K.B., 2011. Regulation of cell cycle components during exposure to anoxia or dehydration stress in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Zoology*, 315, 487–494. <https://doi.org/10.1002/jez.696>
- Roumes, H., Dumont, U., Sanchez, S., Mazuel, L., Blanc, J., Raffard, G., ...Bouzier-Sore, A. K., 2021. Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 41(2), 342-358. <https://doi.org/10.1177/0271678X20908355>
- Saeed, M., Rais, M., Gray, R. J., Ahmed, W., Akram, A., Gill, S., Fareed, G., 2021. Rise in temperature causes decreased fitness and higher extinction risks in endemic frogs at high altitude forested wetlands in northern Pakistan. *Journal of Thermal Biology*, 95, 102809. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102809>



- Schermerhorn, T., 2013. Normal glucose metabolism in carnivores overlaps with diabetes pathology in non-carnivores. *Front Endocrinol.* 4:1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00188>
- Schmid, W. D., 1982. Survival of frogs in low temperature. *Science*, 215(4533), 697-698. <https://doi.org/10.1126/science.7058335>
- Shekhovtsov, S. V., Bulakhova, N. A., Tsentelovich, Y. P., Zelentsova, E. A., Yanshole, L. V., Meshcheryakova, E. N., & Berman, D. I., 2020. Metabolic response of the Siberian wood frog *Rana amurensis* to extreme hypoxia. *Scientific reports*, 10(1), 14604. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71616-4>
- Shekhovtsov, S. V., Bulakhova, N. A., Tsentelovich, Y. P., Zelentsova, E. A., Meshcheryakova, E. N., Poluboyarova, T. V., & Berman, D. I., 2022. Metabolomic analysis reveals that the moor frog *Rana arvalis* uses both glucose and glycerol as cryoprotectants. *Animals*, 12(10), 1286. <https://doi.org/10.3390/ani12101286>
- Sherman, W. M., Plyley, M. J., Sharp, R. L., Van Handel, P. J., McAllister, R. M., Fink, W. J., Costill, D. L., 1982. Muscle glycogen storage and its relationship with water. *International journal of sports medicine*, 3(01), 22-24. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1026056>
- Shpun, S., Hoffman, J., Katz, U., 1992. Anuran amphibia which are not acclimable to high salt, tolerate high plasma urea. *Comparative Biochemistry and physiology. Comparative Physiology*, 103(3), 473-477. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90274-t](https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90274-t)
- Schurr, A., 2006. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate?. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(1), 142-152. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600174>
- Singhal, S. S., Saxena, M., Ahmad, H., Awasthi, S., Haque, A. K., Awasthi, Y. C., 1992. Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the  $\alpha$ -class isozymes against lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 299(2), 232-241. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90269-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90269-3)
- Smith, M. 1969. *The British amphibians and reptiles*. Fourth Edition. London: Collins.



- Shoemaker, V. H., Balding, D., Ruibal, R., McClanahan Jr, L. L., 1972. Uricotelism and low evaporative water loss in a South American frog. *Science*, 175(4025), 1018-1020. <https://doi.org/10.1126/science.175.4025.1018>
- Shoemaker, V. H., 1992. Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. *Environmental physiology of the amphibians*, 125-150.
- Sokolova, I., 2008. Poikilotherms. editor(s): Sven Erik Jørgensen, Brian D. Fath, *Encyclopedia of Ecology*, Academic Press, 2008, Pages 2851-2854, ISBN 9780080454054. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00536-X>
- Stewart, E. R., Reese, S. A., Ultsch, G. R., 2004. The physiology of hibernation in Canadian leopard frogs (*Rana pipiens*) and bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(1), 65-73. <https://doi.org/10.1086/378921>
- Storey, K.B., 1984. Freeze tolerance in the frog, *Rana sylvatica*. *Experientia*, 40 (11), 1261-1262. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0210153>
- Storey, K. B., 1987. Organ-specific metabolism during freezing and thawing in a freeze-tolerant frog. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 253(2), R292-R297. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1987.253.2.R292>
- Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
- Storey, K. B., 1997. Organic solutes in freezing tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(3), 319-326. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(96\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(96)00270-8)
- Storey, K. B., 2000. Turning down the fires of life: metabolic regulation of hibernation and estivation. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 126, S90-S90. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)80178-9](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)80178-9)
- Storey, K. B., 2002. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(3), 733-754. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00206-4)
- Storey, K. B., Storey, J. M., 1984. Biochemical adaptation for freezing tolerance in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Journal of Comparative Physiology B*, 155, 29-36. <https://doi.org/10.1007/BF00688788>

- Storey, K. B., Storey, J. M., 1986. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze–thaw cycles. *Canadian Journal of Zoology*, 64(1), 49-56. <https://doi.org/10.1139/z86-008>
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1987. Persistence of freeze tolerance in terrestrially hibernating frogs after spring emergence. *Copeia* 1987(3): 720-726. <https://doi.org/10.2307/1445665>
- Storey, K. B., Storey, J. M., 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *The Quarterly Review of Biology*, 65(2), 145-174. <https://doi.org/10.1086/416717>
- Storey, K. B., Storey, J. M., 1992. Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates. *Annual review of physiology*, 54(1), 619-637. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.003155>
- Storey, K. B., Storey, J. M., 1996. Natural freezing survival in animals. *Annual review of ecology and systematics*, 27(1), 365-386. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.365>
- Storey, K. B., Storey, J. M., 2013. Molecular biology of freezing tolerance. *Compr Physiol*, 3(3), 1283-1308. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130007>
- Storey, K. B., Storey, J. M., 2017. Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. *Physiological Reviews*, 97(2), 623-665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2016>
- Storey, J.M., Storey, K.B., 2019. In defense of proteins: chaperones respond to freezing, anoxia, or dehydration stress in tissues of freeze tolerant wood frogs. *J. Exp. Zool.: Ecological and Integrative Physiology* 331 (7), 392–402. <https://doi.org/10.1002/jez.2306>
- Storey, J. M., Wu, S., Storey, K. B., 2021. Mitochondria and the frozen frog. *Antioxidants*, 10(4), 543. <https://doi.org/10.3390/antiox10040543>
- Storey, J. M., Li, Z., Storey, K. B., 2023. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  responds to freezing, anoxia and dehydration stresses in a freeze-tolerant frog. *Cryobiology*, 110, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.242>
- Stuart, L. C., 1951. The distributional implications of temperature tolerances and hemoglobin values in the toads *Bufo marinus* (Linnaeus) and *Bufo bocourti* Brocchi. *Copeia*, 1951(3), 220-229. <https://doi.org/10.2307/1439101>

- Suzuki, M., Hasegawa, T., Ogushi, Y., Tanaka, S., 2007. Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(1), 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.021>
- Suzuki, M., Tanaka, S., 2009. Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(3), 231-241. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.035>
- Suzuki, M., Shibata, Y., Ogushi, Y., Okada, R., 2015. Molecular machinery for vasotocin-dependent transepithelial water movement in amphibians: aquaporins and evolution. *The Biological Bulletin*, 229(1), 109-119. <https://doi.org/10.1086/BBLv229n1p109>
- Swanson, D.L., Graves, B.M., 1995. Supercooling and freeze intolerance in overwintering juvenile spadefoot toads (*Scaphiopus bombifrons*). *Journal of Herpetology* 29: 280-285. <https://doi.org/10.2307/1564568>
- Tanii, H., Hasegawa, T., Hirakawa, N., Suzuki, M., Tanaka, S., 2002. Molecular and cellular characterization of a water-channel protein, AQP-h3, specifically expressed in the frog ventral skin. *The Journal of membrane biology*, 188, 43-53. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0172-4>
- Tattersall, G. J., Ultsch, G. R., 2008. Physiological ecology of aquatic overwintering in ranid frogs. *Biological Reviews*, 83(2), 119-140. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00035.x>
- Tracy, C. R., 1976. A model of the dynamic exchanges of water and energy between a terrestrial amphibian and its environment. *Ecological Monographs*, 46(3), 293-326. <https://doi.org/10.2307/1942256>
- Tracy, C. R., 1982. Biophysical modeling in reptilian physiology and ecology. *Biology of the Reptilia*, 12, 275-321.
- Tracy, C. R., Rubink, W. L., 1978. The role of dehydration and antidiuretic hormone on water exchange in *Rana pipiens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 61(4), 559-562. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(78\)90127-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(78)90127-5)
- Thomas, J. A., Schlender, K. K., Lerner, J., 1968. A rapid filter paper assay for UDP glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-

- $^{14}\text{C}$ -glucose. *Analytical biochemistry*, 25, 486-499. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90127-9)
- Thompson, G. G., Withers, P. C., McMaster, K. A., Cartledge, V. A., 2005. Burrows of desert-adapted frogs, *Neobatrachus aquilonius* and *Notaden nichollsi*. *Journal of the Royal Society of Western Australia*, 88, 17.
- Tyler, M. J., Roberts, J. D., Davies, M., 1980. Field observations on *Arenophryne rotunda* Tyler, a Leptodactylid frog of coastal sandhills. *Wildlife Research*, 7(2), 295-304. <https://doi.org/10.1071/WR9800295>
- Toledo, R. C., Jared, C., 1993. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 105(4), 593-608. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90259-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90259-7)
- Torres, I. L. D. S., Gamaro, G. D., Silveira-Cucco, S. N., Michalowski, M. B., Corrêa, J. B., Perry, M. L. S., Dalmaz, C., 2001. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to  $\text{CO}_2$  in hippocampal and cerebral cortex slices. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 111-116. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000100013>
- Tracy, C. R., Tixier, T., Le Nöene, C., Christian, K. A., 2014. Field hydration state varies among tropical frog species with different habitat use. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(2), 197-202. <https://doi.org/10.1086/674537>
- Uchiyama, M., & Konno, N., 2006. Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. *General and comparative endocrinology*, 147(1), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.12.018>
- Van Beurden, E. K., 1980. Energy metabolism of dormant Australian water-holding frogs (*Cyclorana platycephalus*). *Copeia*, 787-799. <https://doi.org/10.2307/1444458>
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical biochemistry*, 11(2), 256-265. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90013-8)
- Van Vossel-Daeninck, J., Dierickx, K., Vandesande, F., Van Vossel, A., 1981. Electron-microscopic immunocytochemical demonstration of separate vasotocinergic, mesotocinergic and somatostatinergic neurons in the hypothalamic magnocellular preoptic nucleus of the frog. *Cell and tissue research*, 218, 7-12. <https://doi.org/10.1007/BF00210086>

- Varjão, I. C. G., Ribeiro, L. B., 2018. Field record of aestivation with formation of cocoon in the frog *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) in a semiarid region of northeastern Brazil. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 17(1), 135-138. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v17i1p135-138>
- Varma, A., Storey, K.B., 2022. One-step purification and regulation of fructose 1,6-bisphosphatase from the liver of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Cell Biochem Funct.* Jul;40(5):491-500. <https://doi.org/10.1002/cbf.3710>
- Varma, A., Storey, K. B., 2023a. Freeze-induced suppression of pyruvate kinase in liver of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Advances in Biological Regulation*, 88, 100944. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2022.100944>
- Varma, A., Storey, K.B., 2023b. Hepatic citrate synthase suppression in the freeze-tolerant wood frog (*Rana sylvatica*). *Int. J. Biol. Macromol.* 242 (Pt 1), 124718 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124718>
- Viborg, A. L., Hillyard, S. D., 2005. Cutaneous blood flow and water absorption by dehydrated toads. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(3), 394-404. <https://doi.org/10.1086/430225>
- Voituron, Y., Eugene, M., Barré, H., 2003. Survival and metabolic responses to freezing by the water frog (*Rana ridibunda*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 299(2), 118-126. <https://doi.org/10.1002/jez.a.10285>
- Willumsen, N. J., Viborg, A. L., Hillyard, S. D., 2007. Vascular aspects of water uptake mechanisms in the toad skin: perfusion, diffusion, confusion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(1), 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.032>
- Wu, C. W., Tessier, S. N., Storey, K. B., 2017. Regulation of the insulin–Akt signaling pathway and glycolysis during dehydration stress in the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(6), 663-671. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0117>
- Wu, C. W., Tessier, S. N., Storey, K. B., 2018. Stress-induced antioxidant defense and protein chaperone response in the freeze-tolerant wood frog *Rana sylvatica*. *Cell Stress and Chaperones*, 23(6), 1205-1217. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0926-x>

- Yoldas, T., Erismis, U. C., 2021. Response of Anatolian mountain frogs (*Rana macrocnemis* and *Rana holtzi*) to freezing, anoxia, and dehydration: Glucose as a cryoprotectant. *Cryobiology*, 98, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.019>
- Young, S., Warner, J., Speare, R., Berger, L., Skerratt, L. F., Muller, R., 2012. Hematologic and plasma biochemical reference intervals for health monitoring of wild Australian tree frogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4), 478-492. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00470.x>
- Ximenez, S.S., Tozetti, A.M., 2015. Seasonality in anuran activity and calling season in a Brazilian subtemperate wetland. *Zoological Studies* 54:47. <https://doi.org/10.1186/s40555-015-0125-8>
- Zhang, J., Hawkins, L. J., Storey, K. B., 2020. DNA methylation and regulation of DNA methyltransferases in a freeze-tolerant vertebrate. *Biochemistry and Cell Biology*, 98(2), 145-153. <https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0091>
- Zhang, J., Gupta, A., Storey, K.B., 2021. Freezing stress adaptations: critical elements to activate Nrf2 related antioxidant defense in liver and skeletal muscle of the freeze tolerant wood frogs. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochemistry and Molecular Biology* 254, 110573. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110573>

## ANEXO I



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75475-6	Data da Emissão: 26/02/2024 10:40:28	Data da Revalidação*: 01/01/2025
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: Marjoriane de Amaral	CPF: 015.527.050-80
Título do Projeto: Alterações fisiológicas na espécie Sul-Americana Boana pulchella: tolerância ao congelamento, anoxia e desidratação	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	CNPJ: 92.969.856/0001-98

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Projeto de Doutorado	07/2020	04/2024

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Deivid Pereira	Colaborador	025.706.920-65	Brasileira
2	Patrick Colombo	Colaborador	927.385.590-34	Brasileira
3	Dener Heiermann	Colaborador	039.562.200-05	Brasileira
4	CAROLINE ZANK	Colaboradora	000.920.260-95	Brasileira
5	Marcelo Duarte freire	Colaborador	577.770.630-49	Brasileira
6	Caroline Nectoux Cuijau	Colaboradora	024.976.150-55	Brasileira
7	Bitiliana Campanher Ramos	Colaboradora	010.937.180-13	Brasileira
8	Maria Eduarda Bernardino Cunha	Colaboradora	872.193.100-30	Brasileira
9	Priscila Cortéz Barth	Colaboradora	023.669.210-04	Brasileira
10	GUSTAVO KASPER CUBAS	Auxiliar	874.910.010-68	Brasileira

## Observações e ressalvas

1	Todos os membros de equipe de pesquisa devem estar cientes das recomendações e boas práticas a serem seguidas neste momento de emergência zoonozótica no Brasil devido à gripe aviária. Informe-se na página do CEMAVE na internet: <a href="https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cehave/destaques/gripe-aviaria/gripe-aviaria-1">https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/cehave/destaques/gripe-aviaria/gripe-aviaria-1</a> .
2	Esta autorização NÃO isene o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
3	Esta autorização NÃO isene o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	Este documento não dispensa o cumprimento da Lei nº 13.123/2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável de biodiversidade.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia (Decreto nº 98.830, de 15/01/95).
6	Esta autorização NÃO isene o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena, de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites da unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0754750620240226

Página 1/6



## ANEXO II



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 39416

Título: ALTERACOES FISIOLÓGICAS NA ESPÉCIE SUL-AMERICANA BOANA PULCHELLA:  
TOLERANCIA AO CONGELAMENTO, ANOXIA E DESIDRATAÇÃO

Vigência: 01/07/2020 à 31/07/2024

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUIZ CARLOS RIOS KUCHARSKI - coordenador desde 01/07/2020  
MARJORIANE DE AMARAL - desde 01/07/2020

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 08/03/2021 - Reunião via webconferência - Mconf UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 140 pererecas-do-banhado (Boana pulchella), machos (identificados pela presença de saco vocal), adultos (vocalizando), provenientes da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Quinta-Feira, 18 de Março de 2021

  
ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética



## ANEXO III

GOVERNO DO ESTADO  
**RIO GRANDE DO SUL**  
SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE  
E INFRAESTRUTURAProcesso nº  
2492-05.67 / 18.2

AUTUFS Nº 00078 / 2019

**AUTORIZAÇÃO DE USO E MANEJO DE FAUNA SILVESTRE**

A Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, com base no art. 55, da Lei Estadual nº 11.520, de 03 de agosto de 2000 e com base nos autos do processo administrativo nº 2492-05.67/18.2 concede o presente documento de AUTORIZAÇÃO DE USO E MANEJO DE FAUNA SILVESTRE.

**I - Identificação:**

EMPREENDEDOR RESPONSÁVEL: 172729 - FUNDAÇÃO ZOOBOTANICA DO RIO GRANDE DO SUL - FZB

CPF / CNPJ / Doc Estr: 87.912.929/0001-75  
ENDEREÇO: RUA SALVADOR FRANCA, 1427  
JARDIM BOTANICO  
90690-000 PORTO ALEGRE - RS

EMPREENDIMENTO: 407739

LOCALIZAÇÃO: RUA SALVADOR FRANCA 1427 MUSEU DE CIÊNCIAS NATURAIS  
JARDIM BOTANICO  
PORTO ALEGRE - RS  
COORDENADAS GEOGRÁFICAS: Latitude: -30,05166687 Longitude: -51,17723733

A PROMOVER: AUTORIZAÇÃO DE USO E MANEJO DE FAUNA SILVESTRE

RAMO DE ATIVIDADE: 12.111,00  
MEDIDA DE PORTE: 350,00 nº de indivíduos**II - Condições e Restrições:****1. Quanto ao Empreendimento:**

- 1.1- esta Autorização refere-se ao uso e manejo de fauna silvestre de acordo com as especificações constantes dos planos, programas ou projetos aprovados, para a categoria de Criadouro Científico de Fauna Silvestre.
- 1.2- ficam Autorizadas as seguintes espécies: Boa constrictor, Bothrops alternatus, Bothrops atrox, Bothrops diporus, Bothrops jararaca, Bothrops jararacussu, Bothrops pubescens, Crotalus durissus, Micrurus altirostris, Oxyrhopus rhombifer, Pantherophis guttatus, Philodryas olfersii, Thamnodynastes strigatus, Eublepharis macularius, Pantherophis obsoletus, Boa faber, Boa pulchella, Phylomedusa iheringii, Scinax tymbamirim, Leptodactylus latrans, Rhinella icterica, Rhinella henseli, Ischnocnema henseli, Physalaemus cuvieri, Physalaemus gracilis, Melanophryniscus macrogranulosus, Melanophryniscus spp., Ceratophrys aurita, Chthonerpeton indistinctum.
- 1.3- caso ocorram alterações em documentação/projeto do empreendimento deverão ser precedidas de Autorização da SEMA, inclusive novas instalações e projetos a serem executados;
- 1.4- esta Autorização não exige o empreendedor do atendimento às demais licenças e autorizações federais, estaduais e municipais exigíveis por Lei;
- 1.5- deverá apresentar juntamente com o relatório de movimentações a relação contendo as vendas do período com o número das notas fiscais, espécies e respectivos compradores;
- 1.6- deverá enviar ANUALMENTE, relatório de movimentações no empreendimento;
- 1.7- Esta Autorização de Manejo deverá ficar localizada em local BEM VISÍVEL na entrada do empreendimento;

## ANEXO IV

19/04/2024, 17:12

Chasque Webmail :: CBPA-D-24-00120 - Confirming your submission to Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

### CBPA-D-24-00120 - Confirming your submission to Comparative Biochemistry and Physiology, Part A



**De** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A <em@editorialmanager.com>  
**Remetente** <em.cbpa.0.8ad324.f2275372@editorialmanager.com>  
**Para** Marjoriane de Amaral <marjoriane.amaral@ufrgs.br>  
**Responder p...** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A <support@elsevier.com>  
**Data** 2024-04-19 12:10

\*This is an automated message.\*

Coping with dry spells: investigating oxidative balance and metabolic responses in frogs during dehydration and rehydration exposure

Dear Dr de Amaral,

We have received the above referenced manuscript in Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. It has been assigned the following manuscript number:  
**CBPA-D-24-00120.**

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/cbpa/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder. If you need any assistance or have any questions while we are handling your manuscript, please contact our editorial office at [cba@elsevier.com](mailto:cba@elsevier.com).

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office  
Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines (<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful, including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5l8thD9XtE>). Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into Editorial Manager to check the status of your manuscript ([https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/)). #AU\_CBPA#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. ([Remove my information/details](#)). Please contact the publication office if you have any questions.