

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Conclusão de Curso

**ASPECTOS METABÓLICOS ADAPTATIVOS AO FRIO DA  
PERERECA SUL-AMERICANA *Boana pulchella* (Duméril & Bibron  
1841) (ANURA, HYLIDAE).**

Marjoriane de Amaral

Porto Alegre, 2017.

Aspectos metabólicos adaptativos ao frio da perereca sul-americana *Boana pulchella*

(Duméril & Bibron 1841) (Anura, Hylidae).

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski

Co-orientador: Dr. Patrick Colombo

Banca examinadora:

Prof. Dr. Márcio Borges Martins

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anapaula Sommer Vinagre

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Comissão de Graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Porto Alegre, 2017.

### CIP - Catalogação na Publicação

Amaral, Marjoriane  
ASPECTOS METABÓLICOS ADAPTATIVOS AO FRIO DA  
PERERECA SUL-AMERICANA *Boana pulchella* (Duméril &  
Bibron 1841) (ANURA, HYLIDAE). / Marjoriane Amaral. -  
- 2017.  
41 f.

Orientador: Luiz Carlos Rios Kucharski.  
Coorientador: Patrick Colombo.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,  
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Anuros. 2. Crioprotetores. 3. *B. pulchella*. 4.  
Temperatura. I. Rios Kucharski, Luiz Carlos, orient.  
II. Colombo, Patrick, coorient. III. Título.

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

*“...Se o segundo dinossauro à esquerda da cicadófito não tivesse espirrado e, assim, tivesse conseguido pegar o minúsculo semimúsculo ancestral dos mamíferos, nenhum de nós estaria aqui. Todos podemos nos considerar formidavelmente improváveis. Mas, num triunfo retrospectivo, aqui estamos.”*

*(Richard Dawkins)*

Manuscrito formatado segundo as regras editoriais da Revista Brasileira de Biociências.

As tabelas e figuras essenciais seguem ao longo do texto para melhor compreensão.

**Aspectos metabólicos adaptativos ao frio da perereca sul-americana**

***Boana pulchella* (Duméril & Bibron 1841) (Anura, Hylidae).**

Marjoriane de Amaral<sup>1\*</sup>, Luiz Carlos Kucharski<sup>1</sup> & Patrick Colombo<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmiento Leite, n° 500 – 3° andar. CEP: 90.050-170. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Setor de Anfíbios, Seção de Zoologia de Vertebrados, Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB). Rua Dr. Salvador França, n° 1427. CEP: 90.690-000. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

\* Contato do autor: Marjoriane de Amaral – [marjodeamaral@gmail.com](mailto:marjodeamaral@gmail.com)

**(Aspectos metabólicos adaptativos ao frio da perereca sul-americana**

***Boana pulchella*(Duméril & Bibron 1841) (Anura, Hylidae)).**

**RESUMO:** Viver em ambientes extremos requer estratégias e adaptações para suportar/tolerar essas condições. Os ectotérmicos, em especial os anuros, habitam os mais variados locais em nosso planeta e também desenvolveram ao longo da sua evolução estratégias para garantir essa ampla distribuição. Alguns anuros sobrevivem em ambientes frios com temperaturas muito baixas pois conseguem suportar e/ou tolerar o congelamento. Alterações metabólicas como a mobilização de crioprotetores, armazenamento preparatório de glicogênio hepático e alterações nas expressões protéicas garante a sobrevivência desses animais no frio. O Rio Grande do Sul apresenta temperaturas muito baixas com, inclusive, precipitação de neve e geada, no entanto são quase inexistentes os trabalhos relativos as adaptações dos anuros a essas temperaturas nesse Estado. Neste trabalho, portanto, o objetivo foi verificar se há alterações no glicogênio, na glicemia, nos triglicerídeos e nas proteínas totais plasmáticas da espécie Sul-Americana *Boana pulchella* e se essas alterações indicam alguma mudança durante períodos diferentes. Os animais foram coletados na Área de Proteção Ambiental do Banhado Grande – (APABG) durante os meses de maio e junho. Entre os indivíduos, verificamos que as concentrações plasmáticas de glicose, proteínas e triglicerídeos mantiveram-se constantes entre as coletas. A concentração de glicogênio hepático, porém, apresentou valores elevados indicando que nesses animais ele é uma importante reserva de glicose para períodos críticos de disponibilidade de alimento e/ou frio.

**Palavras-chave:** Anuros, crioprotetores, frio, glicogênio, glicose.

**(Adaptative metabolic aspects to cold in a south american treefrog**

***Boana pulchella*(Duméril & Bibron 1841)(Anura, Hylidae)).**

**ABSTRACT:** Living in extreme environments requires strategies and adaptations to support/tolerate these conditions. Ectothermic animals, especially anurans, inhabit the most diverse places on our planet and also developed, throughout their evolution, strategies to guarantee this wide distribution. Some anurans survive in cold environments with very low temperatures because they can endure and/or tolerate freezing. Metabolic changes as cryoprotectants mobilization, preparatory storage of hepatic glycogen and alterations in protein expression ensure the survival of these animals in the cold. Rio Grande do Sul has very low temperatures with, inclusive, snowfall and frost, however, there is almost no work on the adaptation of anurans to these temperatures in that State. In this work, therefore, the objective was to verify if there are changes in glycogen, glycemia, triglycerides and total plasma proteins of the South American specie *Boana pulchella* and whether these changes indicate some change during different periods. The animals were collected in the Environmental Protection Area of Banhado Grande - (APABG) during the months of May and June. Among individuals, we observed that plasma concentrations of glucose, proteins and triglycerides remained constant between collections. The hepatic glycogen concentration, however, presented high values indicating that in these animals it is an important reservoir of glucose for critical periods of food availability and/or cold.

**Key words:** Anurans, cryoprotectants, cold, glycogen, glucose.



## INTRODUÇÃO

Os diversos organismos vivos existentes em nosso planeta desenvolveram estratégias e adaptações para obter um sucesso evolutivo nos mais variados habitats. Essas adaptações foram modeladas, principalmente, pelo ambiente no qual estes organismos existem. Adaptações a quantidades diferentes de incidência solar, diferentes altitudes e variações de temperatura são exemplos de fatores abióticos que podem distinguir os habitats entre si (Hill et al. 2012). Por mais extremos que sejam esses fatores em cada local, quase sempre haverá seres vivos bem sucedidos e adaptados àquelas condições.

As variações de temperatura são fatores, muitas vezes, limitantes para algumas espécies, isto porque há locais onde os invernos são muito rigorosos, exigindo do organismo que ali habita algumas estratégias para tolerar e/ou suportar o frio (Hill et al. 2012). Os vertebrados ectotérmicos, em especial, colonizaram com sucesso praticamente todos os nichos ecológicos disponíveis na terra, alguns vivendo em habitats sazonalmente (efeitos migratórios) ou continuamente, em ambientes frios de altas latitudes e altitudes (Costanzo et al. 2013). Muitos desses animais ectotérmicos, portanto, vivem em regiões frias do nosso planeta e conseguiram êxito na sobrevivência devido ao desenvolvimento de estratégias e adaptações a essas temperaturas.

Uma das estratégias mais curiosas é a tolerância ao congelamento quando o animal baixa seu metabolismo de tal maneira que consegue suportar temperaturas muito baixas. A tolerância ao congelamento em vertebrados foi relatada pela primeira vez há mais de 30 anos e dezenas de publicações têm aparecido desde então (p. e. Storey & Storey 1984, Schmid 1982). Porém, sabe-se pouco sobre a variação e a capacidade de tolerância ao congelamento entre populações congêneres (Costanzo et al. 2015) e em muitas espécies ainda não estudadas. Sabemos que, pelo menos, cinco espécies de anuros da América do Norte - *Dryophytes chrysoscelis*, *Dryophytes versicolor*, *Pseudacris crucifer*, *Pseudacris triseriatae*

*Lithobates sylvaticus* (Schmid 1986, Costanzo et al. 1992b, Schmid 1982, Storey & Storey 1987) – sobrevivem ao congelamento de seus fluidos corporais internos a temperaturas tão baixas quanto  $-8^{\circ}\text{C}$  no inverno (Costanzo et al. 2015). Foi descrito, mais detalhadamente, a capacidade de tolerar o congelamento da espécie subártica *Lithobates sylvaticus*, a qual será referência nesse trabalho (Storey & Storey 1984).

A rã-madeira (*Lithobates sylvaticus*), como popularmente é conhecida na América do Norte, é um anuro pertencente a família Ranidaeae. É uma rã de tamanho pequeno/médio com medidas do corpo na fase adulta entre 3,7 cm a 8,3 cm de comprimento rostro-cloacal (Martof 1970). Ela apresenta hábitos terrestres, sendo encontrada em áreas arborizadas úmidas ou próxima a elas. Temperatura e disponibilidade de habitat são fatores limitantes para a distribuição dessa espécie norte-americana, no entanto, sua distribuição é ampla, podendo ser encontrada do sul dos Montes Apalaches (Estados Unidos) até o Círculo Ártico (Martof & Humphries 1959).

Como descrito na literatura, a rã-da-floresta consegue congelar até dois terços da água total do seu corpo. Os indivíduos encontrados nos Estados Unidos e no Canadá, podem suportar temperaturas negativas de  $-3^{\circ}\text{C}$  a  $-6^{\circ}\text{C}$ . Experimentalmente, os indivíduos do Ártico conseguiram suportar o congelamento a temperatura de  $-16^{\circ}\text{C}$  (Costanzo et al. 2013). Essa capacidade de congelamento só é possível devido a ação dos chamados crioprotetores, os quais controlam a taxa de formação de gelo extracelular, diminuindo os danos de dessecação que a cristalização do gelo causa nos tecidos. Esses crioprotetores possuem propriedades coligativas, reduzindo o limite da extensão do volume celular e estabilizando a estrutura da membrana durante o congelamento (Storey & Storey 1992). Crioprotetores coligativos apresentam baixo peso molecular, sendo representados pelos carboidratos (glicose ou carboidratos alcoólicos). Eles se acumulam em altas concentrações celulares, proporcionando uma alta resistência a perda de água intracelular pelos cristais de gelo extracelulares,

estabilizando a célula e aumentando as chances de sobreviver depois do congelamento (Storey & Storey 1996).

Dentre outros fatores, a capacidade de sobrevivência durante o congelamento na espécie *Lithobates sylvaticus* depende da quantidade de glicose mobilizada durante esse congelamento. Durante o período de congelamento, os níveis plasmáticos de glicose sobem entre 150 a 300 mM, enquanto que em animais não expostos ao congelamento esses níveis variam entre 1 a 5 mM (Storey & Storey 1986). Essa glicose, utilizada como crioprotetor, é oriunda do catabolismo das reservas de glicogênio hepático, as quais aumentam durante o verão até o início do outono. O glicogênio é um polímero ramificado de radicais de glicose, sendo a principal fonte de armazenamento de carboidratos em vertebrados (Bollen 1998).

A ativação da liberação de glicose que está nos tecidos sob a forma de glicogênio ocorre quando o primeiro floco de gelo atinge a pele do animal, provocando uma sinalização em cascata transmitida de locais periféricos da pele para o fígado. A origem dessa sinalização - nervosa ou hormonal - porém, ainda não é completamente conhecida. Após o descongelamento do indivíduo, essa glicose é restaurada de forma lenta e gradual em glicogênio hepático, estando disponível, novamente, para o próximo congelamento (Storey 1987).

Além da capacidade de mobilização de glicose hepática durante esse processo, sabe-se que durante o congelamento/descongelamento há muitos danos ocasionados pelo estresse oxidativo mediados pela glicose. Para amenizar os danos causados por espécies reativas de oxigênio, os indivíduos mantêm altas taxas de enzimas antioxidantes e algumas mudanças seletivas nas atividades dessas enzimas, visando amenizar os danos oxidativos oriundos do processo. As altas defesas antioxidantes dos órgãos da rã-da-floresta correlacionaram-se com a ausência de dano oxidativo aos lipídios ao longo de um curso de congelamento/descongelamento (Costanzo 2015).

Dentre as alterações metabólicas descritas na *Lithobates sylvaticus* para tolerar o congelamento, ocorre, ainda, uma indução de alteração nas expressões protéicas, principalmente naquelas necessárias para o processo. Essas alterações originárias da mudança de temperatura ou período crítico acontecem, normalmente, de forma preparatória. Isto é, alterações do metabolismo referente à síntese e/ou expressão das proteínas ocorrem antes da chegada do frio. Kling e colaboradores verificaram que os transportadores de glicose foram 8,5 vezes mais elevados em rãs-da-floresta coletadas no outono do que nas coletadas no verão (Kling et al. 1994).

Sabe-se que os anuros estão amplamente distribuídos em todos continentes do planeta, sendo encontrados em locais muito frios e também em locais quentes. O Sul da América do Sul apresenta regiões de clima frio e com larga presença desses vertebrados ectotérmicos. Em algumas regiões, nos meses de inverno, inclusive, há registros frequentes de temperaturas negativas, similar a de alguns locais onde a espécie *Lithobates sylvaticus* é encontrada. Há regiões, inclusive, onde são comuns relatos de precipitação de neve e geada durante o inverno.

Partindo dessa breve revisão da literatura sobre as capacidades adaptativas ao frio dos anuros e ao fato de que no Rio Grande do Sul há locais com características, principalmente em relação ao clima, semelhantes aos locais onde já foram descritos animais que toleram congelamento (*Lithobates sylvaticus*), houve o interesse em analisar uma espécie que habita uma região de clima subtropical/temperado do hemisfério sul.

A espécie escolhida para essa análise é a perereca do banhado - *Boana pulchella* (Duméril & Bibron 1841) que ocorre principalmente em locais com água permanente do Uruguai, sul do Paraguai, Argentina (de Buenos Aires a Misiones) e Brasil (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (Langone 1994). Habita, portanto, áreas com invernos rigorosos e

temperaturas baixas, podendo ser encontrada o ano todo, independente da sazonalidade (Canavero et al. 2008). Localiza-se em áreas abertas (Borges-Martins et al. 2007, Kwet et al. 2010), habitando ecossistemas campestres e também em campos da Mata Atlântica (Santos et al. 2014). Essa espécie apresenta uma atividade reprodutiva ativa durante a maior parte do ano, não ocorrendo desova nos meses mais frios nas áreas elevadas do Planalto das Araucárias (Kwet & Di-Bernardo 1999). Apesar de não ser evidenciado o real congelamento da *B. pulchella*, sabemos que ela habita regiões com amplitudes de temperaturas extremas e com variações significantes no fotoperíodo entre as estações do ano. Nas noites frias e nos meses frios, inclusive, os machos dessa espécie apresentam uma atividade de vocalização contínua, sendo, muitas vezes, a única espécie vocalizando em temperaturas baixas (Ximenez & Tozetti 2015). Apresenta, portanto, padrão contínuo e prolongado de reprodução ao longo do ano e atividade de vocalização mais comum durante os meses mais frios (Langone 1994; Ximenez & Tozetti 2015). Nessa espécie, devido ao seu comportamento ecológico, é importante estudar o efeito da exposição ao frio em um ambiente diferente dos já estudados, no caso o sul da América do Sul. Mesmo não congelando, a *B. pulchella* parece apresentar estratégias fisiológicas semelhantes as da *L. sylvaticus*. Inclusive, além de tolerar o frio como a *L. sylvaticus*, a *B. pulchella* apresenta atividade de vocalização e de reprodução justamente nessa época mais gelada.

Assim, sabendo que os estudos dos mecanismos de crioproteção em anuros é recente e que esses estudos são quase inexistentes para espécies que ocorrem no sul da América do Sul, estudar e conhecer os mecanismos de crioproteção e as espécies que os possui faz-se extremamente importante. Esses estudos ajudam a entendermos a biologia dessas espécies e podem dar, também, subsídios em um futuro próximo para as pesquisas que envolvam a criopreservação de tecidos de outros vertebrados, incluindo mamíferos e, conseqüentemente, os seres humanos. Estudos que tem como objetivo avaliar as estratégias fisiológicas, bioquímicas e metabólicas são de grande importância para entender a biologia dos anfíbios

como a *B. pulchella*. Esperamos neste trabalho, portanto, identificar através da avaliação de alguns parâmetros metabólicos como o glicogênio, a glicose, os triglicerídeos e as proteínas totais as alterações nos metabólitos básicos envolvidos no processo de crioproteção durante a variação de temperatura na qual a espécie Sul-Americana *Boana pulchella* é exposta em seu habitat natural no estado do Rio Grande do Sul.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Área de coleta*

Os indivíduos utilizados neste trabalho foram coletados na Área de Proteção Ambiental do Banhado Grande – (APABG) (30°0'29.28"S 50°54'10.71"O), local que abrange os municípios de Glorinha, Gravataí, Viamão e Santo Antônio da Patrulha no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Fig. 1). A APABG é uma região limítrofe entre os dois biomas brasileiros do Rio Grande do Sul, fazendo parte dos Biomas Pampa e Mata Atlântica (Guerra 2015). Ocupa 2/3 da bacia hidrográfica do rio Gravataí, tendo uma área de 137.000 hectares, onde cerca de 40% é no município de Viamão, 33% em Santo Antônio da Patrulha, 24% em Glorinha e 7% em Gravataí (Brenner 2016). Sendo uma APA, ela constitui-se em um tipo de unidade de conservação de uso sustentável, com incentivo a pesquisa no local, instituída pelo Decreto Estadual nº 38.971/1998 e segundo o Art. 15º do Sistema Nacional de Unidades de Conservação (Rio Grande do Sul 1998). O clima no APABG é classificado como Subtropical II (Rossato 2011), medianamente úmido com variação longitudinal das temperaturas médias. Caracterizando-se pela maior influência dos sistemas polares (45-48% dos dias do ano) e com interferência crescente dos sistemas tropicais marítimos, principalmente na sua porção leste (25-28%) (Brenner 2016). O inverno na APABG apresenta dias com frio intenso, principalmente pela influência dos sistemas polares que atingem a região. Na cidade de Santo Antônio da Patrulha, por exemplo, no dia 20 de julho de 2016 foi registrada a temperatura

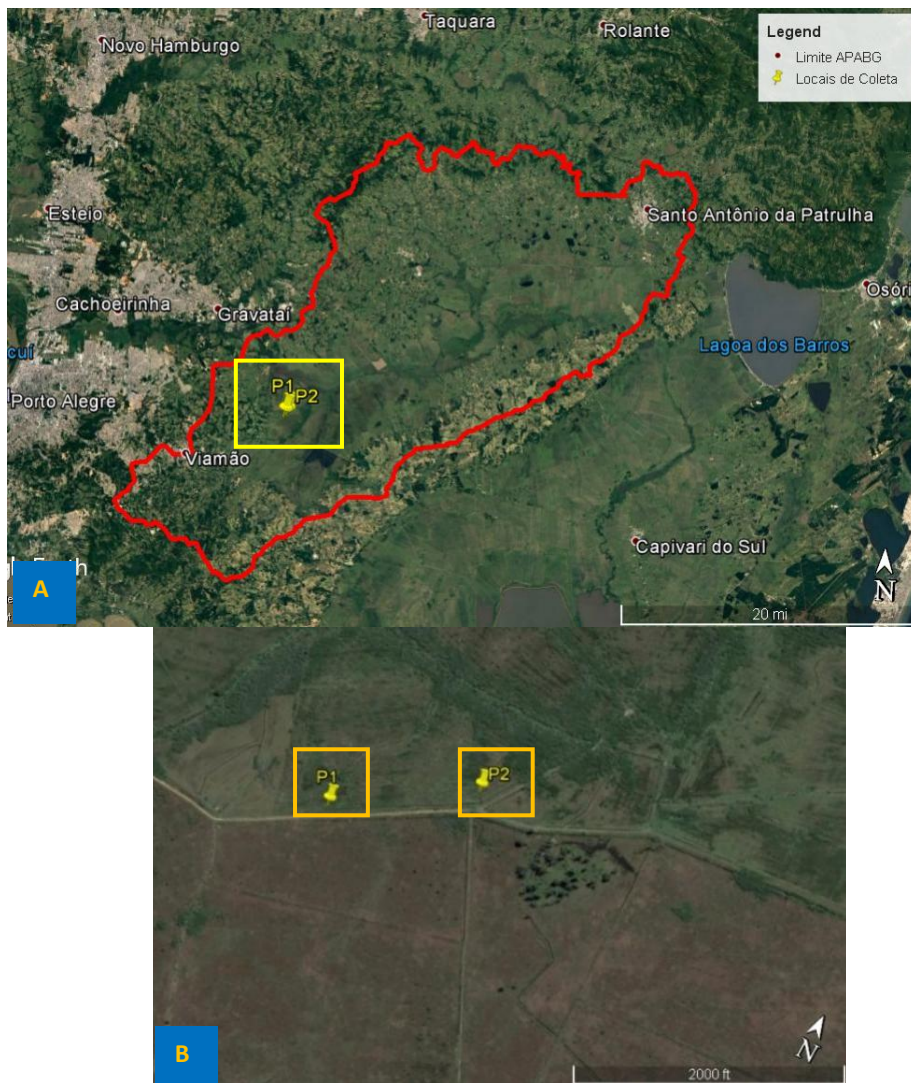
mínima de 1.23°C e na cidade de Glorinha, no mesmo dia, a temperatura mínima registrada foi 4.81°C (Fonte: CPC interpolação).

Durante as expedições para as coletas, foram visitados diversos pontos dentro da Área de Proteção Ambiental do Banhado Grande, porém, os indivíduos utilizados nesse trabalho foram coletados somente em dois pontos. Esses dois pontos foram escolhidos, pois ali existia uma grande quantidade de indivíduos dessa espécie. Esses pontos de coleta foram denominados P1 (30° 2'38.34''S 50°54'47.97''O) e P2 (30° 2'32.23''S e 50°54'37.29''O) (Fig. 2).



**Figura 1.** (A) Mapa do Brasil indicando em verde o estado do Rio Grande do Sul. (B) Mapa do estado do Rio Grande do Sul mostrando em branco a região da Área de Proteção Ambiental do Banhado Grande - APABG. (Imagens de satélite extraídas do Google Earth Pro).





**Figura 2.** (A) Imagem mostrando o limite da APABG e sinalizando os pontos de coleta P1 e P2 . (B) Mapa aproximado nos pontos de coleta dos indivíduos de *Boana pulchella* P1 e P2. (Imagens de satélite extraídas do Google Earth Pro).

### *Coleta dos indivíduos em campo*

A espécie utilizada nesse trabalho é a perereca do banhado - *Boana pulchella* (Duméril & Bibron 1841) (Fig. 3). Pertencente a família Hylidae, é uma perereca de tamanho médio cujos machos possuem comprimento rostro-cloacal de 3,2 cm a 4 cm. Segundo a IUCN (*International Union for Conservation of Nature 2017*), possui um status de conservação considerado pouco preocupante. Morfologicamente, apresenta uma característica peculiar em relação à coloração dorsal - alguns indivíduos podem ser totalmente verdes e outros podem variar desde o castanho claro com ou sem manchas até o cinza (Borges-Martins



et al. 2007). Foram realizadas duas expedições para as coletas dos indivíduos, sendo eles todos machos em atividade de vocalização. A primeira coleta foi realizada no mês de maio de 2017, onde foram capturados dois indivíduos. Esses indivíduos foram denominados 1 e 2. A segunda coleta foi realizada em junho de 2017, onde foram capturados mais cinco indivíduos. Esses indivíduos foram denominados 3, 4, 5, 6 e 7. Todas as buscas pelos animais foram noturnas, ocorrendo entre as 18:00 horas e 24:00 horas. A técnica utilizada para a busca dos indivíduos foi a de procura ativa e auditiva, deslocando-se a pé com lanternas. Depois de encontrado, o indivíduo foi identificado e colocado em sacos específicos para transporte de anuros (Fig. 4) umedecidos e com substratos do local (folhiços úmidos), com o objetivo de diminuir o estresse do animal. Na hora da coleta de cada indivíduo, foi medida a temperatura do ambiente, a velocidade do vento e a umidade relativa do ar com a estação meteorológica portátil da marca Kestrel®, modelo 3500 Delta T (Fig. 5). Os animais foram coletados com uma licença permanente para coleta de material zoológico (47368-1) do SISBIO. Após o término de cada expedição, os indivíduos foram transportados para o ICBS - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, na UFRGS localizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. No ICBS, foram realizados os procedimentos de coleta de material biológico.



**Figura 3.**Exemplar de *Boana puclhella* encontrado em uma das expedições, na vegetação adjacente ao corpo d'água. Indivíduo com o saco vocal saliente, em atividade de vocalização. (Foto: Dener Heiermann).



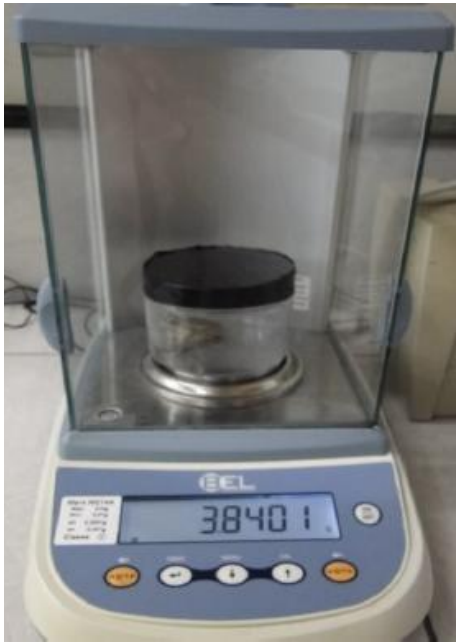
**Figura 4.** Saco de coleta de Anuros com um indivíduo coletado em seu interior. (Foto: Dener Heiermann).



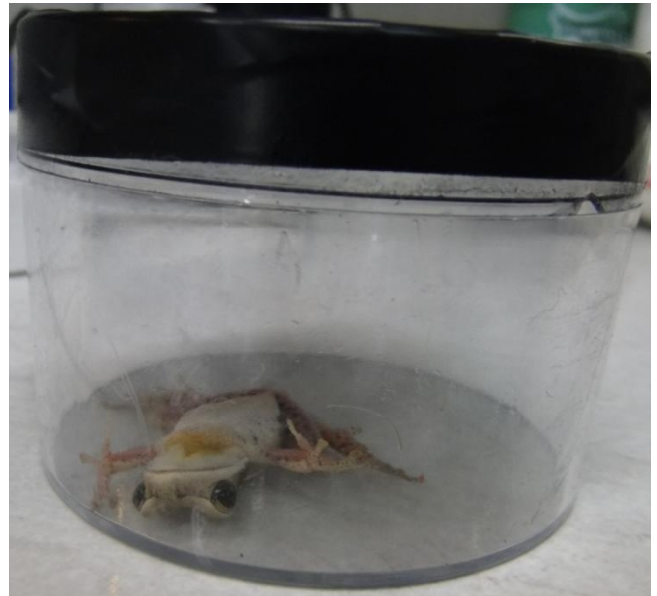
**Figura 5.** Condições climáticas sendo verificadas com a estação meteorológica portátil.(Foto: Dener Heiermann).

### *Coleta de material biológico*

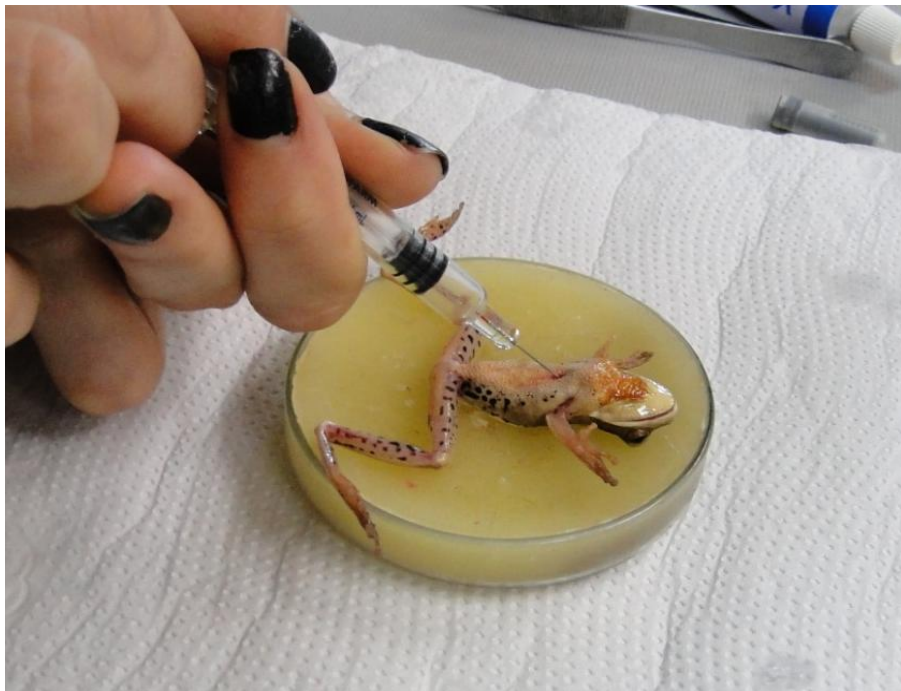
Antes dos procedimentos de coleta de material biológico, o animal foi pesado em uma balança analítica BEL®, modelo Mark M214A. (Fig. 6) e foi medido seu comprimento rostro-cloacal (CRC). Para realização da coleta do material biológico, os animais foram eutanasiados com lidocaína (gel, 5%), de forma tópica, aplicada diretamente na região dorsal da pele e no interior da mucosa oral - Método de eutanásia recomendado para a Classe Amphibia - anfíbios, publicado na diretriz de prática de eutanásia do CONCEA - Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal em 2015. Após a aplicação do anestésico, o indivíduo foi acomodado em um recipiente de plástico com tampa (Fig. 7) para diminuir o estresse enquanto aguardava-se a ação do fármaco. Confirmada a eutanásia, realizou-se a coleta de sangue por punção cardíaca (Fig. 8), seguido da coleta de fígado e músculo (Fig. 9). O material coletado foi armazenado em tubos de Eppendorf® de 1,5 ml para as análises posteriores.



**Figura 6.** Pesagem de um indivíduo de *Boana pulchella*. Balança analítica da marca BEL®, modelo Mark M214A. (Foto: Marjoriane de Amaral).



**Figura 7.**Indivíduo de *Boana pulchella* dentro do recipiente de plástico já em anestesia profunda. (Foto: Marjoriane de Amaral).



**Figura 8.** Técnica para coleta de sangue denominada punção cardíaca. Utilizou-se seringas heparinizadas de 1ml. (Foto: Maiza Cristina Von Dentz).



**Figura 9.** Celiotomia: Incisão abdominal longitudinal com exposição da cavidade visceral para coleta de tecido hepático. (Foto: Marjoriane de Amaral).

Essas coletas foram feitas logo após a volta do campo, para preservar as características fisiológicas do animal ainda em seu ambiente natural (análise *in vivo*).

#### *Análise do material biológico*

Determinação de substratos plasmáticos: O sangue foi coletado e depositado em tubos de ensaios de 1,5 ml. Logo após, realizou-se a separação do plasma e dos elementos figurados através de centrifugação (Centrífuga Eppendorf® modelo 5415C) a 5000 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos. O total de plasma retirado (entre 15 e 20  $\mu$ L) foi congelado para as análises posteriores.

Para a determinação da glicose, dos triglicerídeos e das proteínas plasmáticas, utilizou-se os respectivos testes colorimétricos enzimáticos: Glicose PAP Liquiform, Triglicerídeos Liquiform e Proteínas totais (LabTest Diagnóstica®). Na determinação da glicemia utilizou-se 10  $\mu$ L de amostra enquanto para os triglicerídeos e proteínas utilizou-se 5

uL. Todas as amostras foram incubadas a 37° C por 10 minutos. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Anthos Zenyth 200rt (Anthos Labtec Instrumentos), onde as amostras de glicose e triglicerídeos foram lidas no comprimento de onda de 505 nm e as amostras de proteínas em 545 nm. Os resultados da glicemia e triglicerídeos foram expressos em mmol L<sup>-1</sup> e os resultados das proteínas totais em g L<sup>-1</sup>.

Determinação da concentração de glicogênio: Os tecidos (fígado e músculo) foram utilizados para a dosagem de glicogênio. O tecido muscular utilizado para essa análise foi o tecido das patas posteriores da região coxal. O método utilizado para a extração de glicogênio nesses tecidos foi o de van Handel (1965). Seguindo esse método, os tecidos utilizados foram colocados em falcons com 1 mL de KOH 30% e aquecidos em banho-maria até a completa degradação do mesmo. Após a degradação, adicionou-se álcool 70% visando a precipitação do glicogênio. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o *pellet* do glicogênio (formado na etapa anterior de precipitação) ressuspendido em água. Assim que ressuspendido realizou-se a hidrólise ácida das amostras conforme técnica de Geary et al (1981). Ao final, a concentração de glicogênio foi determinada pela concentração de glicose liberada, utilizando a metodologia descrita acima. A concentração de glicose foi medida com o kit comercial LabTest® (Krisman et al. 1962), com espectro de absorção de 505 nm a 37°C. A concentração de glicogênio foi expressa em mg g<sup>-1</sup>.

#### *Análise de dados*

Com base nos resultados das análises, foram feitas comparações entre cada amostra coletada (glicogênio muscular e hepático; glicose, triglicerídeos e proteínas totais plasmáticas) dos 7 indivíduos e entre os dois grupos de indivíduos coletados em períodos diferentes – maio e junho. Foram calculadas as médias ( $\pm$ ) e os erros padrões da média (EPM) para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a



comparação entre os grupos<sup>1</sup>, foi realizado o “teste T” de *student* para amostras independentes no software BioEstat 5.3. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentar  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### *Dados Climáticos*

A primeira coleta, realizada no mês de maio, apresentou uma temperatura menor comparada com a temperatura medida na segunda coleta, realizada no mês de junho. Não houve uma diferença comparativa relevante em relação a umidade relativa do ar e a velocidade do vento. Qualitativamente, as avaliações da condição na noite das duas coletas diferiram entre si. Na coleta do mês de maio, o céu estava estrelado e havia cerração. Já na coleta do mês de junho, o céu estava totalmente encoberto e havia uma precipitação fraca, porém constante (Tab. 1).

**Tabela 1.** Dados obtidos em campo das condições climáticas referente às duas coletas realizadas, valores medidos com estação meteorológica portátil.

Mês Coleta	Temperatura (°C)	Umidade Relativa(%)	Vento(km/h)	Condição Climática
<b>Maio</b>	15,5	91	0	Céu encoberto, precipitação fraca e constante.
<b>Junho</b>	17,7	95	4	Céu estrelado com cerração.

---

<sup>1</sup> O esforço de coleta (n=7), principalmente no mês de maio (n=2), foi pouco devido à dificuldade de captura dos animais em seu habitat natural. Mesmo que estatisticamente não seja confiável, esse baixo número de amostras de maio foram consideradas nesse estudo.

### *Peso e Comprimento rostro-cloacal (CRC)*

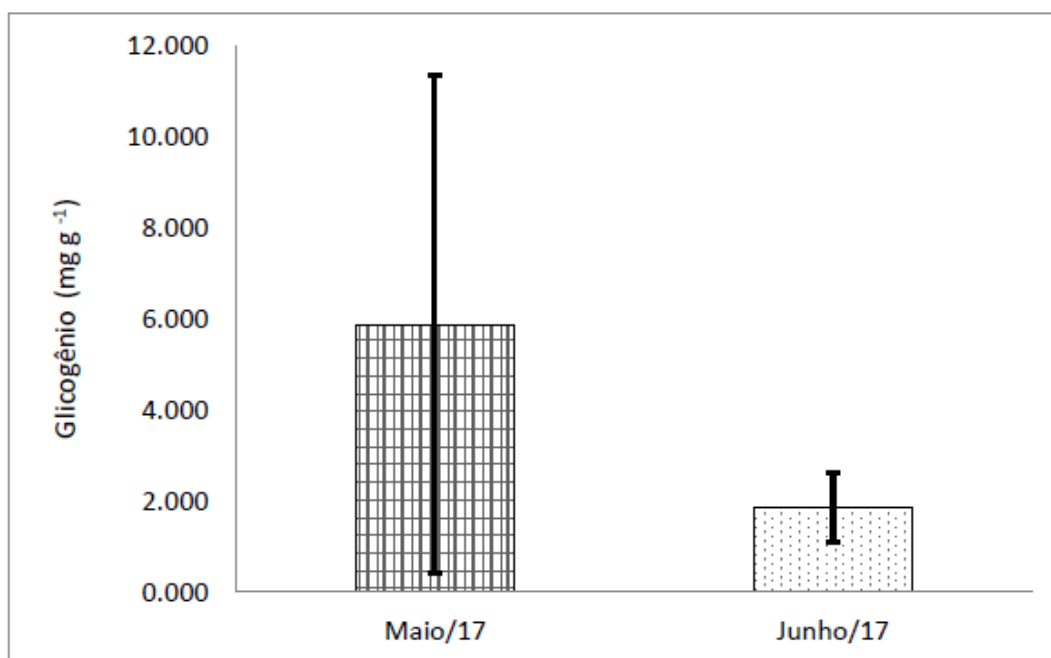
O menor peso entre os sete animais avaliados neste trabalho foi de 2,63 gramas e o maior 4,29 gramas, apresentando um peso médio de  $3,78 \pm 0,58$  gramas. Quanto ao comprimento CRC, o menor indivíduo apresentou 3,9 centímetros enquanto o maior 4,9 centímetros e CRC médio de  $4,3 \pm 0,3$  cm (Tab. 2).

**Tabela 2.** Peso e comprimento rostro-cloacal (CRC) dos indivíduos machos de *Boana pulchella* coletados durante as duas expedições. Indivíduos 1 e 2 na expedição de maio e indivíduos 3, 4, 5, 6 e 7 na expedição de junho.

<b>Indivíduo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>CRC (cm)</b>
1	3,84	4,3
2	4,29	4,1
3	4,00	4,9
4	4,28	4,5
5	3,43	4,2
6	2,63	3,9
7	3,98	4,2

### Concentrações de glicogênio hepático e muscular

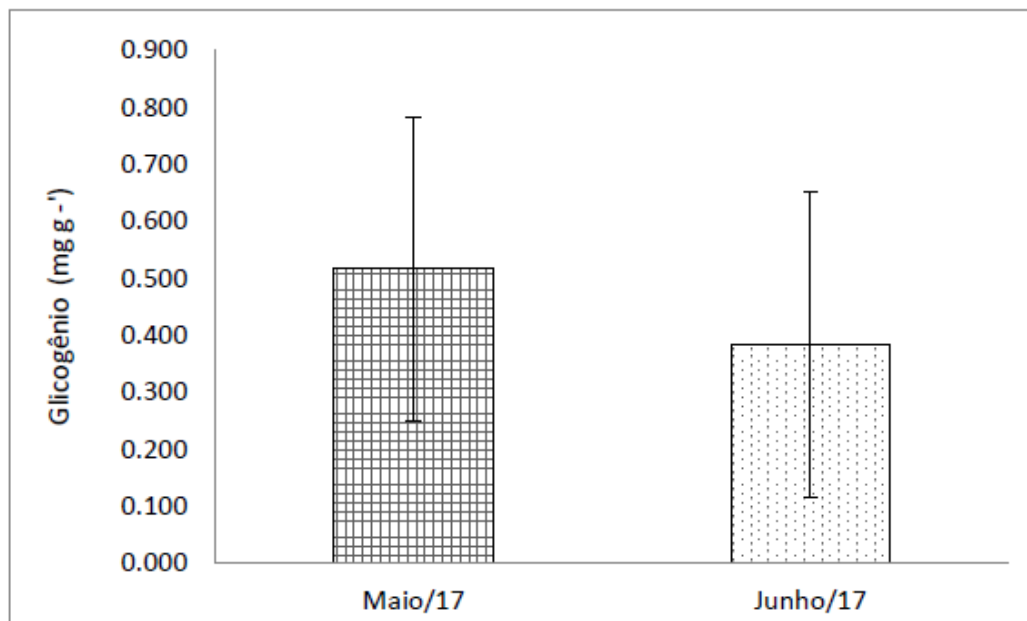
As concentrações de glicogênio hepático foram comparadas entre cada indivíduo e entre os dois grupos de coleta - indivíduos coletados em maio e indivíduos coletados em junho. Na comparação entre cada indivíduo, podemos verificar que o animal de número 2, coletado em maio, apresentou a maior concentração de glicogênio  $11,333 \text{ mg g}^{-1}$  e o animal de número 4 a menor concentração  $0,269 \text{ mg g}^{-1}$  (Tab. 3 ). Mesmo com essa variação tão grande entre esses dois indivíduos, a análise comparativa entre as médias dos indivíduos coletados em maio ( $5,871 \pm 7,725 \text{ mg g}^{-1}$ ) e os coletados em junho ( $1,837 \pm 1,724$ ) não mostraram diferenças significativas nas concentrações de glicogênio hepático ( $P > 0,05$ ) (Fig. 10).



**Figura 10.** Concentração de glicogênio hepático em cada período de coleta de *Boana pulchella* – maio e junho de 2017 na APABG. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

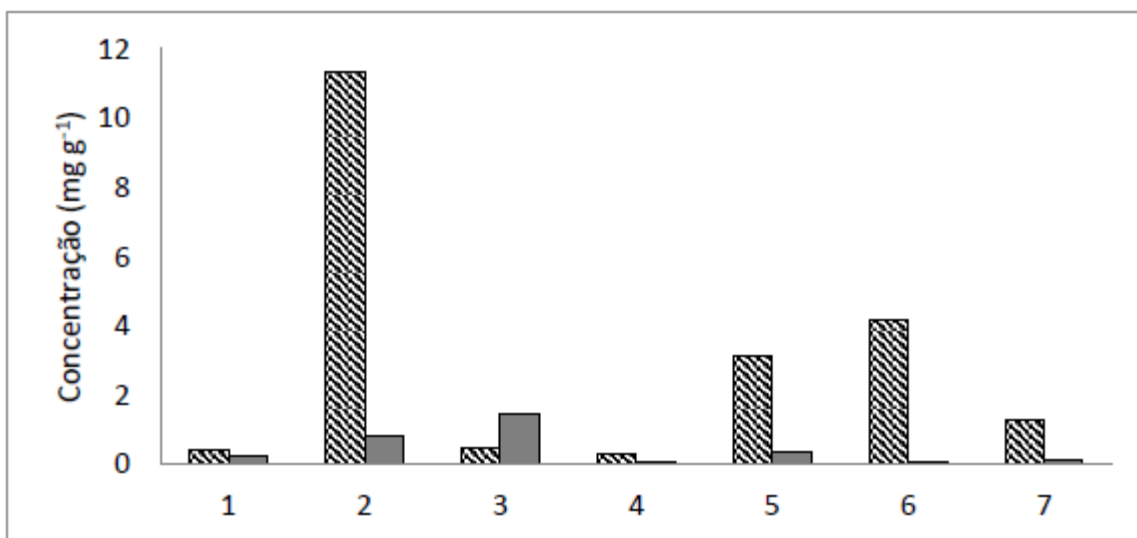


As concentrações de glicogênio muscular também foram comparadas entre cada indivíduo e entre os dois grupos de coleta - indivíduos coletados em maio e indivíduos coletados em junho. Na comparativa entre os indivíduos, o número 3 apresentou maior concentração de  $1,431 \text{ mg g}^{-1}$ , enquanto o com menor concentração foi o indivíduo 6 com  $0,012 \text{ mg g}^{-1}$ . Entre os indivíduos podemos ainda observar que a maioria do grupo de coleta em junho apresentou baixas taxas de glicogênio muscular (Tab. 3). Na comparação entre os dois grupos de coleta, a média das concentrações do mês de maio foi  $0,516 \pm 0,377 \text{ mg g}^{-1}$  e junho de  $0,382 \pm 0,598 \text{ mg g}^{-1}$  (Fig. 11). A diferença entre os dois grupos não foi significativa ( $P > 0,05$ ).

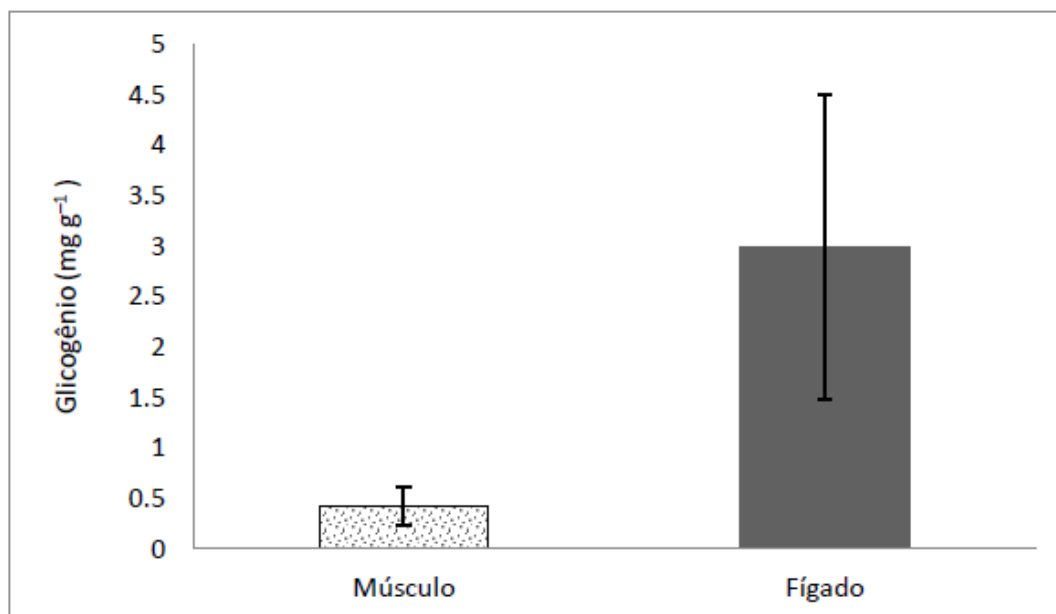


**Figura 11.** Concentração de glicogênio muscular em cada período de coleta de *Boana pulchella* – maio e junho de 2017 na APABG.. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

As média da concentração de glicogênio hepático de todas amostras foi comparada com a concentração média de todas amostras de glicogênio de muscular (Fig. 12). Assim, observou-se uma diferença na concentração de glicogênio entre esses dois tecidos. No músculo a concentração foi de  $0,421 \pm 0,516 \text{ mg g}^{-1}$  e no fígado de  $2,990 \pm 3,975 \text{ mg g}^{-1}$  (Fig. 13). Essa diferença entre as concentrações não mostrou-se significativa ( $P > 0,05$ ).



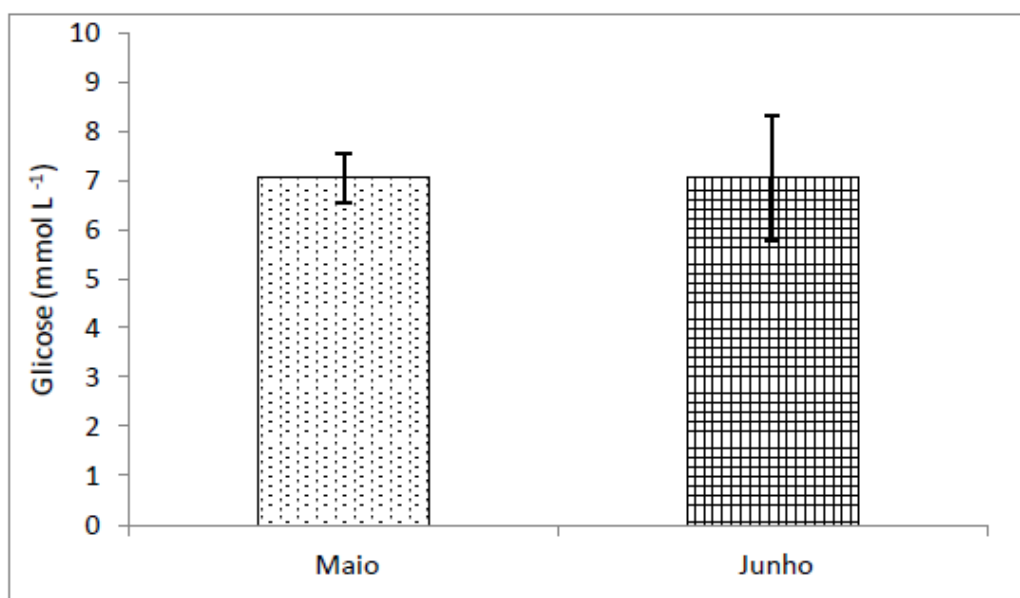
**Figura 12.** Concentração de glicogênio hepático (hachurado com listras) e muscular (hachurado liso) em cada amostra de *Boana pulchella*.



**Figura 13.** Concentração de glicogênio do tecido muscular e do tecido hepático de todos indivíduos amostrados de *Boana pulchella* coletados na APABG.. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

### Concentração de glicose plasmática

A glicose plasmática foi medida em todas as amostras de indivíduos. Foi realizada uma comparação entre todas concentrações, onde o indivíduo 6 apresentou a menor concentração de  $3,33 \text{ mmol L}^{-1}$  e o indivíduo 6 a maior  $10,996 \text{ mmol L}^{-1}$  (Tab. 3). Foi analisada a média das amostras do mês de maio e junho e comparadas. Maio apresentou concentração média glicêmica de  $7,042 \pm 0,694 \text{ mmol L}^{-1}$  e junho de  $7,055 \pm 2,842 \text{ mmol L}^{-1}$  (Fig. 14). A diferença entre as concentrações das duas coletas não foi significativa ( $P > 0,05$ ).

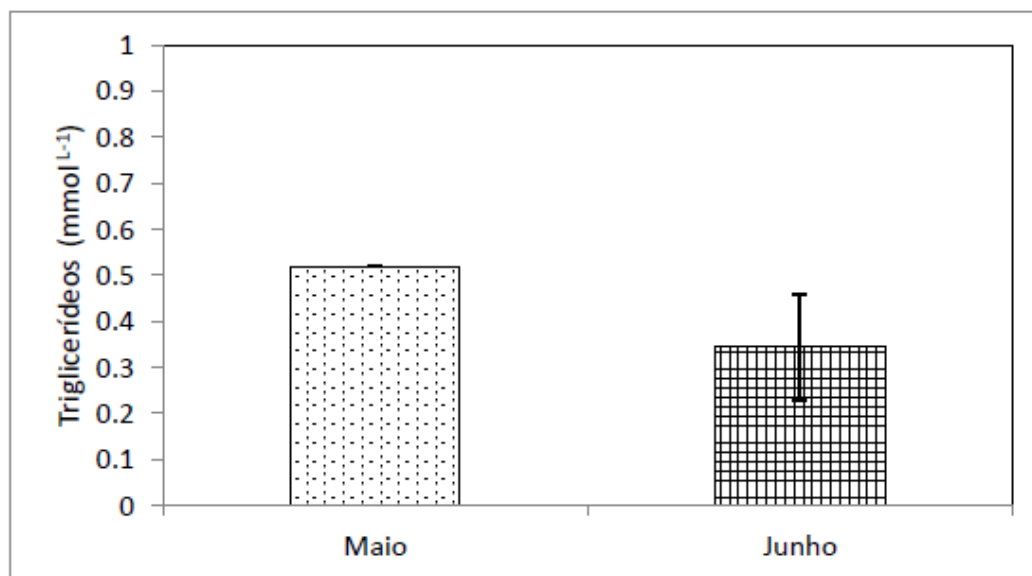


**Figura 14.** Concentração de glicose plasmática média em cada grupo de coleta de *Boana pulchella* – maio e junho de 2017 na APABG.. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

### Concentração de triglicerídeos plasmáticos

Devido a baixa quantidade de sangue circulante nos animais amostrados, algumas amostras não tiveram conteúdo plasmático suficiente para todas análises. As amostras 3, 5 e 7, portanto, não tiveram seu plasma dosado para concentração de triglicerídeos. Com as amostras 1, 2, 4 e 6, os resultados das concentrações foram amostrados individualmente para

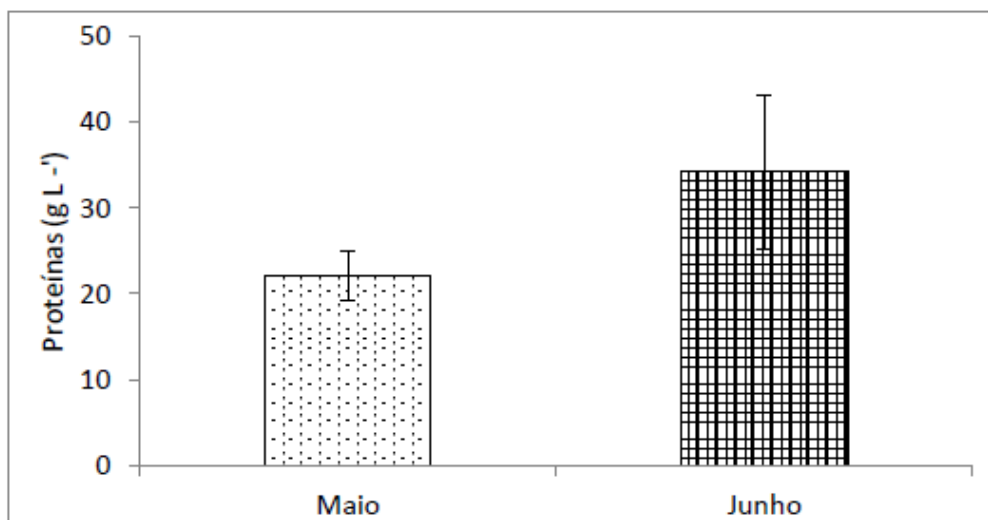
melhor comparação. As duas amostras que apresentaram maior concentração foi a 1 e 2, ambas da mesma coleta (maio). A amostra que apresentou, por sua vez, menor concentração foi a 4 com  $0,230 \text{ mmol g}^{-1}$  (Tab. 3). A concentração média de maio foi de  $0,519 \pm 0 \text{ mmol g}^{-1}$  e de junho de  $0,345 \pm 0,162 \text{ mmol g}^{-1}$  (Fig. 15). As diferenças entre as médias de concentrações entre os dois meses não apresentou resultado significativo ( $P > 0,05$ ).



**Figura 15.** Concentrações de triglicerídeos em cada período de coleta de *Boana pulchella* – maio e junho de 2017 na APABG.. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

#### *Concentração de proteínas plasmáticas totais*

Como já relatado, devido a baixa quantidade de sangue circulante nos animais amostrados, as amostras 4 e 5 não tiveram conteúdo plasmático suficiente para essa análise. Foi mensurado a concentração protéica, portanto, das amostras 1, 2, 3, 6 e 7. A amostra 3 apresentou a maior concentração ( $52,04 \text{ g L}^{-1}$ ), já a amostra 1 a menor ( $19,92 \text{ g L}^{-1}$ ) (Tab. 3). Foram mensuradas as médias das amostras de maio e junho, onde em maio a média foi de  $22,007 \pm 2,944 \text{ g L}^{-1}$  e junho de  $34,10 \pm 15,55 \text{ g L}^{-1}$  (Fig. 16). A diferença nas médias das concentrações glicêmicas não foram significativas ( $P > 0,05$ ).



**Figura 16.** Concentrações de proteínas totais em cada período de coleta de *Boana pulchella* – maio e junho de 2017 na APABG.. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Os resultados de todas as amostras para todos parâmetros amostrados foram reunidos em uma tabela para melhor visualização dos dados (Tab. 3).

**Tabela 3.** Resultados das análises individuais realizadas em *Boana pulchella* (1 a 7).

Indivíduo/ Coleta	Glicogênio hepático (mg g <sup>-1</sup> )	Glicogênio muscular (mg g <sup>-1</sup> )	Glicose (mmol L <sup>-1</sup> )	Proteínas totais (g L <sup>-1</sup> )	Triglicerídeos (mmol L <sup>-1</sup> )
1/Maio	0,408	0,249	6,551	1,992	45,977
2/Maio	11,333	0,783	7,533	2,408	45,977
3/Junho	0,413	1,431	6,952	5,204	NA
4/Junho	0,269	0,065	3,333	NA	20,361
5/Junho	3,12	0,326	8,205	NA	NA
6/Junho	4,158	0,012	10,996	2,438	NA
7/Junho	1,225	0,077	5,789	2,587	40,722

Os resultados são apresentados como valores brutos. NA= não foi avaliada, corresponde a amostras com volume muito pequeno.

## DISCUSSÃO

Sabemos que várias espécies de anfíbios sobrevivem ao inverno, tolerando as baixas temperaturas e mantendo suas atividades normalmente (Storey 1990). Alguns mecanismos de adaptação de vertebrados a essas condições são relativamente pouco entendidos em espécies do sul da América do Sul. Como a temperatura é um bom parâmetro relacionado com as estações do ano, utilizamos essa informação para iniciar as análises em *B. pulchella*.

Entretanto as condições climáticas para a temperatura nas duas coletas realizadas mostraram, como visto anteriormente, resultados não esperados para os meses amostrados. Na coleta de maio a temperatura foi menor do que na coleta de junho. O esperado seria o inverso, pois no mês de junho as temperaturas médias registradas nos anos anteriores eram menores do que as temperaturas médias do mês de maio, pois em junho inicia-se o inverno no Rio Grande do Sul (INMET, 2017). Somente após a segunda coleta, foi registrada uma entrada de uma massa polar no Estado diminuindo drasticamente as temperaturas por alguns dias. Mas, apesar destas alterações climáticas, encontramos alguns resultados interessantes em relação a *B. pulchella*, pois esses anfíbios, provavelmente, possuem um relógio interno que modifica seu metabolismo e os preparam para enfrentar um período de inverno, como discutido mais a frente.

As concentrações de glicogênio hepático avaliado nos dois meses, apresentaram diferenças. A média do mês de maio foi maior comparada com a de junho, considerando, obviamente, que o indivíduo 2 coletado em maio apresentou a maior concentração entre todos indivíduos amostrados. Contudo, os níveis das concentrações de glicogênio hepático, em geral, não apresentaram uma diferença significativa entre os dois meses ( $P > 0,05$ ), necessitando de mais indivíduos para confirmar, ou não, esse resultado. O que podemos afirmar é que essas concentrações dos indivíduos amostrados condizem com a função de armazenamento do glicogênio no fígado fazendo um estoque para períodos críticos de

disponibilidade de alimento e/ou frio. Sabe-se que os anfíbios ativos durante o período de inverno são submetidos a pressões seletivas em função das baixas temperaturas, que afeta a disponibilidade e qualidade dos alimentos (Wunder 1984). Os machos de *B. puclhella*, como já mencionado, apresentam atividades de vocalização prolongadas, inclusive durante o outono e o inverno. Para suprir a demanda energética que essa atividade exige, esses animais utilizam parte de suas reservas lipídicas e se alimentam de algumas presas que conseguem capturar (Antoniazzi 2012). Portanto, é muito importante manter uma reserva de glicogênio hepático para os períodos críticos e dedicar algum período de atividade – que não o reprodutivo, para recuperação e acúmulo dessas reservas de energia na alimentação (Duellman & Trueb 1986) já que o tamanho da reserva de glicogênio é um importante determinante da quantidade de glicose produzida (Costanzo & Lee 1993).

Essa importância da reserva glicogênica pode ser comparada quando avaliamos os resultados das concentrações de glicogênio hepático e das concentrações de glicose plasmática. A média da concentração de glicogênio no mês de junho foi menor comparada com a média da concentração do mês de maio, porém, a média das concentrações de glicose entre os dois meses foram muito similares (Maio:  $7,042 \pm 0,694 \text{ mmol L}^{-1}$ ; Junho de  $7,055 \pm 2,842 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Esses resultados indicam que no mês de maio os indivíduos mantiveram uma quantidade regular de glicose no sangue não precisando utilizar seu estoque de glicogênio hepático. Já no mês de junho, provavelmente, os indivíduos realizaram glicogenólise para disponibilizar mais glicose para o sangue, já que seu estoque de glicogênio estava menor e seus níveis de glicose plasmática mantiveram-se semelhantes com as amostras coletadas em maio ou até maiores, como o caso do indivíduo 6 que apresentou a maior concentração glicêmica ( $10,996 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

O glicogênio hepático em *B. puclhella*, portanto, se mostrou um importante substrato energético durante a época reprodutiva, já que a síntese da glicose do sangue provém do

catabolismo do glicogênio do fígado (Pinder et al. 1992; Storey & Storey 1992). O processo de aclimatização para um período mais crítico, como o inverno, acontece de forma preparatória, mesmo para as espécies que não congelam realmente. Em um estudo realizado com *Boana albopunctata*, pertencente a mesma família de *B. Pulchella* –Hylidae, verificou-se que os machos em atividade de vocalização apresentaram estômagos vazios, indicando a falta de alimentação nos períodos reprodutivos (Pacheco 2017). Como *B. pulchella* tem seu pico reprodutivo durante o período outono-inverno ela apresenta, conseqüentemente nesse período, sua maior demanda energética (Antoniazzi 2013). É importante ressaltar que os machos, além de estarem em atividade de vocalização, estão despendendo energia para suportar o frio durante esse período de inverno. Portanto, tendo seus estoques de glicogênio hepático com níveis altos, eles estarão disponíveis caso haja necessidade de suprir alguma demanda em algum estado mais crítico de sobrevivência onde os metabólitos já estarão preparados para executar suas funções e manter a garantia da sobrevivência da espécie.

Os anuros de regiões temperadas metabolizam os carboidratos armazenados durante o inverno e geralmente possuem reservas mais baixas de glicogênio na primavera do que no outono (Jungreis e Hooper 1970; Koskela & Pasanen 1975; Smith 1950). O acúmulo da quantidade de glicogênio hepático é maior no outono ou início do inverno e menor na primavera, pois aparentemente, grande parte dessa depleção ocorre durante a desova e não durante o inverno, como na maioria das espécies. Em *B. pulchella*, em especial, o glicogênio poupado garante que esses animais mantenham as amplas reservas de energia necessárias para o sucesso reprodutivo que ocorre com mais frequência nos meses frios. Na *L. sylvaticus*, por exemplo, a reprodução pode consumir grande parte das reservas de energia remanescentes após a hibernação e, como ela não se alimenta durante o acasalamento, o seu conteúdo de glicogênio hepático fica marcadamente reduzido (em 50-75% em alguns estudos) dentro de algumas semanas (Constanzo 2014). Contudo, segundo um estudo



realizado com a espécie *Lithobates sylvaticus* da região de Ohio, nos Estados Unidos, parece razoável que tanto a variabilidade sazonal (Layne e Lee 1989; Schmid 1982; Storey & Storey 1988) e geográfica (Costanzo et al. 1992b; Layne & Lee 1987) resultam principalmente em diferentes capacidades para produção de crioprotetores na tolerância ao congelamento de anuros.

Ainda quanto aos resultados da glicose, os valores para cada indivíduo seguiram um padrão parecido, tanto para os amostrados em maio quanto os em junho. Esses resultados indicam que há uma estabilidade na concentração glicêmica independente da temperatura ou do fotoperíodo de coleta. Em animais da espécie *Lithobates sylvaticus* submetidos experimentalmente a temperaturas inferiores a  $-2.5^{\circ}\text{C}$ , a concentração de glicogênio hepático diminuiu 39% e sua glicemia aumentou  $\sim 220 \mu\text{mol ml}^{-1}$  (Costanzo 2013). Em *B. puchella*, não observamos esse aumento expressivo nas concentrações glicêmicas, pois nesse trabalho os indivíduos não foram expostos a temperaturas tão baixas e nem ao congelamento apresentando, portando seus níveis de glicose plasmática estáveis. Esses níveis (concentrações entre  $3,33 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $10,99 \text{ mmol L}^{-1}$ ), porém, apresentaram-se altos quando comparados as concentrações de glicose plasmática de outros trabalhos já realizados com anuros, provavelmente, em função do período crítico no qual o animal estava exposto (baixa temperatura, época reprodutiva, escassez de alimentos). Em, *Rhinella schneideri*, por exemplo, as concentrações glicêmicas plasmáticas dos animais expostos a uma variação de temperatura entre  $20^{\circ}\text{C}$  e  $-2^{\circ}\text{C}$  foi entre  $1,11 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $3,33 \text{ mmol L}^{-1}$  (Steiner 1998).

As concentrações de glicogênio muscular, por sua vez, não apresentaram diferenças significativas entre as amostras e nem entre as médias dos meses de coleta, com  $P > 0,05$ . Este resultado era esperado, pois como relatado na descrição da espécie, a *B. puchella* mantém as suas atividades durante o ano todo e conseqüentemente, não há necessidade de aumentar ou diminuir as concentrações de glicogênio nesse tecido. Comparando as concentrações de

glicogênio hepático com as de glicogênio muscular entre as amostras e as médias entre os dois meses amostrados, podemos notar que há muito mais glicogênio no fígado do que no músculo, isto porque o fígado é um órgão muito importante nos anuros, abrangendo 8-10% do peso corporal. O conteúdo de glicogênio do fígado, portanto, é suficiente para manter todo aparato necessário para a demanda relacionada a crioproteção (Storey & Storey 1984).

Os triglicerídeos também são importantes substratos para energia e, conseguimos observar que nessas pererecas a concentração plasmática se manteve parecida entre as diferentes amostras, independente do mês. Os níveis de triglicerídeos foram baixos, porém, é importante ter uma concentração mínima e contínua para que se mantenha um aporte mínimo de gordura. Costanzo et. al verificaram em seu estudo com *Lithobates sylvaticus* que a gliconeogênese no período pré-hipernal aparentemente é impulsionada pela quebra de lipídios em precursores como o glicerol do triglicerídeo. Porém, no período de hibernação em si, o triglicerídeo parece ser um substrato de energia relativamente sem importância em de *L. sylvaticus*, pois verificou-se um esgotamento das reservas lipídicas anterior a hibernação e alterações enzimáticas que reduzem o catabolismo de gordura no período do inverno, contrastando com o metabolismo dos anuros de deserto que se baseiam fortemente em estoques lipídicos para sustentar seu metabolismo durante a dormência (Costanzo et. al 2015). Sabe-se ainda que o metabolismo lipídico é dominante em rãs no período do verão e o metabolismo de carboidratos em rãs no inverno (Smith 1952; Jungreis 1970; Jungreis & Hooper, 1970). Por enquanto, não podemos fazer as mesmas afirmações para *B. pulchella*, porém, com a continuação deste trabalho, analisaremos mais períodos para fazermos essa avaliação.

As proteínas são extremamente importantes como produtos para ativação da via da gliconeogênica para produzir glicose durante o período de jejum. Assim é interessante manter uma linearidade nas concentrações desses precursores não glicídicos. Nas amostras se

observou um padrão. Há uma maior quantidade na concentração do mês de junho comparada ao mês de maio, podendo ser resultado da baixa quantidade de glicogênio hepático e, conseqüentemente, da necessidade de sintetizar a glicose também por outra via além da glicogenólise, no caso, também por gliconeogênese. Os mecanismos conhecidos de tolerância ao congelamento natural, todavia, inclui mudanças nas quantidades de proteínas selecionadas, como a síntese de novos tipos de proteínas e o aprimoramento de várias proteínas constitutivas (Cai & Storey 1997b). A capacidade de mudar os níveis de expressão de certas enzimas e outras proteínas é, assim, uma resposta essencial que confere adaptação local e tolerância ao estresse (Hochachka 2012).

Sabemos que a temperatura é um fator extremamente importante para as alterações no metabolismo referente ao frio, porém neste trabalho, podemos considerar também o fotoperíodo, pois ele tem uma variação significativa entre as estações do ano no Rio Grande do Sul. Nos meses de outono e inverno, o fotoperíodo é menor fazendo com que as noites tenham mais horas, para os anuros que possuem hábitos noturnos essa modificação parece ser significativa em seu metabolismo e um indicador associativo de menor fotoperíodo com menores temperaturas. Os efeitos que a temperatura e a estação do ano (o que pode ou não ser dependente dos efeitos da temperatura) exercem sobre as atividades de anfíbios parecem estar relacionados a alterações no organismo e a possível superposição dessas alterações com ritmos biológicos inerentes no organismo (Figueiredo 2001). A luz, porém, não tem seu papel bem definido para os anuros (Salthe & Mecham 1974). Contudo, sabe-se que anfíbios mantidos em laboratórios ajustam seus estados fisiológicos às condições de luz oferecidas (Easley et al. 1979).

Por fim podemos concluir, que a espécie Sul-Americana *Boana pulchella* apresenta algumas alterações em seus principais metabólitos provavelmente para melhor suportar as temperaturas frias onde ela habita e as condições mais restritas que as baixas temperaturas

fornecem, principalmente referente a alimentação. As altas concentrações de glicogênio hepático, a estabilidade nas concentrações de glicose plasmática e as significativas concentrações de proteínas plasmáticas mostram que, provavelmente, a gliconeogênese (produção de glicose a partir de aminoácidos) e a glicogenólise (quebra do glicogênio em glicose) são vias extremamente importantes e diretamente relacionadas com as necessidades adaptativas relacionadas às condições adversas às quais os animais estão expostos. Os resultados apresentados nesse estudo são resultados preliminares de um estudo que continuará ao longo do ano com um maior aprofundamento. Para as próximas etapas, o objetivo será aumentar o tamanho amostral e caracterizar as alterações metabólicas durante as variações sazonais com avaliações de outros parâmetros metabólicos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família e principalmente ao meu irmão Daniel pelo incansável apoio e motivação nessa jornada. José, muito obrigada por todo amor, companheirismo e incentivo. Ao meu orientador Luiz, obrigada por ter abraçado e acreditado nesse projeto e por sempre disponibilizar seu tempo e seu incrível conhecimento. Ao meu co-orientador, Patrick, obrigada pelos campos e pelos teus valiosos ensinamentos. A todo LAMEC, obrigada pelo acolhimento e ao Jorge, obrigada pela dedicação e atenção desprendida durante as dosagens das amostras. Para todos meus ajudantes de campo que me auxiliaram muito nessas ‘empreitadas’, em especial ao Deivid e ao Dener, muito obrigada.

## **REFERÊNCIAS**

ANTONIAZZI, C., E., LÓPEZ, A., L., DURÉ, M., FALICO, D., A. 2013. Alimentación de dos especies de anfibios (Anura: Hylidae) en la estación de bajas temperaturas y su relación con la acumulación de energía en Santa Fe, Argentina. *Revista de Biología Tropical; Revista de Biología Tropical*; 61; 6-2013; 875-886.

BORGES-MARTINS, M., COLOMBO, P., ZANK C., BECKER F. G. & MELO M. T. Q. 2007. Anfíbios p. 276-291. In: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (orgs.) *Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 385 p.

BOLLEN, G., KEPPENS, S. & STALMANS, W. 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 336:19–31

BOULENGER, G. A. 1887. Descriptions of new or little-known South American frogs of the genera *Paludicola* and *Hyla*. *Annals and Magazine of Natural History* 20:295–300.

BRADFORD, M. M. 1975. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. Volume 72, pág. 248-254.

BRENNER, V. C. 2016. Proposta metodológica para renaturalização de trecho retificado do rio Gravataí-RS. *Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Geociências, Programa de Pós-Graduação em Geografia, Porto Alegre, BR-RS, 2016*.

CAI, Q & STOREY, K.B. 1997b. Upregulation of a novel gene by freezing exposure in the freeze-tolerant wood frog (*Rana sylvatica*). *Gene*, 198, 305–312.

CANAVERO, A., ARIM, M., NAYA, D. E., CAMARGO, A., DA ROSA, I. & MANEYRO, R. 2008. Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. *NorthWest J Zool*. 4:29–41.

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

COSTANZO, J. P., REYNOLDS, A. M., DO AMARAL, M. Clara F., ROSENDALE, A. J. & LEE R. E. Jr. 2015. Cryoprotectants and Extreme Freeze Tolerance in a Subarctic Population of the Wood Frog. *Ed. Carlos A Navas. PLoS ONE 10.2 (2015): e0117234. PMC*.

COSTANZO J. P., LEE R. E. & WRIGHTt M' F. 1992b. Cooling rate influences cryoprotectant distribution and organ dehydration in freezing wood frogs. *J. exp Zool*. 261:373-3't

COSTANZO, J. P., LEE, R. E. & LORTZ P. G. 1993. Glucose concentration regulates freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *Journal of Experimental Biology*. 181: 245-255;

COSTANZO, J. P., AMARAL, M. C. ,ROSENDALE, A. J. & LEE, R. E. Jr. 2013. Hibernation physiology, freezing adaptation and extreme freeze tolerance in a northern population of the wood frog. *The Journal of Experimental Biology* 216, 3461-3473.

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

DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. 1986. Biology of the Amphibia. *Mcgraw-Hill Book Company, Nueva York, EEUU*.

EASLEY, K. A., CULLEY JR., D. D., HORSEMAN, N. D. et al. 1979. Environmental influences on hormonally induced spermiation of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.*,207(3):407-416.

FIGUEIREDO. M. R. C, LIMA, S. L., AGOSTINHO C. A. 2001. Efeito da Temperatura e do Fotoperíodo sobre o Desenvolvimento do Aparelho Reprodutor de Rã-Touro *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). *Rev. bras. zootec.*, 30(3):916-923, 2001 (Suplemento 1)

FORTI, L. R. 2009. Temporada reprodutiva, micro-habitat e turno de vocalização de anfíbios anuros em lagoa de Floresta Atlântica, no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecias* 11(1): 89-98.

GEARY, N., LANGHANS, W. & SCHARRER, E. 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.* 241 (10): R330-335.

GUERRA, T. Educação ambiental: contribuição para a gestão socioambiental na Bacia Hidrográfica do Rio Gravataí – Porto Alegre. Rio de Janeiro: *MC&G Editorial*, 2015. 248 p.

HILL, R. W. , WYSE, G. A. & ANDERSON, M. 2012. Fisiologia Animal - 2ª Edição. Artmed, 894 pags, 207-265 pags..

HOCHACHKA P.W, SOMERO G.N. 2002. Biochemical adaptation. Mechanism and Process in Physiological Evolution. *New York: Oxford University Press*.

INMET. 2017.Instituto Nacional de Meteorologia.Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>.Acesso em: 05 de junho de 2017.

IUCN - International Union for Conservation of Nature. 2017. *Hypsiboas puclhellus*. Disponível em: < <http://www.iucnredlist.org/details/55619/0>>. Acesso em: 06 de julho de 2017.

- JUNGREIS A. M. 1970. The effect of long-term starvation and acclimation temperature on glucose regulation and nitrogen anabolism in the frog, *Rana pipiens-II*. Summer animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 32, 433-444.
- JUNGREIS A. M. & HOOPER A. B. 1970. The effect of long-term starvation and acclimation temperature on glucose regulation and nitrogen anabolism in the frog, *Rana pipiens-I*. Winter animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 32,417-432.
- 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*. *J. Comp. Physiol. B*, 164, 316–320.
- KRISMAN, C. R. 1962. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analytical Biochemistry. Volume 4*, pág. 17-23.
- KWET, A. & DI-BERNARDO, M. 1999. Pró-Mata. Anfíbios – Amphibien - Amphibians. Porto Alegre, EDIPUCRS. 107 p.
- KWET, A., LINGNAU, R. & DI-BERNARDO, M. 2010. Pró-Mata: anfíbios da Serra Gaúcha, sul do Brasil - Amphibien der Serra Gaúcha, südbrasilien - Amphibians of the Serra Gaúcha, south Brazil. Brasilien-Zentrum, University of Tübingen. *Germany*. 148 p.
- LANGONE, J.A. 1994. Ranas y sapos del Uruguay (reconocimiento y aspectos biológicos). *Museo Damaso Antonio Larrañaga, Ser. Divul.* 5:1-123.
- LAYNE JR Jr & LEE R. E Jr. 1987. Freeze tolerance and the dynamics of ice formation in wood frogs (*Rana sylvatica*) from southern Ohio. *Can J Zool* 65 2062-2065.
- LAYNE JR Jr & LEE R. E Jr. 1989. Seasonal variation in freeze tolerance and ice content of the treefrog *Hyla versicolor*. *J exp Zool* 249:133-137.
- MARTOF, B. 1970. *Rana Sylvatica. Catalogue of American Amphibians and Reptiles.*
- MARTOF, B. S. & HUMPHRIES, R. 1959. Geographic Variation in the Wood Frog *Rana sylvatica*. *The American Midland Naturalist* .Vol. 61, pág. 350-389.
- PACHECO, E. O., FERREIRA, V. F., CARVALHO, R. M. H. 2017. Diet of *Boana albopunctata* (Anura:Hylidae) in an Atlantic Forest fragment of southeastern Brazil. *Phyllomedusa* 16(1):57–62.
- PINDER, A. W., STOREY, K. B. & ULTSCH, G. R.. 1992. Estivation and hibernation. In: M. E. Feder & W. W. Burggren (eds.), *Environmental Physiology of the Amphibians*. pp. 250-274.
- KOSKELA, P. & PASANEN, S. 1975. Effect of thermal acclimation on seasonal liver and muscle glycogen content in the common frog, *Rana temporaria* L. *Comp. Biochem. Physiol.* A, 50: 723-'72"1.

RIBEIRO, R.S., EGITO, G. T. B. T & HADDAD, F. B. 2005. Chave de identificação: Anfíbios anuros da vertente de Jundiáí da Serra do Japi, Estado de São Paulo. *Biota Neotropica* v5 (n2).

RIO GRANDE DO SUL. Decreto Estadual 38.971 de 23/12/1998. Cria a Área de Proteção Ambiental do Banhado Grande e da outras providencias. *Diário Oficial do RS*, 23 de dezembro de 1998. Disponível em:

<[http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Decretos/1998/dec\\_rs\\_38971\\_1998\\_uc\\_apa\\_banhadogrande\\_rs.pdf](http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Decretos/1998/dec_rs_38971_1998_uc_apa_banhadogrande_rs.pdf)> Acesso em: 31 de maio de 2017.

ROSSATO, M. S. 2011. *Os Climas no rio Grandedo Sul: Variabilidade, Tendências e Tipologia*. Tese(Doutorado em Geografia) - Instituto deGeociências, UFRGS, Porto Alegre.

SANTOS, T. G. DOS, IOP S. & ALVES S. DA S. 2014. Anfíbios dos Campos Sulinos: diversidade, lacunas de conhecimento, desafios para conservação e perspectivas. *Herpetologia Brasileira* 3(2), 51 – 59.

SALTHER, S.N., MECHAM, J.S. 1974. Reproductive and courtship patterns. In: LOFTS, B. (Ed.) *Physiology of the amphibia*, New York: Academic Press. p.310-521.

SMITH C. L. 1952. Environmental temperature and the glycogen content of the frog's liver (*Rana temporaria*), *Nature, Lond.* 170,74-75.

SCHMID W.D. 1982. Survival of frogs at low temperature. *Science* 215 697-98.

STEINER, A. A., PETENUSCI, S. O., BRENTGANI, L. G. & BRANCO, L. G. S. 1998. The importance of glucose for the freezing tolerance/intolerance of the anuran amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. Departamento de Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. *Rev. Brasil. Biol.*, 60(2): 321-328.

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

STOREY, J. M & STOREY, K. B. 1985 Adaptations of metabolism for freeze tolerance in the gray tree frog, *Hyla versicolor*. *Canadian journal of zoology*, 1985

STOREY, K. B. & STOREY, J. M. 1986. 'Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians', *Comp. Biochem. Physiol. A*, 83, 613–617.



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*. Vol. 253 no. 2, R292-R297.

STOREY, K.B, STOREY J.M. 1988. Freeze tolerance in animals. *Physiol Rev* 68: 27–84.

STOREY, K. B. & Storey, J. M. 1992. Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.*, 54: 619-637.

STOREY, K. B. & STOREY, J. M. 1996. Natural freezing survival in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 27:365-386

STOREY, K. B. & STOREY, J. M. 2004. Physiology, biochemistry and molecular biology of vertebrate freeze tolerance: the wood frog. *Life in the Frozen State* E. Benson, B. Fuller, and N. Lane, eds CRC Press, Boca Raton, pp. 243-274.

VAN HANDEL, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analyt. Biochem.*, 11:256-265.

WELLS, K.D. 1987. The courtship of frogs. In: (Eds. Taylor, T.H., Guttman, S.I.). *The Reproductive Biology of Amphibians*. New York: Plenum Press, 233-262.

XIMENEZ, S. S & TOZETTI, A. M. 2015. Seasonality in anuran activity and calling season in a Brazilian subtemperate wetland. *Zoological Studies* 54:47.

WUNDER B.A. 1984. Strategies for, and environmental cueing mechanisms of, seasonal changes in thermoregulatory parameters of small mammals. *Winter Ecology of Small Mammals*. Carnegie Museum of Natural History, Pittsburg, Pennsylvania, EEUU 165- 172.