Isabel Cristina Pereira

Estratégias fisiológicas e comportamentais em anuros no semiárido: implicações sobre o balanço energético e hídrico

Physiological and behavioral strategies in frogs in the semiarid: implications on the energy and water balance

São Paulo

2016

Isabel Cristina Pereira

Versão corrigida conforme a Resolução CoPGr 5890

Original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

Estratégias fisiológicas e comportamentais em anuros no semiárido: implicações sobre o balanço energético e hídrico

Physiological and behavioral strategies in frogs in the semiarid: implications on the energy and water balance

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador: Carlos Arturo Navas Iannini

São Paulo

2016

Pereira, Isabel Cristina
Estratégias fisiológicas e comportamentais em anuros no semiárido: implicações sobre o balanço energético e hídrico
100 f.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

Palavras-chave: 1. Estivação 2. Metabolismo energético 3. Anfíbios anuros I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).
Prof(a). Dr(a).	Prof. Dr. Carlos Arturo Navas Iannini Orientador

Aos meus pais e ao meu marido lindo

...com amor, admiração e gratidão!

AGRADECIMETOS

Eu agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para chegar até aqui. Por ter me guiado e sustentado durante esta trajetória.

Agradeço ao meu lindo orientador, Carlos Navas, pela dedicação, apoio e por todas as oportunidades que me ofereceu, por ter acreditado no meu trabalho e me orientado; agradeço especialmente a sua esposa, Dra. Ana Luiza Navas, por todo o carinho, conselhos e paciência, durante todos esses anos. Agradeço também ao Filipinho por me ensinar a contar e pelas piadas fantásticas que compartilhamos.

Agradeço aos Professores: Dr. José Eduardo de Carvalho, pela assistência prestada junto à Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP – Campus Diadema), pelas discussões e todos o conhecimento que me passou; Dr. Fernando Ribeiro Gomes, por me ajudar a solucionar todas as minhas dúvidas; Dra Cristiele Ribeiro por todo o apoio ao longo desde projeto, pelo auxílio prestado durante as coletas e no laboratório; Dr. Carlos Jared por me apoiar na execução deste trabalho e me apresentar o local e os companheiros da Fazenda São Miguel; aos meus companheiros de laboratório, por todo o conhecimento e desopilações, em especial ao Juanito Carvajalino e a Carlita Piantoni por todas as acessórias prestadas ao longo deste trabalho.

Eu agradeço especialmente ao Sr. Francisco de Assis Rodrigues, administrador da Fazenda e sua esposa, Sra. Neci, que me acolheram como parte da família, me tornando assim irmã da Jackeline, Fabricio, Natalia e Pryssila, que também sempre me apoiaram e auxiliaram; agradeço a Neta pela gentileza e por todo auxílio que me deu; agradeço especialmente ao meu companheiro de campo, Roque, que sempre trabalhou comigo no sol e na chuva, de dia e de noite.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processo nº 10/20230-2) e a acessória cientifica pelas sugestões e criticas que ajudaram na melhoria deste trabalho. Também agradeço ao Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela autorização (02010.003380/04-82 e 14836-1) de coleta de animais no local de trabalho.

Finalmente quero agradecer a minha família por todo o apoio que eu recebi. Agradeço muito a minha mãe Angelita pela ajuda, por ter costurado durante muitas madrugadas para me ajudar; ao meu pai, Zeca, por ter acreditado no meu trabalho, mesmo sem ter ideia do que eu faço, e ainda assim, ter passado tanto tempo sem dormir para me auxiliar. Eu agradeço muito ao meu marido fofinho, Paulo, por estar sempre ao meu lado, me amando, apoiando e até auxiliando durante as coletas, mesmo sem afinidade alguma com meus sapinhos lindos.

ÍNDICE

1. RESUMO 1
2. ABSTRACT 2
3. INTRODUÇÃO 3
3.1. Principais estratégias para a manutenção do balanço hídrico durante a estivação em anuros do semiárido 6
3.2. Características metabólicas da estivação de anuros 8
3.3. Preservação da funcionalidade de determinados sistemas 11
3.4. Comportamento reprodutivo e custo da reprodução em anuros de regiões áridas e semiáridas 12
3.5. A estivação em anuros da Caatinga no contexto das mudanças climáticas 13
4. OBJETIVOS 15
4.1. Aspectos relevantes e observações pessoais 15
5. MATERIAIS E MÉTODOS 19
5.1. Caracterização dos Locais de Coleta 19
5.2. Estratégia de amostragem sazonal 19
5.3. Obtenção de plasma e urina 24
5.4. Distribuição da profundidade ao longo do tempo 24
5.5. Desempenho locomotor 25
5.6. Medida de taxa metabólica 25
5.7. Atividade enzimática 27
5.8. Concentração de proteínas solúveis 30
5.9. Concentração de glicogênio 30
5.10. Concentração de lipídeos totais 31
6. ANÁLISE DOS DADOS 33
7. RESULTADOS 34
7.1. Caracterização dos Locais de Coleta 34
7.2. Distribuição da profundidade ao longo do tempo 37
7.3. Desempenho locomotor 38
7.4. Medida de taxa metabólica 40
7.5. Hematócrito 42
7.6. Concentração de ureia 42
7.7. Osmolaridade 45
7.8. Atividade Enzimática 47

7.9. Concentração de Proteínas Solúveis 59
7.10. Concentração de Glicogênio 61
7.11. Concentração de Lipídeos Solúveis 63
8. DISCUSSÃO 65
8.1. Relações hídricas comportamentais 65
8.1.1. Durante a estiagem 65
8.1.2. Durante a chuva 67
8.2. Relações hídricas fisiológicas 69
8.2.1. Hematócrito 69
8.2.2. Osmolaridade 70
8.2.3. Ureia 72
8.2.4. Papel da bexiga urinária 73
8.3. Desempenho locomotor 75
8.4. Consumo de oxigênio 77
8.5. Atividade enzimática 78
8.6. Contribuição de substratos energéticos 81
8.6.1. Glicogênio 81
8.6.2. Lipídeos totais 82
8.6.3. Proteínas solúveis 84
8.7. Contribuição de corpos cetônicos 86
8.8. Principais considerações sobre as diferentes estratégicas utilizadas 89
9. CONCLUSÕES 92
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 95

1. RESUMO

A estivação é caracterizada como um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais relacionadas com a redução do metabolismo e a permanência em micro-habitats específicos durante a fase de estiagem. Na caatinga brasileira foram observadas ao menos três espécies que estivam, sendo duas da família Leiuperidae, *Pleurodema diplolistris* e *Physalaemus albifrons* e uma da família Cycloramphidae, *Proceratophrys cristiceps*. Ainda que encontradas no mesmo micro-habitat durante a estivação, estas três espécies exibiram padrões distintos de alteração do desempenho locomotor entre as duas estações marcantes do ano (seca e chuvosa). Enquanto *P. diplolistris* reduziu em cerca de 47% a velocidade de seu desempenho locomotor durante a fase de estiagem, as outras duas espécies, *P. cristiceps* e *P. albifrons*, reduziram cerca de 87 e 83%, respectivamente. Contudo, a redução da taxa metabólica aeróbia foi de aproximadamente 50% para as três espécies. A comparação entre as estações marcantes do ano ainda revelou que as três espécies estudadas apresentam diferentes padrões de alteração na concentração de substrato energéticos e na atividade de enzimas representativas do metabolismo energético no fígado e musculatura dos membros posteriores. A manutenção hídrica também foi diferente entre as três espécies, sapos *P. diplolistris* exibiram mudança na profundidade em que foram encontrados ao longo da estiagem, migrando verticalmente em direção a umidade ao longa da estação seca, diferentemente sapos *P. cristiceps* e *P. albifrons* não exibiram mudanças na profundidade, mas sim, alterações na osmolaridade plasmática durante as fases da de estiagem, indicando a ocorrência de mecanismos diversas de regulação hídrica.

2. ABSTRACT

Estivation is defined as a set of physiological and behavioral changes associated to decreased metabolism and permanence in specific microhabitats during the dry season. We observed at least three estivating species in the Brazilian Caatinga: *Pleurodema diplolistris* and *Physalaemus albifrons* (Leiuperidae), and *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae). Although found in the same micro-habitat during aestivation, these three species differ in the variation patterns of locomotor performance when compared between the two seasons (dry and rainy season). During the dry phase, speed in *P. diplolistris* was reduced by about 47% whereas in *P. cristiceps* e *P. albifrons* values decreased by 87% and 83%, respectively. The reduction of aerobic metabolic rate was of approximately 50% for the three species. The comparison between seasons also revealed that the three species differ in relation to the variation patterns of the concentration of substrate energy and activity of representative enzymes of energy metabolism in the liver and muscles of the hindlimb. *P. diplolistris* exhibited changes in depth along the dry season, migrating vertically in the direction of moisture to the long dry season. Differently, frogs of the species *P. cristiceps* and *P. albifrons* exhibited no changes in depth, but rather changes in the plasma osmolarity during the phases of the dry season which indicates the occurrence of strategies for water regulation.

3. INTRODUÇÃO

As Caatingas formam um domínio morfoclimático peculiar que ocupa cerca de 10% do território nacional. É um bioma relativamente recente, formado entre o final do Terciário e início do Quaternário (AB'SABER, 1974), marcado por estações chuvosas com níveis de precipitação imprevisíveis e variáveis, que se concentram nos meses de janeiro a março (FERNANDES, 1999). Este ambiente é caracterizado por vários meses de estiagem, baixo índice pluviométrico, temperatura elevada e ventos fortes (AB'SABER, 1974). Apesar destas características junto com a baixa disponibilidade de recursos alimentares dada pela baixa produtividade primária e pela maior dependência de fontes de água durante a reprodução (FERNANDES, 1999; GOMEZ-MESTRE; PYRON; WIENS, 2012; ROMARIZ, 1996; SOUZA REIS, 1976), são encontradas na Caatinga pelo menos 48 espécies de anfíbios (RODRIGUES, 2003). Essas espécies exibem uma grande diversidade de estratégias fisiológicas e ecológicas durante a estiagem (NAVAS *et al*., 2004), como a redução sazonal da atividade em micro-habitats específicos que permite a preservação do balanço hídrico, figurando um dos meios que parece aumentar as chances de sobrevivência ao longo da fase de seca (CARVALHO *et al*., 2010).

A diminuição da exposição aos extremos ambientais durante a seca caracteriza a maior parte dos anuros que ocupam ambientes semiáridos (BENTLEY, 1966; BOOTH, 2006). Neste contexto estivação pode ser entendida como um conjunto de mecanismos fisiológicas e comportamentais utilizadas pelos animais para sobreviverem em condições áridas (CARVALHO *et al*., 2010). A estivação envolve uma redução coordenada das atividades motora e metabólica que acontecem em paralelo às mudanças no ambiente quando este passa a ter recursos alimentares e hídricos reduzidos, usualmente acompanhado por um

aumento da temperatura (HOCHACHKA & SOMERO, 2002; PINTER *et al*., 1992; WITHERS & THOMPSON, 2000).

Observações da história natural de anuros e algumas abordagens experimentais sugerem que a manutenção do balanço hídrico, termal e energético são essenciais para a sobrevivência dos indivíduos em ambientes semiáridos. Entre as características observadas em espécies de anfíbios de regiões áridas, e em comparação com as características de espécies típicas de ambientes úmidos, há a diferenciação nas estratégias para a manutenção do balanço hídrico, influenciado pela captação e manutenção da água. Esta manutenção pode ser sustentada por mecanismos comportamentais como enterrar-se, selecionar o micro-habitat, manter a postura de conservação de água e limitar o tempo de exposição a condições desidratantes (SHOEMAKER *et al.*, 1992). Os principais ajustes individuais envolvem mudanças morfológicas na região pélvica como o aumento da espessura do epitélio e/ou com maior vascularização, aumentando a captação de água em comparação a pele lisa (TOLEDO & JARED, 1993); mudança no tipo de lipídeos cutâneos, como a inserção de colesterol (HAZEL, 1989); mudanças na permeabilidade celular devido a ação de hormônios como aldosterona e angiotensiona II (KONNO et al., 2005). A interação hormonal entre os três principais órgãos osmorregulatórios – pele, rins e bexiga urinária – regulam a concentração de água e íons através de ajustes sobre a taxa de absorção e/ou perda de água e de íons através da pele e através da taxa de excreção e/ou reabsorção pelos rins e bexiga urinária (UCHIYAMA & KONNO, 2006).

O balanço hídrico é mantido de diferentes maneiras em anfíbios de ambientes desérticos durante a estiagem, fase na qual os recursos hídricos são escassos. A velocidade na captação de água e a habilidade para extrair água do

solo, duas características com diferente fundamentação fisiológica, podem diferir na sua relevância ecológica em diferentes espécies de anuros no semiárido. Por exemplo, a absorção de água é particularmente rápida pelas rãs *Neobatrachus* (BENTLEY *et al*., 1958) e pelo sapo *Bufo punctatatus* (MCCLANAHAN & BALDWIN, 1969). Contudo, o sapo *Scaphiopus couchi*, que vive em uma região desértica da América do Norte não absorve água tão rapidamente quanto *Rana pipens*, um sapo aquático (MCCLANAHAN, 1967). Aparentemente, é mais ecologicamente relevante para *Scaphiopus couchi* absorver água do solo no qual se enterra do que absorver água rapidamente em corpos de água que estão presentes apenas na estação chuvosa quando esse recurso não é limitado (CARTLEDGE *et al*., 2006a; RUIBAL *et al*., 1969). Para manter o balanço hídrico durante a estiagem os sapos do gênero *Scaphiopus* permanecem enterrados durante toda a fase de seca em solos arenosos nos quais a água pode ser mais facilmente absorvida pelos animais em comparação aos solos argilosos (RUIBAL *et al*., ROIG, 1969). Mais ainda, esses sapos são capazes de absorver água pela maior parte da superfície corpórea quando enterrados a 30 cm de profundidade (CANO, 1969).

Estratégias fundamentadas na fisiologia sensorial, por exemplo na localização de água, podem também ser importantes. O sapo *Corythomantis greeningi* se refugia em cavidades úmidas formadas entre pedras durante a fase de estiagem, diminuindo assim a perda de água para o ambiente. Esta habilidade para localizar tais refúgios tem sido confirmada experimentalmente e parece essencial para a sobrevivência nas Caatingas (JARED *et al.*, 2005; TOLEDO & JARED, 1993). Em contraste, o sapo *Rhinella jimi* parece manter suas atividades mesmo durante a fase de estiagem associado a pontos em que o solo retém alguma umidade, e parecem particularmente capazes de extrair água desse solo (NAVAS

et al., 2004). Por outro lado, indivíduos de *Pleurodema diplolistris*, permanecem enterrados durante a fase seca nos bancos de areia dos rios intermitentes, com suas atividades motoras e metabólicas reduzidas (PEREIRA, 2009).

3.1. Principais mecanismos para a manutenção do balanço hídrico durante a estivação em anuros do semiárido

Anuros geralmente absorvem água facilmente através da região pélvica quando em contato com o substrato úmido (SHOEMAKER *et al*., 1992; THORSON & SVIHLA, 1943). Contudo, ainda que a região pélvica seja hipervascularizada, garantindo certa capacidade para a captação de água (JONES, 1980; REYNOLDS & CHRISTIAN, 2009; ROTH, 1973; WITHERS & GUPPY, 1996) solos com pouca disponibilidade hídrica não são utilizados como recursos hídricos (REYNOLDS & CHRISTIAN, 2009). Assim os anfíbios presentes em solos com baixa disponibilidade de água estariam sujeitos a desidratação, uma vez que o acesso aos recursos hídricos estaria dificultado. Alguns anfíbios reduzem a desidratação por meio da secreção de lipídios, diminuindo a permeabilidade cutânea, reduzindo também as trocas gasosas (LILLYWHITE, 2006).

Na estivação o balanço hídrico parece ser mantido através de três grandes grupos de estratégias: (1) formação de casulo; (2) aumento da osmolaridade interna e (3) seleção de micro-habitat mais propício a evitar a perda de água. O casulo é formado durante os períodos de estiagem, quando os animais são expostos ao estresse hídrico (MCCLANAHAN *et al*., 1976; WITHERS, 1995). Esta estrutura protetora formada ao longo da estivação é composta por várias camadas de células epidérmicas depositadas sobre a pele, aderidas umas as outras por muco (RUIBAL & HILLMAN, 1981; WITHERS & THOMPSON, 2000), reduzindo a evaporação

cutânea em até quinze vezes (ABE, 1995; GUPPY *et al*., 1994; GUPPY & WITHERS, 1999; HOCHACHKA & SOMERO, 2002).

O aumento da osmolaridade interna, medida da soma dos solutos dissolvidos na solução, por consequência, útil como um índice de estado de hidratação dos animais, quando comparado com valores conhecidos de animais totalmente hidratados, uma vez que os fluidos corporais tornar-se mais concentrados a medida que a água é perdida (SHOEMAKER, 1964). Outro fator importante que leva ao aumento da osmolaridade é a concentração de ureia (MCCLANAHAN, 1972), como evidenciado por estudos com sapos dos gêneros *Cyclorana*, *Neobatrachus* (WITHERS & GUPPY, 1996) e *Scaphiopus*, tendo este último também aumento nos níveis de sódio plasmático (SHOEMAKER *et al*., 1992). Para aumentar a concentração plasmática de ureia, que parece ser estimulada pela indisponibilidade de água no solo (JØRGENSEN, 1997a) ou por estresse osmótico como exposição salina (COSTANZO *et al.*, 2008), os anfíbios podem utilizar dois mecanismos conhecidos: (1) o acúmulo do excedente de ureia que seria excretada; e (2) o aumento da atividade do ciclo de ureia elevando sua produção (SCHILLER *et al*., 2008).

Finalmente, a escolha do micro-habitat também é fundamental para reduzir o estresse hídrico na estivação, uma vez que espécies encontradas enterradas em ambientes áridos, como sapos do gênero *Neobatracus*, têm maior taxa de captação de água (WARBURG, 1965). Sapos *Scaphiopus couchi* (SEYMOUR, 1973a), *Notaden nicollsi* (SLATER & MAIN, 1963) e *Uperoleia micromeles* (PALTRIDGE & SOUTHGATE, 2001), por exemplo, não formam casulo e são encontrados enterrados em ambientes arenosos durante a estivação. O sapo *S. couchi* permanece sob o solo com alta granulosidade, geralmente próximo a arbustos, em

locais que possuem maior umidade (BRAGG, 1965). Além disso, alguns anuros estivadores podem estocar o equivalente a 50% do seu peso corpóreo em água na bexiga, mantendo assim uma reserva importante durante o acirramento da estação seca (MAIN & BENTLEY, 1964; SPENCER, 1896).

3.2. Características metabólicas da estivação de anuros

A estivação é um fenômeno complexo e diverso entre os anuros, com grande variação na magnitude e tipo de ajustes fisiológicos, inclusive nos referentes à depressão dos processos metabólicos durante os meses de dormência (PINTER *et al*., 1992). A diversidade na intensidade da depressão do metabolismo aeróbio em anuros durante a estivação é evidenciada em várias espécies, entre elas uma espécie da Caatinga brasileira, *Pleurodema diplolistris.* Nesta espécie a estivação envolve uma redução de 50% na taxa metabólica de repouso durante a fase seca do ano quando comparado a animais encontrados durante a estação chuvosa (PEREIRA, 2009). *Pleurodema diplolistris* estiva no leito de rios intermitentes, em locais muito próximos aos de outras espécies de anuros da Caatinga pertencentes aos gêneros *Physalaemus* e *Proceratophrys.* Contudo, essas outras espécies parecem exibir diferentes estados metabólicos, pois apresentam respostas diferentes a estímulos exógenos e, no geral, aparentam maior tempo de responsividade (CARVALHO *et al*., 2009). Assim, mesmo espécies da Caatinga que ocupam o mesmo micro-habitat durante a estação seca parecem diferir nas características da estivação.

A fase hipometabólica que acompanha a estivação é caracterizada pela diminuição dos movimentos, da alimentação e dos batimentos cardíacos (BASTOS & ABE, 1998; STOREY & STOREY, 1990b), assim como de modificações nos

processos bioquímicos em diversos tecidos, destacando-se a priorização da oxidação de lipídeos, que passa a ser o principal combustível energético (SEYMOUR, 1973b; STOREY & STOREY, 1990a) e a redução do consumo de glicogênio (HOCHACHKA & SOMERO, 2002). Adicionalmente, ajustes específicos sobre as vias de metabolização de substratos energéticos modulam a mobilização dos compostos energéticos em adequação a demanda dos tecidos (GUPPY *et al*., 1994). A estivação envolve uma teia regulatória que permite aos organismos responder a disponibilidade hídrica, nutricional e energética. Esta regulação permite a sobrevivência quando estes elementos estão limitados (STOREY & STOREY, 2012).

No referente ao escopo da depressão metabólica há registros de quase 85% de depressão do metabolismo aeróbio para algumas espécies dos gêneros *Scaphiopus* na América do Norte e *Cyclorana*, na Austrália (GUPPY *et al*., 1994; HAND & HARDEWIG, 1996; HOCHACHKA & SOMERO, 2002; STOREY, 2002). O escopo metabólico, inicialmente definido como diferença entre o metabolismo de repouso e de atividade (FRY, 1947), pode ser utilizado para prever a capacidade competitiva dos animais (SETH *et al.*, 2013), uma vez que valores inferem a capacidade fisiológica para realizar atividades aerobiamente desafiadoras (SUAREZ, 1996). Em contraste ao alto grau de redução do metabolismo, há espécies que apresentam uma menor depressão, como o sapo *Pixicephalus adpersus*, da África, que reduz o metabolismo em 30% durante a estivação (LOVERIDGE, 1976). Essa diversidade na intensidade da depressão metabólica em anuros parece evidente nos níveis de resposta comportamental a estímulos exógenos. Enquanto há espécies que respondem prontamente à interrupção da estivação, como *Pleurodema diplolistris* (PEREIRA, 2009), indivíduos de outras

espécies podem demorar até 30 minutos para apresentar reação, como *Scaphiopus couchi* (MCCLANAHAN, 1967), ou ainda *Cyclorana alboguttata* que pode ser encontrado na superfície do solo após algumas horas do início da primeira chuva forte da estação (HUDSON & FRANKLIN, 2002a)

A depressão metabólica que acompanha a estivação em anuros pode acontecer concomitantemente ao aumento da degradação de reservas lipídicas (COWAN *et al*., 2000). Esta degradação forma, entre outros subprodutos, glicerol e corpos cetônicos (FUERY *et al*., 1998), que suprem a demanda dos tecidos dependentes de glicose, como cérebro e o músculo cardíaco durante o hipometabolismo, fase na qual os anuros interrompem a alimentação (SECOR, 2005). No jejum que acompanha a estivação, os anuros estivadores costumam aumentar a concentração de corpos cetônicos no plasma (STOREY, 2002), como relatado para os sapos *S. couchi*, que parecem ter este aumento associado à preservação dos estoques hepáticos de glicogênio durante a fase hipometabólica (STOREY& STOREY, 1990a). Em sapos que se enterram em clima frio, juntamente com o aumento da produção de corpos cetônicos há um aumento na gliconeogênese a partir de glicerol, o que não é comumente reportado para anfíbios estivadores (STOREY, 2002).

Os ajustes no uso dos substratos energéticos na estivação são precedidos por ajustes comportamentais que terminam no acúmulo de reservas energéticas durante a fase de chuvas na qual o alimento é abundante. Esses ajustes, junto com a redução da taxa metabólica, sustentam não somente a fase depressiva mas também a retomada da atividade no início da estação chuvosa (CARVALHO *et al*., 2010; PINTER *et al*., 1992; STOREY & STOREY, 2004, 2010). Dada a relação entre

atividade e perda de água, a redução do metabolismo aeróbio contribui tanto para o balanço energético quanto ao hídrico (ABE, 1995; MCCLANAHAN, 1972).

3.3. Preservação da funcionalidade de determinados sistemas

Outro aspecto relevante acerca dos ajustes fisiológicos em anuros que estivam é a ampla preservação da funcionalidade dos tecidos musculares e de sua capacidade para entrar em atividade mesmo após fases prolongadas de inatividade, algo corroborado pela manutenção dos níveis proteicos nestes tecidos, em sapos do gênero *Cyclorana* (HUDSON & FRANKLIN, 2002a; HUDSON *et al.*, 2006; JAMES, 2010). As evidências mais recentes indicam que o controle dos processos oxidativos nas fibras musculares de anuros envolvem modificações na expressão de genes que minimizam os danos causados pela inatividade durante a estivação (HUDSON *et al.*, 2008). A redução do consumo de oxigênio durante a fase de estivação em sapos *Cyclorana alboguttata* reduz a produção de espécies reativas de oxigênio, podendo reduzir a atrofia muscular e preservar a estrutura do músculo esquelético (HUDSON & FRANKLIN, 2002b).

De modo semelhante, em certas espécies de anuros foi observada uma preservação do tecido reprodutivo durante a fase de inatividade, como é o caso de *Rana temporaria*, que mantem a espermatogênese durante a estivação (JØRGENSEN, 1992). Contudo, neste caso também foi constatado um compromisso entre o tempo de estivação e a viabilidade das células reprodutivas, as quais são amplamente afetadas em períodos mais prolongados (JØRGENSEN, 1992). Assim, o emprego de proteínas, como substrato energético, na manutenção da homeostase energética durante a estivação pode comprometer o desempenho reprodutivo em condições normais (GUPPY *et al*., 1994; IP & CHEW, 2010; PINTER

et al., 1992). Acrescido a isto, a comportamento reprodutivo explosivo implica na manutenção dos estoques de glicogênio e lipídeo no início da reprodução, pois a vocalização é energeticamente custosa e em algumas espécies como em *Hyla arbórea* por exemplo, é sustentada por aproximadamente 3 horas com os estoques presentes (GRAFE & THEIN, 2001).

3.4. Comportamento reprodutivo e custo da reprodução em anuros de regiões áridas e semiáridas

A maioria das espécies de anfíbios que estivam em regiões semiáridas possuem um comportamento reprodutivo explosivo, investindo na procura de parceiros para a reprodução imediatamente após a saída do estado hipometabólico (PEREIRA, 2009; PINTER *et al*., 1992; SHALAN *et al.,* 2004). Cabe salientar que a maioria das espécies de anuros que efetivamente exibem fases de inatividade durante os meses mais secos do ano desempenham atividades energeticamente muito custosas no início da estação chuvosa. Como a vocalização por exemplo, uma atividade altamente custosa, como observado em sapos *Physalaemus pustulosus*, da região do Panamá, que durante a vocalização, exibem um gasto energético duas vezes maior que durante o repouso (BUCHER *et al*., 1982).

As fêmeas produzem ovócitos ainda na fase de estivação e os armazena até o momento da estação reprodutiva quando estes se tornam maduros e prontos para serem fecundados, enquanto os machos entram em intensa atividade vocal nos sítios de encontro com as fêmeas (PINTER *et al*., 1992; WELLS, 2001). Contudo, a preparação para a reprodução requer um alto investimento energético (CARVALHO *et al*., 2010), sendo a síntese proteica inibida durante a estivação, porém, amplamente ativada na fase inicial de atividade (HAND & HARDEWIG,

1996; JAMES, 2010; PAKAY, 2003). Nas Caatingas, além de todo o investimento energético dos anuros para a reprodução, há ainda um desafio adicional de atrelar a reprodução à imprevisibilidade das chuvas.

3.5. A estivação em anuros da Caatinga no contexto das mudanças climáticas

A maior parte dos aspectos citados sobre a estivação em anuros são virtualmente desconhecidos para as espécies brasileiras, em especial para aquelas das Caatingas. Apenas o estudo realizado com *Pleurodema diplolistris* (PEREIRA, 2009) procurou abordar alguns desses elementos que compõem os ajustes fisiológicos durante a estação seca neste ambiente. É provável que justamente esta imprevisibilidade no regime de chuvas seja um dos principais fatores que contribuem para a existência de diversos padrões interespecíficos de estivação.

Os indivíduos de *Proceratophrys cristiceps* observados na Caatinga exibem diminuição da capacidade de resposta frente a estímulos exógenos durante a estação seca neste ambiente, o que provavelmente indica uma maior intensidade de depressão da taxa metabólica quando comparado a *Pleurodema diplolistris*, que ocorre no mesmo local. Ainda há ao menos três espécies de *Physalaemus* ocupando o mesmo micro-habitat selecionado por indivíduos de *Pleurodema diplolistris* e *Proceratophrys cristiceps*, que parecem também evitar as condições adversas da fase de seca na Caatinga enterrando-se em profundidades que variam de 0,2 a mais de 1,5m da superfície (observações pessoais).

As informações obtidas em estudos anteriores mostraram uma estivação atípica em *Pleurodema diplolistris* e sugerem que os anuros da Caatinga possuem características peculiares no referente a história natural, regulação metabólica e balanço hídrico. Assim, o estudo dessas espécies é extremamente produtivo para

o entendimento das correlações ecológicas e comportamentais da diversidade fisiológica em anuros. Além disso, se trata de um processo de colonização de ambientes extremos mediante estratégias diferentes, que podem incluir diversos riscos nos diferentes cenários de aridização da Caatinga. Por tal razão a compreensão das estratégias utilizadas é essencial para prever o impacto global e específico sobre anuros. Desde a década de 1970 o índice pluviométrico na Caatinga tem sido menor em relação aos anos anteriores e um aumento dos eventos extremos passou a ser reportado, como, por exemplo, na enchente de 2004, quando choveu 1000mm contra a média anual de 550mm. A maior parte dos cenários para a região do nordeste brasileiro mostra uma tendência ao aumento da duração da estação seca (MARENGO, 2006). O impacto dessas mudanças sobre as populações de anuros da Caatinga não pode ser avaliado no contexto do conhecimento atual, e só pode ser compreendido mediante o entendimento das estratégias ecológicas, fisiológicas e comportamentais que caracterizam, durante esta estação, as diferentes linhagens de anuros da Caatinga.

4. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar as estratégias utilizadas para manutenção do balanço hídrico e energético frente as alterações sazonais na disponibilidade de recursos de água e alimento que ocorrem na Caatinga com as espécies *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae), *Physalaemus albifrons* (Leiuperidae) e *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae). Este projeto está fundamentado em quatro perguntas respondidas mediante as hipóteses ressaltadas em itálico ao longo da descrição dos objetivos.

4.1. Aspectos relevantes e observações pessoais

As perguntas a seguir foram postuladas para as três espécies sintópicas, sendo uma pertencente à família Cycloramphidae, *Proceratophrys cristiceps* e duas à família Leiuperidae, *Pleurodema diplolistris* e *Physalaemus albifrons*. Estas espécies não parecem exibir as estratégias mais extremas descritas para a manutenção do balanço hídrico em anuros que estivam, como a redução da permeabilidade via formação de casulos. Já o balanço energético é mantido entre outras formas, pela redução do metabolismo, que apesar de apresentar uma redução significativa no consumo de oxigênio não exibe uma grande diminuição na atividade de enzimas representativas da via oxidativa, como observado em estudos prévios em umas dessas espécies, *Pleurodema diplolistris*.

Ademais a preparação para a fase de estiagem em ambientes semiáridos é um dos grandes desafios para a sobrevivência neste tipo de ambiente. Assim como a reprodução, que é explosiva e oportunista, possuindo um alto custo energético, sendo outro grande desafio, pois é preciso que os anuros estejam prontos para a reprodução logo no início das chuvas, antes mesmo de se alimentarem. Contudo,

diferentes espécies que exibem modos de vida distintos podem lidar com este problema de forma diferenciada, dependendo de diversos aspectos da história natural.

1. Quais mecanismos são utilizados por estas espécies para manter o balanço hídrico durante os meses de estiagem na Caatinga?

As espécies estudadas podem diferir nas estratégias para a manutenção do balanço hídrico, assim foi verificado se *migrações verticais mantêm os indivíduos em micro-habitats de maior umidade durante a seca*. Além disso, *pode ocorrer o acúmulo de solutos, como ureia para a manutenção do potencial osmótico frente às alterações sazonais na disponibilidade de recursos hídricos*. *Tal estratégia fisiológica deve ser menos pronunciada em Pleurodema diplolistris, que por apresentar maior responsividade durante a estiagem (observação pessoal) não aparenta compensação comportamental limitada*.

2. A depressão aeróbia se reflete em diferentes modificações da atividade máxima de enzimas representativas das vias glicólitica e oxidativa nas espécies estudas? Há diferença entre estas espécies sintópicas no referente à preservação da atividade enzimática em órgãos como o músculo esquelético e o fígado?

Em diversas espécies de anuros que estivam é conhecido que a diminuição da taxa metabólica está correlacionada com alterações da atividade enzimática em vias do metabolismo energético. Dessa forma, foi verificado se *enzimas representativas das vias oxidativa e glicolítica têm suas atividades modificadas juntamente com as alterações sazonais no consumo de oxigênio*. Esta análise foi

importante devido ao fato das espécies serem sintópicas, sugerindo que *podem ocorrer variações interespecíficas na relação entre o consumo de oxigênio e a atividade enzimática nas diferentes espécies, e que tais variações podem guardar relação com a variação comportamental entre espécies.* Em especial durante a *mudança de profundidade no solo, que exige a preservação do músculo esquelético para a movimentação das espécies durante a seca.*

3. Qual a contribuição relativa de diferentes substratos energéticos para a manutenção da homeostase energética durante a estação chuvosa, reprodutiva e para a estação de seca nas diferentes espécies? O padrão de utilização é similar entre espécies mesmo no contexto de possível variação comportamental?

A fase de preparação para a estação seca em ambientes semiáridos é um dos grandes desafios para a sobrevivência neste tipo de ambiente. Dessa forma, é possível que *diferentes espécies de anuros da Caatinga apresentem diferentes concentrações de substratos energéticos na fase que antecede a estação seca, como resultado de diferenças em suas capacidades de deposição e uso de lipídeos e carboidratos.* E mais, por se tratarem de representantes de famílias distintas *as espécies podem diferir nos padrões de utilização de substratos energéticos ao longo das fases de chuva e estiagem.*

4. Qual a importância de subprodutos no metabolismo lipídico, como corpos cetônicos, para o sustento de tecidos mais dependentes de estoques de carboidratos em diferentes espécies? Ocorre um aumento na produção e/ou utilização de corpos cetônicos durante a estivação, sinalizando assim uma

priorização da oxidação das reservas de lipídeos para o sustento de tecidos glicose dependentes?

Dada a dependência energética de alguns tecidos, especialmente do cérebro, por carboidratos, o uso de corpos cetônicos provenientes do catabolismo de lipídeos pode conferir uma vantagem às espécies que dependem dos estoques de glicose e glicogênio para sustentar o aumento da atividade que acompanha a estação chuvosa após a seca nas Caatingas. Mesmo, tratando-se de diferentes espécies, é possível que haja *uma contribuição significativa do uso de corpos cetônicos para a manutenção dos tecidos mais dependentes deste tipo de substrato energético* e esta contribuição pode ser representada por uma maior atividade enzimática durante a estivação. Investigar estes aspectos em anuros da Caatinga permite identificar os diferentes mecanismos que estas espécies usam para sobreviver durante a estiagem, do ponto de vista dos ajustes em vias bioquímicas relacionadas ao metabolismo de corpos cetônicos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Caracterização dos Locais de Coleta

As coletas foram realizadas na Fazenda São Miguel (5°30’43”S. 36°36’18”W), distrito de Angicos, Rio Grande do Norte, região de Caatinga (Figura 1), com autorização do ICMbio (02010.003380/04-82 e 14836-1). Para a caracterização dos locais de estivação foram utilizados carregadores de dados e microestação climática HOBO® data loggers (Onset computers, Pocasset, MA, USA) que detiveram os dados de umidade, temperatura e o índice pluviométrico ao longo do trabalho.

5.2. Estratégia de amostragem sazonal

Foram utilizados 20 indivíduos machos adultos em cada fase amostrada, das espécies *Physalaemus albifrons* (Leiuperidae), *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae) e *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae). Os animais foram coletados na região de Angicos/RN (licença 14836-1 emitida pelo IBAMA) em quatro fases marcantes do ciclo sazonal, conforme a atividade observada previamente: 1) Início da estação chuvosa (IEC), reprodução máxima; 2) Final da estação chuvosa (FEC), fase nas quais os animais permanecem forrageando após as chuvas torrenciais; 3) Meio da estação seca (MES), fase em que os animais permanecem enterrados e 4) Final da estação seca (FES), quando os animais se preparam para a reprodução, nesta fase é possível observar o sistema reprodutor pronto. A massa (g) e comprimento rostro-cloacal (mm) são apresentados na tabela 1 e as espécies na Figura 2. Os espécimes utilizados para medidas de substrato energético e atividade enzimática foram capturados e instantaneamente eutanasiados através da imersão em nitrogênio líquido (protocolo aprovado pelo

comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo 168/2012). Após o congelamento, estes permaneceram armazenados em nitrogênio líquido e foram transportados ao laboratório para estocagem em freezer -80ºC até o momento de uso.

A imersão imediata em nitrogênio líquido após a captura impossibilitou a identificação no nível de espécie do gênero *Physalaemus*. Além disso, taxonomistas foram consultados e julgaram inviável identificar as espécies desse gênero após o congelamento. Entretanto, como por definição as espécies do gênero *Physalaemus* são mais próximas entre si do que em relação às outras espécies estudadas, tal limitação não oferece problema a interpretação dos resultados. Assim, os espécimes do gênero que foram imersos imediatamente em nitrogênio foram identificados ao longo do trabalho apenas pelo gênero (mesmo se com alta probabilidade se tratar de *Physalaemus albifrons*) e os que participaram do trabalho sem o congelamento imediato foram identificados no nível de espécie, *Physalaemus albifrons*. Isso explica o uso de *Physalaemus* ou *Physalaemus albifrons* ao longo da tese.

Tabela 1. Massa (g) e comprimento rostro-cloacal (CRC) (mm) de *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae), *Physalaemus albifrons* (Leiuperidae) e *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae) coletados no início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). Os valores representam a média ± desvio padrão (N=10).

	Estação								**Variação percentual**	
	IEC		***FEC***		***MES***		***FES***			
Espécie	**Massa (g)**	**CRC (mm)**	**Massa (g)**	**CRC (mm)**	**Massa (g)**	**CRC (mm)**	**Massa (g)**	**CRC (mm)**	**Massa (%)**	**CRC (%)**
Proceratophrys cristiceps	6,2 ±2,96	35,3 ±4,98	9,9 ±2,77	41,8 ±4,72	7,7 ±2,17	35,7 ±4,32	6,5 ±3,13	35,7 ±4,80	37,4	15,6
Physalaemus albifrons	1,2 ±0,29	19,7 ±1,20	2,1 ±0,34	19,5 ±0,89	1,3 ±0,27	19,5 ±1,87	1,1 ±0,25	19,8 ±0,98	47,6	1,8
Pleurodema diplolistris	2,8 ±0,90	30,9 ±3,28	3,0 ±0,43	33,8 ±2,56	2,9 ±0,74	31,6 ±4,16	2,9 ±0,87	31,0 ±2,97	6,4	8,6

Figura 1. Rio temporário, durante a fase de chuva e de estiagem, local onde as espécies *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae), *Physalaemus albifrons* (Leiuperidae) e *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae) são encontrados em atividade e enterrados, respectivamente.

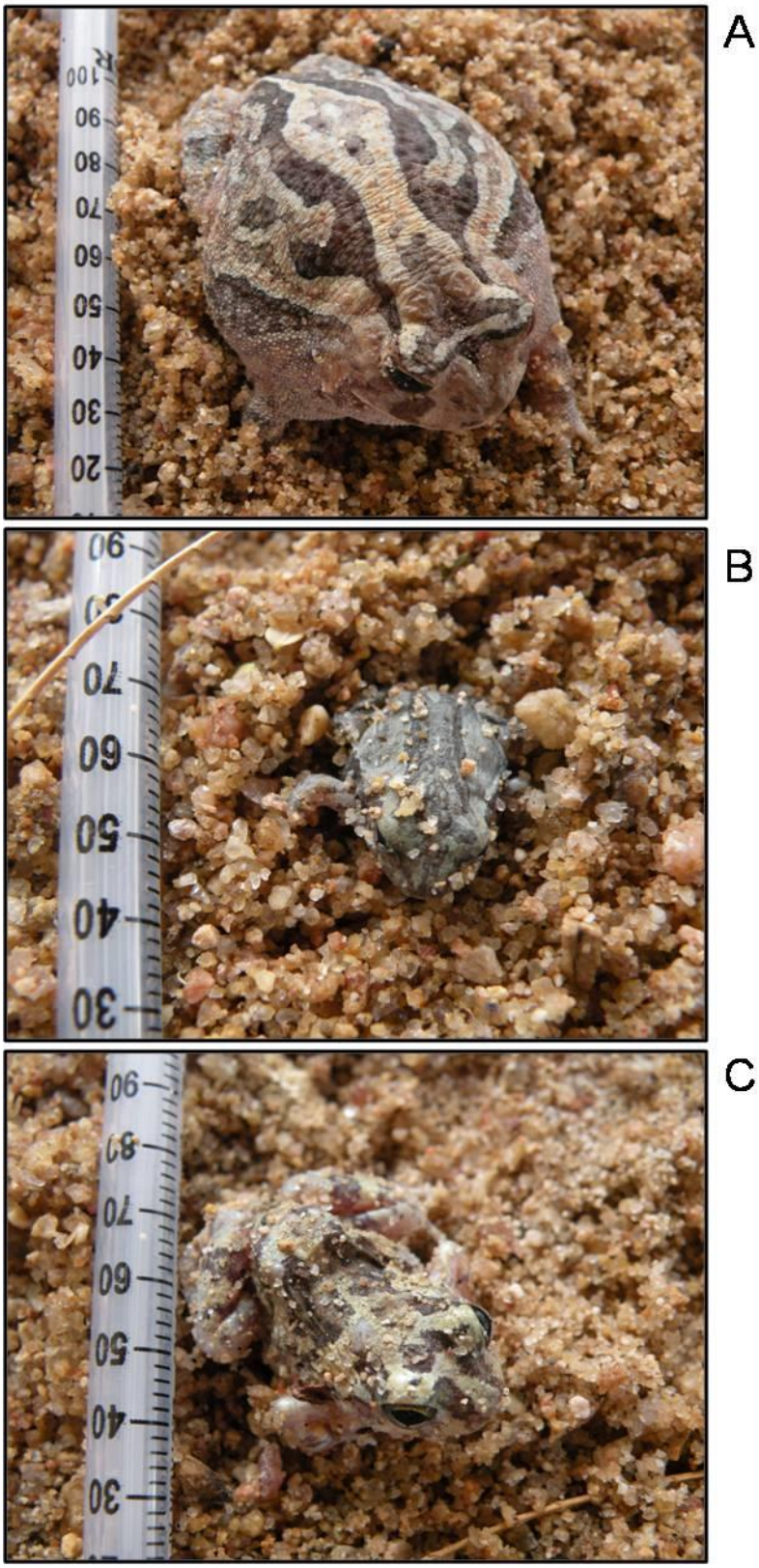

Figura 2. Animais coletados na Caatinga durante a fase final de estivação. Em A, *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae), em B, *Physalaemus albifrons* (Leiuperidae) e em C, *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae). Uma seringa de insulina foi utilizada como referência escalar para diferenciar o tamanho das três espécies.

5.3. Obtenção de plasma e urina

Foram obtidas amostras de sangue dos animais para determinação do hematócrito, osmolaridade e concentração de ureia no plasma dos espécimes nas quatro fases de coleta. Também foi realizada a coleta de urina presente na bexiga para análise da osmolaridade e concentração de ureia. A urina foi obtida através da leve compressão do abdômen, com uma cânula posicionada na entrada da cloaca direcionando o líquido obtido para o tubo no qual a urina foi armazenada. O hematócrito foi determinado através da porcentagem de hemácias, adquirida pela centrifugação de tubos capilares heparinizados, em uma centrífuga para micro-hematócrito Q222H2, por 2 minutos a 12000 rpm. O sangue foi centrifugado por 3 minutos a 6200 rpm, em uma microcentrífuga Ministar Serius 4000 e o plasma congelado até o momento das medidas de concentração de ureia, obtida através de teste Elisa, utilizando-se kit diagnóstico Analisa, e da osmolaridade através de um osmômetro de pressão de vapor Wescor 5500.

5.4. Distribuição da profundidade ao longo do tempo

Foram realizadas escavações ao longo do leito do Rio Sobradinho (Angicos/RN) no qual os animais permanecem enterrados durante a seca. Foram cavados mensalmente (julho a dezembro), seis buracos no decorrer de três anos, com cerca de 1,5 metros de largura e espaçamento de 3 metros entre as escavações, sendo a profundidade dependente do nível de água sob o solo. O revezamento ao longo do tempo foi realizado para que o mesmo local não fosse escavado em um intervalo menor que um ano, a fim de que os animais não migrassem horizontalmente a procura de outros refúgios. Foi verificado o número

de animais que estavam enterrados a cada 10 cm de profundidade e as medidas analisadas para verificar possíveis mudanças ao longo dos meses.

5.5. Desempenho locomotor

Os animais foram estimulados a saltar em uma pista de 1,6 metros de comprimento por 18 cm de largura, o tempo requerido para percorrer 1 metro foi medido através de um cronômetro digital JS 307 Junsd. Cada animal percorreu 3 vezes o percurso. Foi utilizada a média dos tempos de cada indivíduo. Os testes foram realizados entre as 17:00 e 19:00h a 30,0°C±0,2 (média ± desvio padrão).

5.6. Medida de taxa metabólica

A taxa metabólica em repouso dos indivíduos capturados nas quatro fases foi estimada a partir de medidas de consumo de oxigênio através de um sistema de respirometria de fluxo intermitente com lavagem sequencial de câmaras metabólicas, sendo essas medidas realizadas a 30°C. Foram utilizadas câmaras de acrílico de 400 mL preenchidas com areia esterilizada e ligadas a válvulas de controle de fluxo de ar. No início da coleta de dados, as câmaras foram lavadas com um fluxo constante de ar (300 mL/min) durante 15 minutos, tempo suficiente para que todo o ar da câmara fosse renovado. Em seguida as câmaras foram fechadas durante 75 minutos e posteriormente abertas para uma nova lavagem com ar de 15 minutos de duração. A mistura de ar era primeiramente conduzida através de um filtro contendo sílica gel para a absorção do vapor de água e Ascarite para a absorção do gás carbônico e posteriormente para o analisador de oxigênio PA-1 (Sable Systems). O analisador de oxigênio esteve conectado

a uma interface que enviava o sinal digitalizado para um computador, onde a aquisição, armazenamento e analise dos resultados foram executados pelo programa Datacan V (Sable Systems). O consumo de oxigênio foi calculado a partir da integral da curva de concentração de oxigênio contra o tempo registrado no computador, multiplicada pelo fluxo de ar utilizado durante a aquisição dos dados e dividida pelo tempo em que as câmaras permaneceram fechadas. Os valores obtidos foram convertidos para condições normais de temperatura e pressão (CNTP) e expressos em $mlO_2/g/h$, sendo utilizadas as seguintes equações:

VO_2 = (área) x (fluxo) / (massa x tempo)

Conversão para condições normais de temperatura e pressão (CNTP)

VO_2 x (P / 760) x ((273,15) / 273,15 + T))

Onde área é o valor da integral da curva em porcentagem; fluxo é o valor do fluxo de ar utilizado em mL/min; a massa do animal em gramas e o tempo de fechamento da câmara em minutos. Na fórmula de conversão para condições normais de temperatura e pressão (CNTP), P é a pressão atmosférica em mmHg no local de realização da medida e T é a temperatura em °C durante a realização da medida

A taxa metabólica durante a locomoção forçada foi realizada através de respirometria fechada. As câmaras foram lavadas com um fluxo constante de ar (130 mL/min) durante 5 minutos, tempo suficiente para que todo o ar da câmara fosse renovado. Em seguida as câmaras foram fechadas e movimentadas em sentido horário, estimulando os animais a se movimentarem até não responderem mais ao estímulo (foi considerado exaustão o momento em que o animal não conseguiu voltar a posição inicial, permanecendo em decúbito

dorsal), de 4 a 7 minutos. Posteriormente as câmaras foram abertas para uma nova lavagem com ar, por 5 minutos e a mistura foi primeiramente conduzida através de um filtro contendo sílica gel para a absorção do vapor de água e Ascarite para a absorção do gás carbônico e posteriormente para o analisador de oxigênio PA-1 (Sable Systems). O analisador de oxigênio esteve conectado a uma interface que enviava o sinal digitalizado para um computador, onde a aquisição, armazenamento e analise dos resultados foram executados pelo programa Datacan V (Sable Systems). O consumo de oxigênio foi calculado seguindo a descrição utilizada na taxa metabólica de repouso.

5.7. Atividade enzimática

Foram determinadas as atividades máximas das enzimas: piruvato quinase (PK), representativa da via glicolítica; lactato desidrogenase (LDH), indicadora da produção de lactato, metabolismo anaeróbio; da β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) e da succinil-CoA cetotransferase (SKT) pertencentes a via de transformação de corpos cetônicos; da citrato sintase (CS), indicadora da capacidade aeróbia, pertencente ao Ciclo de Krebs; β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD), indicadora da capacidade de utilização de lipídeos.

Os procedimentos para a medida da atividade enzimática se baseiam em análises espectrofotométricas, de acordo com procedimentos padronizados a partir de BERGMEYER (1983). Para realização destas medidas foi utilizado um espectrofotômetro Beckman DU-800 equipado com um controlador de temperatura Peltier (Beckman) e cubetas de vidro para um volume final de 700 μL. Foram empregados métodos baseados nas alterações de absorbância de $NADP^+$ ou NADH a 310 e 340 nm e DTNB a 412 nm, em condições de saturação

de substrato e não inibitórias a 25ºC, com pH ajustado de acordo com as características funcionais de cada enzima.

PK (E.C. 2.7.1.40) – O meio de reação foi constituído de tampão Imidazol-HCl a 100 mM de concentração final (pH 7,0); $MgCl_2$ a 10 mM; KCl a 100 mM; ADP a 2,5 mM; $F1,6P_2$ a 0,02 mM; NADH a 0,15 mM; LDH a 12,1 $U.mL^{-1}$ e extrato homogeneizado diluído. Nesta etapa foi realizada uma primeira medida para o controle de eventuais alterações de absorbância (controle) por 3 minutos, quando foi adicionado o substrato fosfo(enol)piruvato a 2,5 mM e a variação de absorbância novamente acompanhada por mais 3 minutos.

LDH (E.C. 1.1.1.27) – O meio de reação foi constituído de tampão Imidazol-HCl a 100 mM de concentração final (pH 7,0); DTT a 5 mM; NADH a 0,15 mM e extrato homogeneizado diluído. Nesta etapa foi realizada uma primeira medida para o controle de eventuais alterações de absorbância (controle) por 3 minutos, quando foi adicionado o substrato piruvato a 1 mM e a variação de absorbância novamente acompanhada por mais 3 minutos.

HBDH (E.C. 1.1.1.30) – O meio de reação foi constituído de tampão Tris-HCl a 50 mM de concentração final (pH 8,0); NADH a 0,15 mM e extrato homogeneizado diluído. Nesta etapa foi realizada uma primeira medida para o controle de eventuais alterações de absorbância (controle) por 3 minutos, quando foi adicionado o substrato acetoacetato a 40 mM e a variação de absorbância novamente acompanhada por mais 3 minutos.

SKT (E.C. 2.8.3.5) – O meio de reação foi constituído de tampão Imidazol-HCl a 50 mM de concentração final (pH 7,0); $MgCl_2$ a 100 mM; acetoacetil-CoA a 35 mM e extrato homogeneizado diluído. Nesta etapa foi realizada uma primeira medida para o controle de eventuais alterações de absorbância (controle) por 3 minutos, quando foi adicionado o substrato succinato a 20 mM e a variação de absorbância novamente acompanhada por mais 3 minutos.

CS (E.C. 4.1.3.7) – O meio de reação foi constituído de tampão Tris-HCl a 50 mM de concentração final (pH 8,0); DTNB a 0,1 mM; acetil-CoA a 0,2 mM, extrato homogeneizado diluído. Nesta etapa foi realizada uma primeira medida para o controle de eventuais alterações de absorbância (controle) por 3 minutos, quando foi adicionado o substrato oxaloacetato a 0,9 mM e a variação de absorbância novamente acompanhada por mais 3 minutos.

HOAD (E.C. 1.1.1.35) – O meio de reação foi constituído de tampão Imidazol-HCl a 100 mM de concentração final (pH 7,0); NADH a 0,15 mM e extrato homogeneizado diluído. Nesta etapa foi realizada uma primeira medida para o controle de eventuais alterações de absorbância (controle) por 3 minutos, quando foi adicionado o substrato acetoacetil-CoA a 0,1 mM e a variação de absorbância novamente acompanhada por mais 3 minutos. Todos os ensaios foram realizados no mínimo em duplicata e a atividade enzimática foi calculada a partir da equação:

$$\text{Atividade Enzimática} = [\ (\Delta Abs.min^{-1})\ .\ \text{diluição total}\ ] / (\ \varepsilon\ .\ d\ )$$

onde "$\Delta Abs.min^{-1}$" é a variação de absorbância por minuto após a adição de substrato menos a variação de absorbância do controle; "diluição total" é a

diluição total da amostra de tecido; “ε” é o coeficiente de absorção molar para o NADH ($6,22.10^2$ $L.mol^{-1}.mm^{-1}$) ou DTNB ($13,6.10^2$ $L.mol^{-1}.mm^{-1}$); e “d” é a distância percorrida pelo feixe de luz na solução (igual a 10mm em todos os ensaios).

Os resultados de atividade enzimática foram expressos em µmol de substrato convertido a produto por minuto por grama de tecido úmido, equivalente a unidade U.g $tecido^{-1}$ (SI).

5.8. Concentração de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis foi determinada com base no método descrito por LOWRY *et al.* (1951) segundo a reação de Folin Ciocalteau. Os ensaios foram preparados com o extrato bruto diluído 1:10 em água destilada, misturado com uma solução contendo tartarato de sódio a 4%, $CuSO_4$ a 2% e $NaCO_{3anidro}$ + NaOH. Decorridos 10 minutos será acrescentado o reativo de Folin e após 30 minutos foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 660 nm. A concentração de proteínas nas amostras de tecido foi calculada a partir da reta obtida com o padrão de soluções de albumina bovina, de grande pureza e os valores foram expressos em miligramas de proteína solúvel por grama de tecido úmido.

5.9. Concentração de glicogênio

O extração foi realizada através do método descrito por BIDINOTTO *et al*. (1997) com algumas modificações. As amostras foram fragmentadas em almofariz contendo nitrogênio líquido e transferidas para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1 mL de KOH a 6N. Os tubos com as amostras foram colocados

em banho maria por 4 minutos e a homogeneizados em agitador tipo vortex para completa dissolução do tecido. Uma alíquota de 250 µL foi retirada, acrescido 3 mL de álcool 95% e homogeneizada. Após, foi adicionado 100 µL de K_2SO_4 10% e homogeneizado novamente. A mistura foi centrifugada por 3 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante foi descartado e acrescido 2.5 mL de água destilada a solução. Para a determinação de glicogênio foi retirado 100 µL da solução anterior e colocado em um tubo de ensaio, adicionado 700 µL de fenol 3% e 2 mL de ácido sulfúrico, após 10 minutos foi realizada a leitura a 480 nm de absorbância (DUBOIS *et al*., 1956). Para testar a eficiência dos ensaios para determinação das concentrações glicogênio, foi preparada a curva padrão empregando-se D-Glucose (Sigma-Aldrich Co.), possibilitando assim a validação dos protocolos empregados dentro de uma faixa de concentração do metabólito.

Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos glicosil-glicose por grama de tecido.

5.10. Concentração de lipídeos totais

O teor de lipídeos totais foi determinado usando com pequenas modificações dos métodos descritos sobre a reação com fosfovanilina medida a 540 nm (FRINGS & DUNN, 1970; FRINGS *et al.*, 1972; KNIGHT *et al*., 1972). As amostras de tecido foram previamente submetidas ao processo de extração com o emprego de uma mistura de clorofórmio e metanol (FOLCH *et al*., 1957; PARRISH, 1999).

As amostras foram homogeneizadas em 50 volumes de uma solução clorofórmio:metanol (2:1; v/v), e 7 volumes de água destilada, em um homogeneizador Ultra-Turrax (IKA LaborTechnik) por cerca de 3 minutos. O

extrato foi centrifugado por 3 minutos a 8000 g, quando foi formado um sistema de duas fases. A fase inferior foi totalmente recolhida por uma pipeta *Paster*, tomando-se cuidado para não misturar as duas fases. A fase recolhida foi colocada em outro frasco com tampa onde foi adicionado 5 volumes (em relação à solução de clorofórmio:metanol:cloreto de magnésio – 0,034% (3:50:50; v/v). Em seguida foi adicionado ao liquido remanescente cerca de 1/3 de seu volume de metanol puro (ou quantidade suficiente para a formação de um sistema de fase única). O frasco foi colocado aberto em estufa a 60°C durante 24 horas para a evaporação completa dos solventes. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de clorofórmio puro ao frasco, que foi mantido fechado em freezer -20°C até o momento dos ensaios para a determinação da concentração de lipídeos totais.

Para a determinação da concentração de lipídeos totais foi colocado 20 µL da solução proveniente da extração em um tubo de ensaio. O tubo foi colocado em estufa a 60°C para evaporação total do solvente, posteriormente foi acrescido 200 µL de ácido sulfúrico puro e a mistura foi fervida em banho-maria por 10 minutos. Após esse intervalo, foi adicionado 5 mL de fosfovanilina e a mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C. A absorbância da solução foi lida a 540nm. O cálculo da concentração de lipídeos totais foi realizado através da equação linear de uma curva construída utilizando-se a massa de lipídeos totais contidas em uma solução padrão de óleo de fígado de bacalhau (Sigma, C5650), submetida aos mesmos procedimentos de dosagem. Os resultados foram expressos em miligrama de lipídeo por grama de tecido úmido.

6. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados referentes à concentração de metabólitos e a atividade enzimática dos períodos sazonais foram analisados através de uma ANOVA para amostras independentes no nível de significância de 0.05. Nos casos em que os dados não seguiram as exigências de homogeneidade de variâncias e normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Waliis para a comparação da tendência central dos grupos. Para a comparação *a posteriori* entre grupos foi utilizado o teste Tukey. Para os dados de consumo de oxigênio e desempenho locomotor foi usado o Test t para amostras independentes no nível de significância de 0.05 ou o teste Mann-Whitney para as amostras que não seguiram as exigências de homogeneidade das variâncias e normalidade. Todas as análises estatísticas foram aplicadas segundo ZAR (2010), com o auxílio do programa SPSS (SPSS Software).

7. RESULTADOS

7.1. Caracterização dos Locais de Coleta

Os dados médios da quantidade de chuva (mm) são apresentados na Figura 2, onde é possível visualizar a precipitação entre os meses de fevereiro de 2009 e julho de 2013. O índice pluviométrico variou anualmente, com diferentes concentrações mensais ao longo dos anos. A umidade relativa do solo, mensurada de maio a novembro de 2012 foi medida a 90 cm de profundidade e permaneceu acima de 50% durante os primeiros quatro meses após o final da estação chuvosa, atingindo o mínimo de 26% após sete meses de estiagem. Ainda a 90 cm de profundidade, a temperatura variou de 31,7 a 32,7°C ao longo da estiagem.

As chuvas foram reduzidas nos anos de 2012 e 2013, quando comparadas aos anos anteriores e concentradas em diferentes meses ao longo dos anos, corroborando o descrito para o domínio morfoclimático estudado, que apresenta índice pluviométrico variando de 300 a 700 mm por ano, com chuvas imprevisíveis (AB'SABER, 1974). E mais, tendem a corroborar a descrição dos cenários, nos quais ocorre a redução da quantidade de chuvas desde a década de 1970. Momento no qual, passou a ser reportado um índice pluviométrico menor em relação aos anos anteriores e um aumento de eventos extremos, como por exemplo, a enchente de 2004, quando choveu 1000 mm contra a média anual de 550 mm (MARENGO, 2006). Porém, isto pode resultar em um clima mais quente e ligeiramente úmido, com isso é de se esperar que as altas temperaturas possam gerar aumento da evaporação, reduzindo o volume de água armazenada no solo e produzindo uma deficiência no balanço hidrológico (MARENGO, 2008). O que pode interferir na quantidade de água disponível no

solo no qual os animais encontram-se enterrados, que aparentemente já possui uma baixa umidade relativa em profundidades de 90 cm no local observado, exibindo aproximadamente 25% de umidade relativa no meio da estação de estiagem.

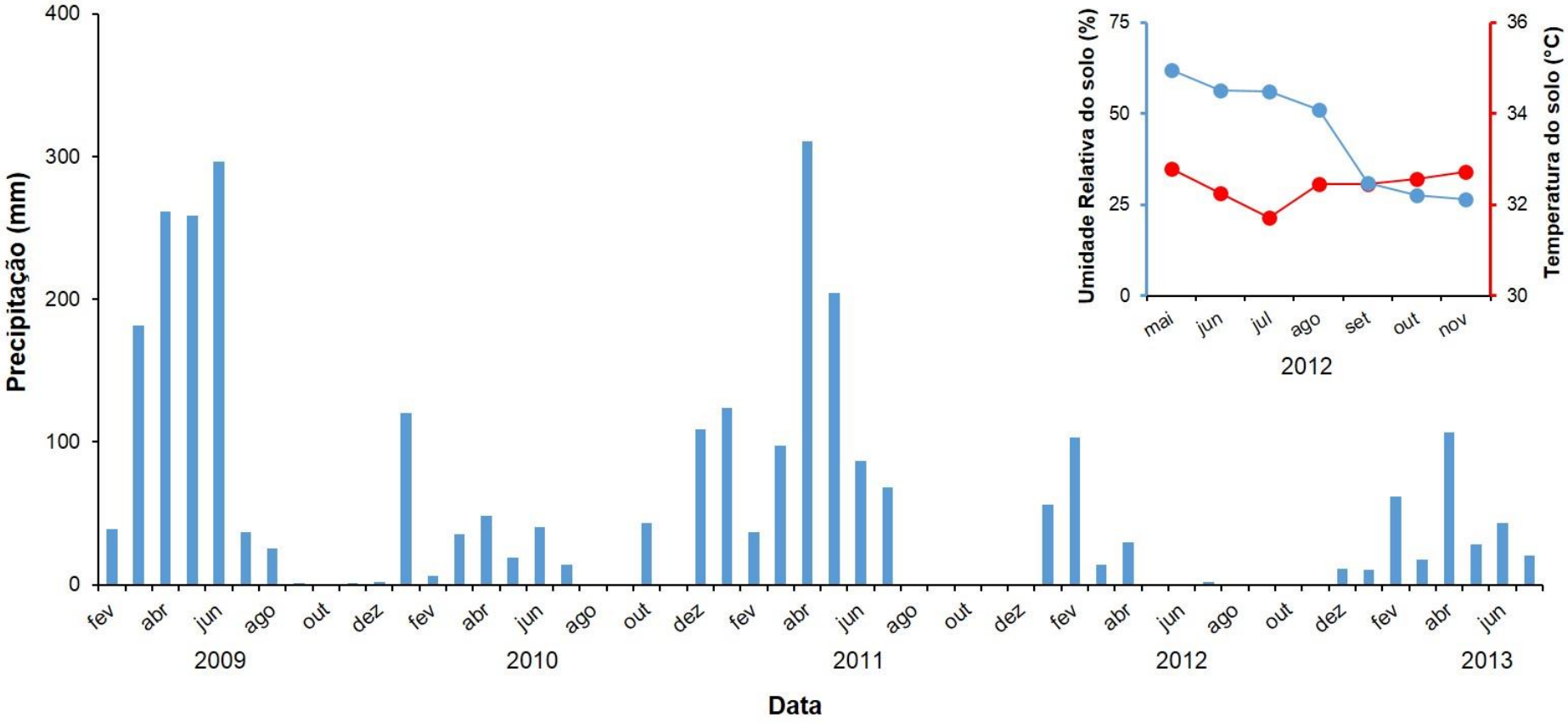

Figura 2. Precipitação (mm) ao longo do tempo (fevereiro de 2009 a agosto de 2013) no habitat de estivação (Angicos/RN) das três espécies estudada. Em tamanho menor a umidade relativa (%) e a temperatura (ºC) medidas a 90 cm de profundidade, de maio a novembro de 2012, no micro-habitat dos espécimes coletados.

7.2. Distribuição da profundidade ao longo do tempo

A profundidade em que os animais foram encontrados (Figura 3) nos quatro primeiros meses após o final da estação chuvosa (julho, agosto, setembro e outubro de 2012) foi crescente ao longo do tempo apenas para a espécie *Pleurodema diplolistris* (Kruskal-Wallis X^2=16,2 p≤0,009). Em agosto, primeiro mês após o final das chuvas, os animais foram encontrados na menor profundidade observada, 34±6 cm (média ± dp) e em novembro os espécimes foram coletados a 116±17 cm (média ± dp). Os sapos *P. cristiceps* e *Physalaemus* exibiram profundidades constantes ao longo da estação seca.

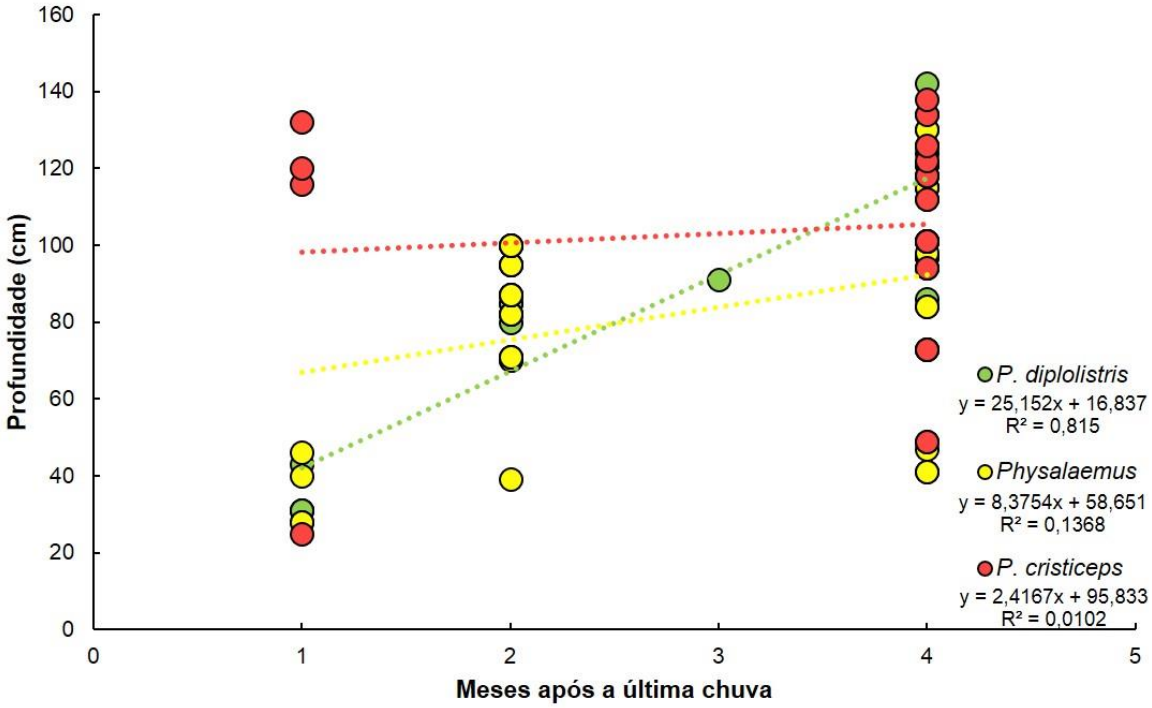

Figura 3. Profundidade (cm) em que os espécimes de *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae) *Physalaemus* (Leiuperidae) e *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae) foram encontrados enterrados ao longo de quatro meses (julho a setembro de 2012) após as últimas chuvas.

7.3. Desempenho locomotor

Nos testes de desempenho locomotor (Figura 4), os animais coletados durante a estação chuvosa, apresentaram velocidades diferentes dos animais coletados durante a estiagem. Por conseguinte, *P. cristiceps* (Mann Whitney W=55,0 p<0,001) apresentou velocidade 83,2% maior durante a locomoção forçada na fase de reprodução; *P. albifrons* (t-Test T=6,1 p<0,001) velocidade 82,2% superior durante a fase de reprodução e *P. diplolistris* (Mann Whitney W=71,0 p<0,009) velocidade 46,7% maior durante a fase reprodutiva quando comparada a fase de estivação.

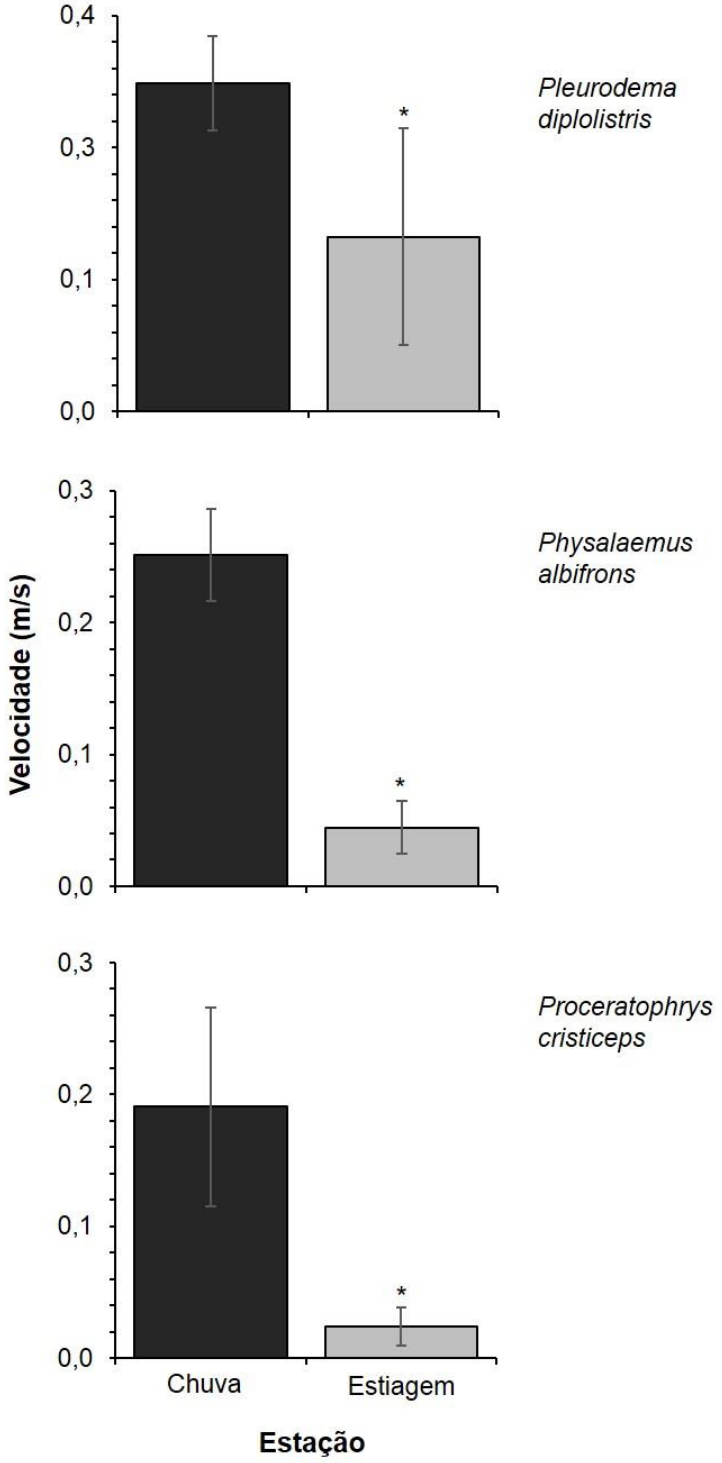

Figura 4. Velocidade média das três espécies, *Pleurodema diplolistris, Physalaemus albifrons* e *Proceratophrys cristiceps,* em duas estações amostradas, chuva (fase de atividade) e estiagem (fase de estivação). A velocidade foi medida durante a fase de reprodução sob temperaturas de 29,2 a 32,0ºC e durante a fase de estivação sob temperaturas de 29,4 a 32,5ºC. Os asteriscos representam valores significativamente diferentes entre a mesma espécie nas duas estações amostradas. Estão apresentadas a média e o desvio padrão de medidas realizadas com 10 animais de cada espécie.

7.4. Medida de taxa metabólica

O consumo de O_2 (Figura 5) durante o repouso na fase de estiagem foi menor para *P. diplolistris* (t-Test T=6,13 p<0,001), *P. albifrons* (t-Test T=5,46 p<0,001) e *P. cristiceps* (t-Test T=5,60 p<0,001) quando comparado a fase de chuva. Durante a atividade forçada, o consumo de oxigênio foi menor apenas para *P. cristiceps* durante a estiagem (t-Test T=7,28 p<0,001) em comparação à fase chuvosa. A redução no consumo de oxigênio em repouso durante a fase de estiagem foi de 49,1% em *P. diplolistris,* 51,0% em *P. albifrons* e 49,9% em *P. cristiceps* quando comparada ao consumo durante a fase de chuva. O escopo metabólico fatorial foi de aproximadamente 8,5 durante a estação de chuva e de aproximadamente 13,7 durante a estiagem em *P. diplolistris* e *P. albifrons*. Em *P. cristiceps* foi de 15,2 durante a estação de chuva e de 8,8 durante a estiagem.

A diferença da taxa metabólica entre as espécies foi marcante e deve ser ressaltada neste estudo comparativo. Por exemplo, em *P. diplolistris* o consumo de oxigênio durante o repouso na fase de estiagem foi maior que o consumo observado em *P. cristiceps* durante a fase de chuvosa. O consumo de oxigênio em *P. diplolistris* durante a atividade forçada na fase estiagem foi aproximadamente duas vezes o consumo observado em *P. cristiceps* e *P. albifrons* durante a fase de chuva.

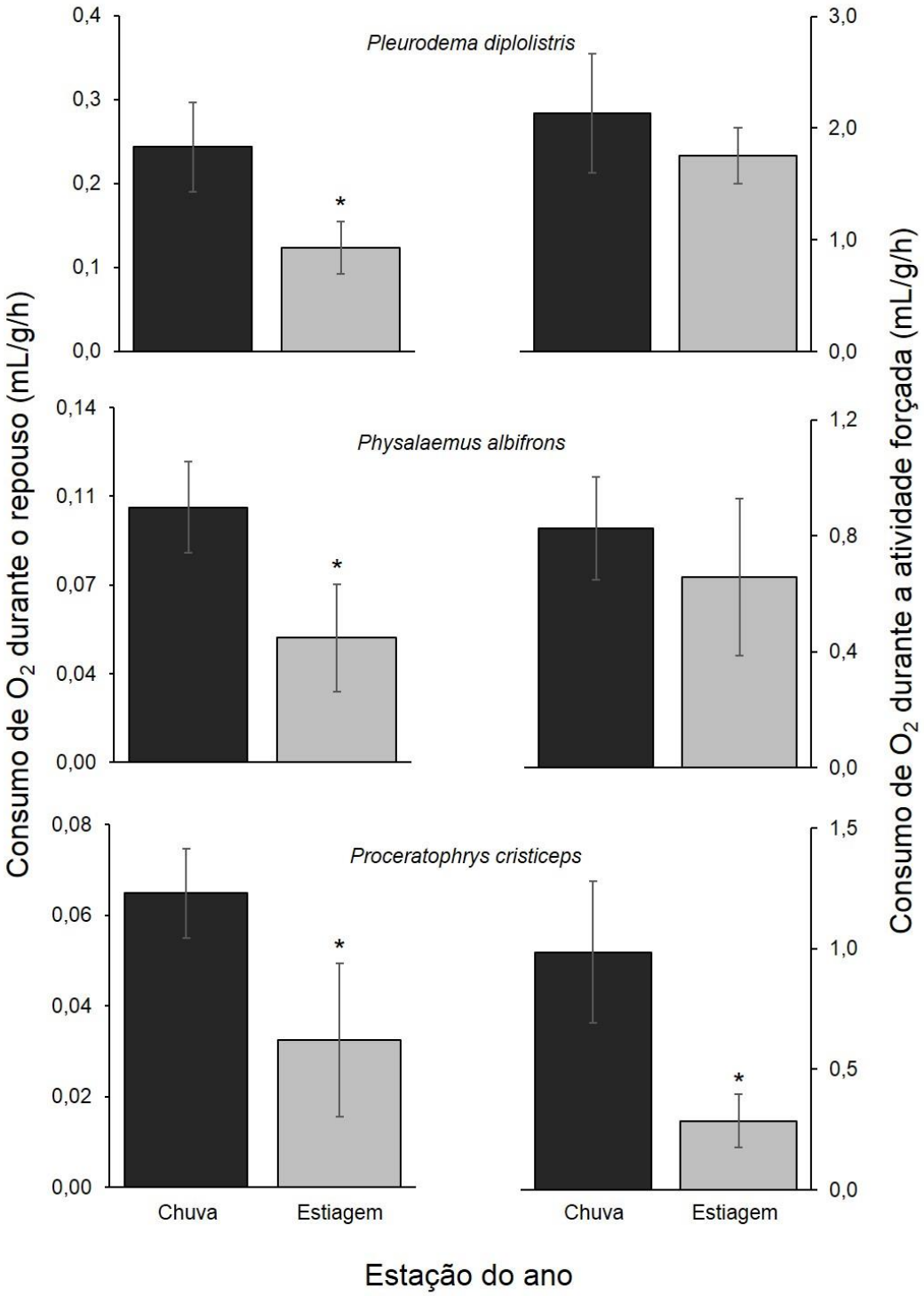

Figura 5. Consumo de oxigênio durante o repouso e a atividade forçada (mL/g/h) em *Pleurodema diplolistris*, *Physalaemus albifrons* e *Proceratophrys cristiceps* durante as fases de chuva e estiagem. Estão apresentadas a média e o desvio padrão de medidas realizadas com 10 animais de cada espécie. Os asteriscos representam valores significativamente diferentes entre a mesma espécie nas duas estações amostradas.

7.5. Hematócrito

A medida do hematócrito (%) apresentou mudanças nas três espécies estudadas (Figura 6), sendo reportado um valor maior em *Proceratophrys cristiceps* (ANOVA F=20,1 p<0,001 Tukey P=0,001), *P. albifrons* (ANOVA F=26,2 P<0,001 Tukey P<0,001) e *P. diplolistris* (ANOVA F=97,6 p<0,001 Tukey p<0,001) durante a fase chuvosa, na qual as três espécies são encontradas em atividade. Não foram observadas mudanças nas fases de estiagem, na qual as espécies são encontradas enterradas.

7.6. Concentração de ureia

A concentração plasmática de ureia (mg/dL) foi menor durante a estação chuvosa em *P. diplolistris* (Kruskal-Wallis X^2=19,6 p<0,001 Tukey p≤0,001), *P. cristiceps* (Kruskal-Wallis X^2=6,1 p<0,001 Tukey p≤0,008) e *P. albifrons* (Kruskal-Wallis X^2=21,9 p<0,001 Tukey p≤0,01). Contudo, são semelhantes entre o meio e o final da estação seca em *P. diplolistris* e entre a estação chuvosa e o meio da estação seca em *P. cristiceps*. Em *Physalaemus albifrons* houve diferença entre três estações observadas (Figura 7).

A concentração de ureia na urina de *P. diplolistris*, *P. cristiceps* e *P. albifrons* foi mensurada apenas no final da estação seca, em razão dos espécimes utilizados serem encontrados sem urina na bexiga durante a estação chuvosa e início da estiagem.

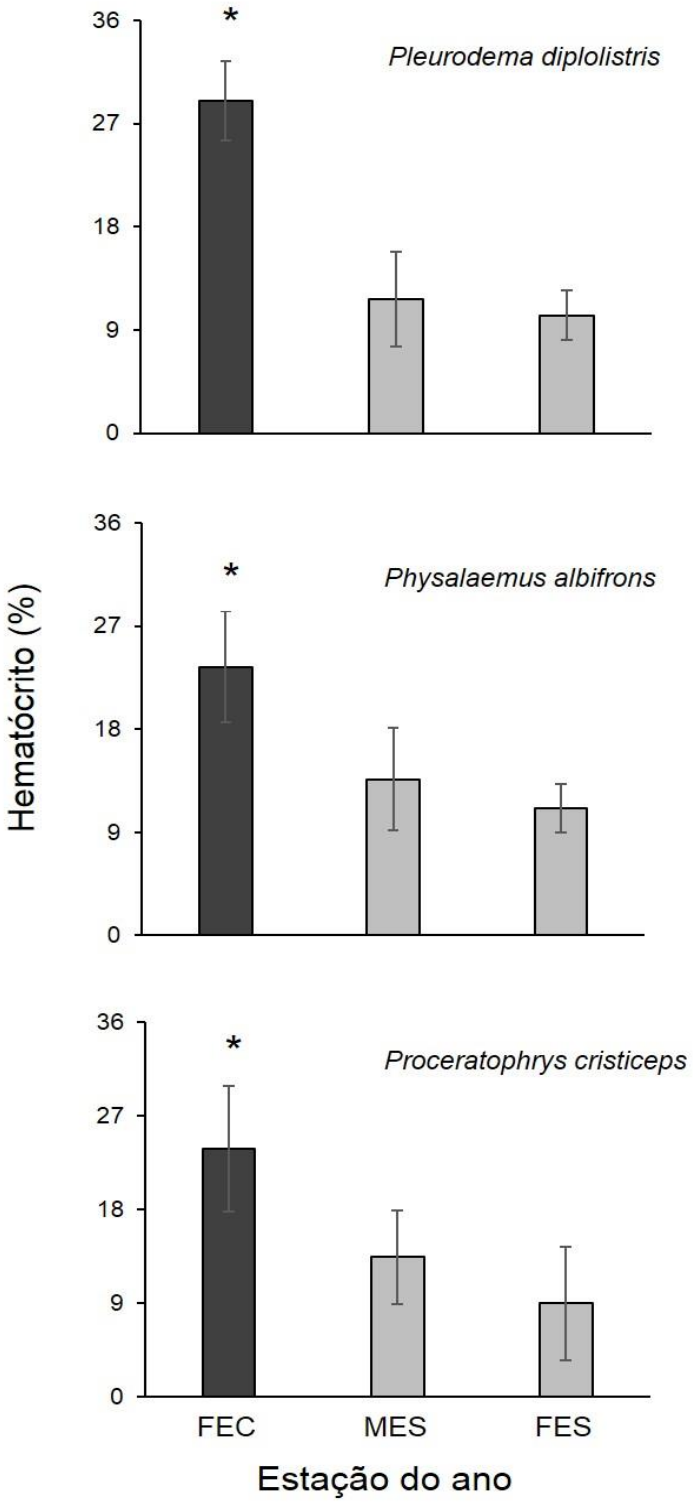

Figura 6. Hematócrito (%) de *Pleurodema diplolistris, Physalaemus albifrons* e *Proceratophrys cristiceps* em animais coletados no final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). Estão apresentadas a média e o desvio padrão de medidas realizadas com 10 animais de cada espécie. Os asteriscos representam valores significativamente diferentes entre a mesma espécie nas estações amostradas.

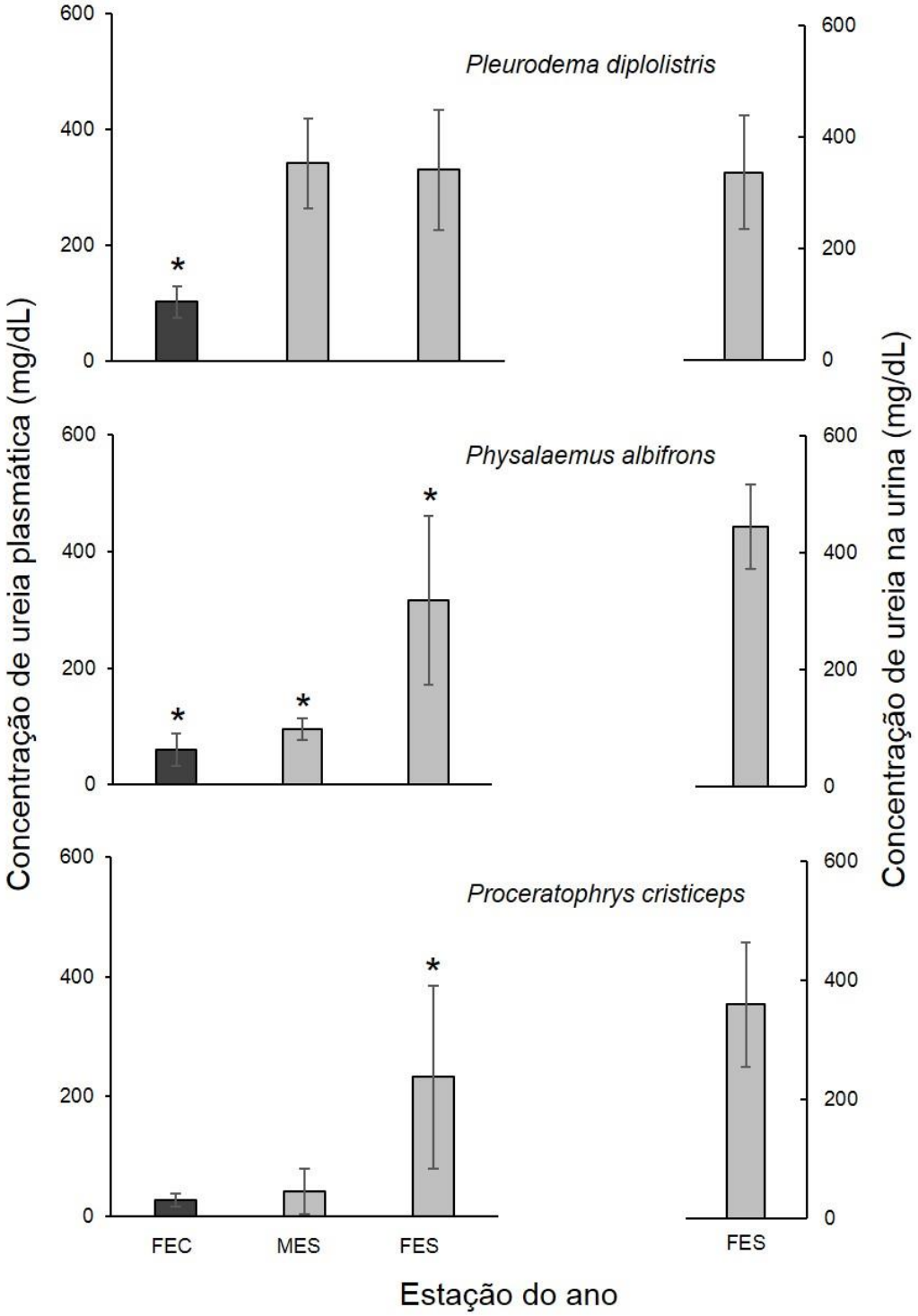

Figura 7. Concentração de ureia plasmática (mg/dL) em *Pleurodema diplolistris, Physalaemus albifrons* e *Proceratophrys cristiceps,* em animais coletados no final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). Estão apresentadas a média e o desvio padrão de medidas realizadas com 10 animais de cada espécie. Os asteriscos representam valores significativamente diferentes entre a mesma espécie nas estações amostradas.

7.7. Osmolaridade

A osmolaridade plasmática (mmol/Kg) em *Pleurodema diplolistris* foi menor durante a estação chuvosa (Figura 8), em comparação as estações de estiagem (ANOVA $F=39,5$ $p<0,001$ Tukey $p\leq0,027$). Em *Physalaemus* ocorreu um aumento desse parâmetro (Kruskal-Wallis $X^2=22,2$ $p<0,001$ Tukey $p\leq0,010$) ao longo das estações, sendo menor na estação chuvosa e maior no final da estação seca. Já em *P. cristiceps* durante a fase chuvosa e o início da estação seca foram observados valores menores do que no final da estiagem (Kruskal-Wallis $X^2=12,4$ $p=0,002$ Tukey $p\leq0,041$).

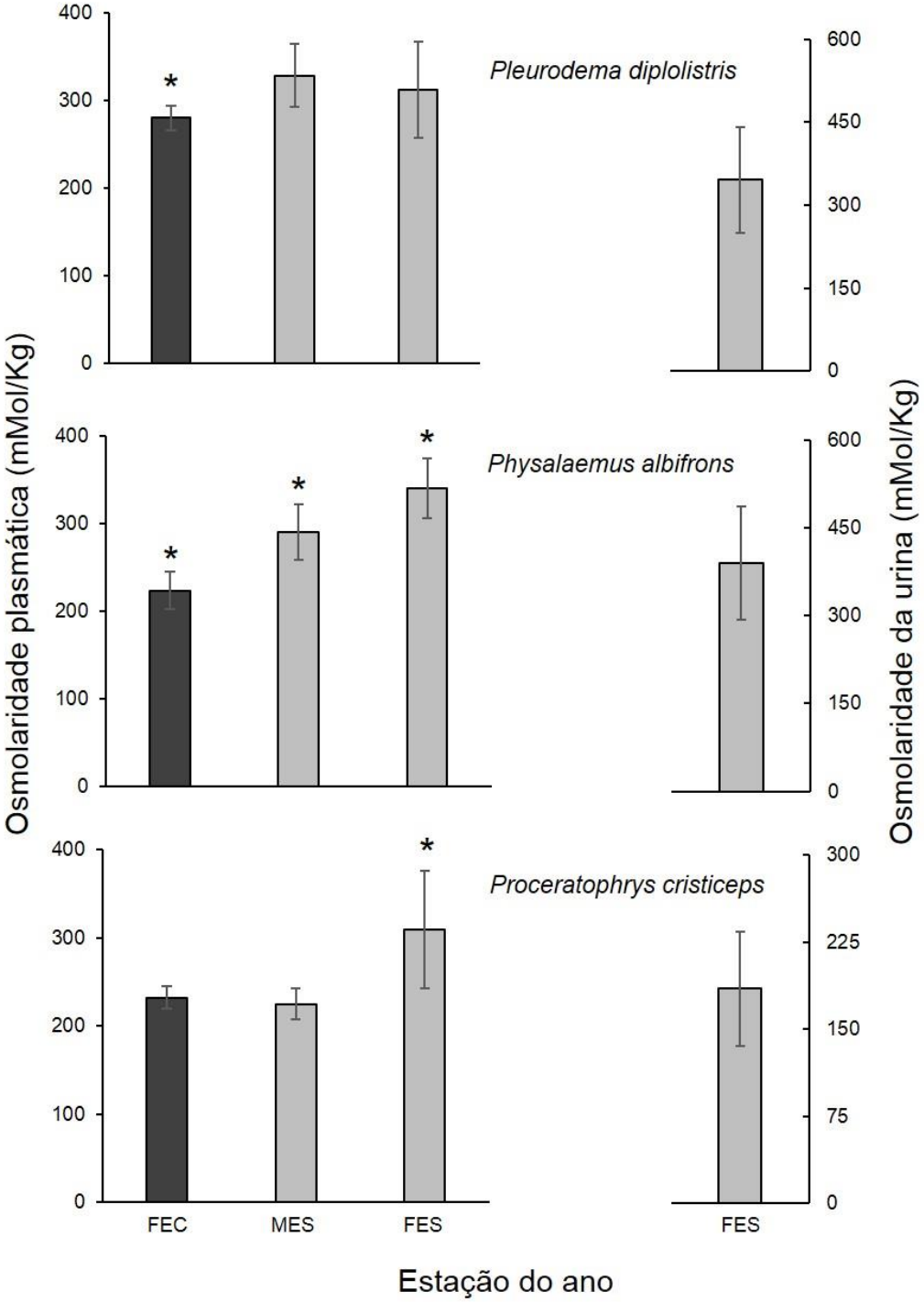

Figura 8. Osmolaridade plasmática (mMol/Kg) e da urina (mMol/Kg) de *Pleurodema diplolistris, Physalaemus albifrons* e *Proceratophrys cristiceps,* em animais coletados no final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). Estão apresentadas a média e o desvio padrão de medidas realizadas com 10 animais de cada espécie. Os asteriscos representam valores significativamente diferentes entre a mesma espécie nas estações amostradas.

7.8. Atividade Enzimática

Pleurodema diplolistris

Em *Pleurodema diplolistris* (Tabela 3, para tendências observar Tabela 4) a atividade máxima (U/g de tecido úmido) da citrato sintase (CS) nos músculos dos membros posteriores foi maior no início da estação chuvosa (Kruskal-Wallis X^2=20,542 P<0,001 Tukey P≤0,050), assim como a atividade máxima da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (Anova F=19,493 P<0,001 Tukey P≤0,001). A atividade máxima da piruvato quinase (PK) nos músculos dos membros posteriores não variou ao longo das estações (Anova F=3,091 P=0,079). A atividade máxima da lactado desidrogenase (LDH) foi menor no final da estação de estiagem (Kruskal-Wallis X^2=15,839 P=0,001 Tukey P≤0,034). A atividade máxima da succinil-CoA cetotransferase (SKT) foi maior em no final da estação de estiagem e início da estação chuvosa (Kruskal-Wallis X^2=27,115 P=0,001 Tukey P≤0,034). Ocorreu um aumento da atividade máxima da β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) no final da estação de estiagem (Anova F=36,026 P<0,001 Tukey P≤0,015).

No tecido hepático de *P. diplolistris* a atividade máxima da CS se manteve constante ao logo das estações (Kruskal-Wallis=4,491 P=0,213) e a atividade da HOAD foi similar durante as quatro fases (Anova F=0,6018 P=0,608). A atividade da PK foi maior no final da estação chuvosa quando comparada ao início desta estação (IEC) e às fases da estação seca (Kruskal-Wallis X^2=17,603 P<0,001 Tukey≤0,018). A atividade máxima da LDH foi maior no final da estação chuvosa (Anova F=7,785 P<0,001 Tukey=0,001). A atividade máxima da SKT foi maior no meio da estiagem em (Anova F=33,612 P<0,001 Tukey P=0,001) e a atividade

máxima da HBDH foi maior no final da estiagem (Anova F=13,946 P<0,001 Tukey P<0,001).

No tecido cardíaco de *Pleurodema diplolistris* a atividade máxima da CS foi maior no início e final da estação chuvosa (Kruskal-Wallis X^2=20,349 P<0,001 Tukey≤0,017), a atividade máxima da HOAD não variou ao longo das estações (Anova F=2,034 P=0,126) e a atividade máxima da PK foi maior no final da estação seca em comparação ao meio da estação de estiagem (Anova F=4,437 P=0,009 Tukey P=0,006). A atividade máxima da LDH não apresentou mudanças no músculo cardíaco ao longo das estações (Anova F=2,173 P=0,108), assim como a atividade máxima da SKT (Anova F=1,215 P=0,318). A atividade máxima da HBDH foi menor no meio da estiagem (Kruskal-Wallis X^2=19,791 P<0,001 Tukey≤0,041).

Tabela 3. Atividade máxima (U/g de tecido úmido) das enzimas citrato sintase (CS), β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), succinil-CoA cetotransferase (SKT) e β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) na musculatura dos membros posteriores, tecido hepático e músculo cardíaco de *Pleurodema diplolistris* coletados no início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). Os valores representam a média ± desvio padrão para um grupo de 10 espécimes.

Pleurodema diplolistris		***Fase anual***			
		Estação chuvosa		**Estação seca**	
Enzima	**Tecido**	**IEC**	**FEC**	**MES**	**FES**
CS	Músculo	7,74 ± 2,77[a]	5,48 ± 1,24[b]	3,27 ± 1,51[c]	3,00 ± 1,42[c]
	Fígado	1,73 ± 1,18[a]	1,57 ± 0,66[a]	1,00 ± 0,42[a]	1,51 ± 0,60[a]
	Coração	2,39 ± 1,27[a]	3,30 ± 1,76[a,b]	1,72 ± 0,50[a,c]	1,10 ± 0,34[a,c]
HOAD	Músculo	10,75 ±1,76[a]	5,88 ± 2,34[b]	5,39 ± 1,22[b]	6,72 ± 1,47[b]
	Fígado	7,79 ± 1,61[a]	8,21 ± 2,04[a]	7,24 ± 1,56[a]	7,31 ± 2,04[a]
	Coração	4,60 ± 2,25[a]	3,91 ± 1,68[a]	3,97 ± 1,69[a]	2,71 ± 1,20[a]
PK	Músculo	66,52 ±20,53[a]	55,24 ± 9,50[a]	73,15 ± 12,71[a]	55,17 ± 18,58[a]
	Fígado	13,31 ± 5,89[a]	18,79 ± 3042[b]	9,58 ± 1,86[a,c]	9,52 ± 3,50[a,c]
	Coração	25,15 ± 6,80[a,c]	17,95 ± 7,72[a]	15,30 ± 3,77[a,b]	19,88 ± 6,05[a]
LHD	Músculo	420,05 ± 159,13[a]	421,77 ± 65,09[a]	401,74 ± 85,27[a]	271,90 ± 65,48[b]
	Fígado	26,35 ± 6,2[a,b]	30,58 ± 3,5[a]	22,57 ± 2,78[b]	22,74 ± 3,82[b]
	Coração	46,05 ± 21,91[a]	31,42 ± 13,59[a]	46,88 ± 19,28[a]	34,00 ± 12,10[a]
SKT	Músculo	0,92 ± 0,20[a]	0,23 ± 0,11[b]	0,20 ± 0,08[b]	0,60 ± 0,27[c]
	Fígado	0,38 ± 0,11[a]	0,25 ± 0,10[b]	0,58 ± 0,11[c]	0,18 ± 0,05[b]
	Coração	0,73 ± 0,44[a]	1,02 ± 0,52[a]	0,88 ± 0,34[a]	0,72 ± 0,30[a]
HBDH	Músculo	1,38 ± 0,84[a]	1,80 ± 0,68[a]	1,71 ± 0,88[a]	3,05 ± 1,06[b]
	Fígado	0,42 ± 0,15[a]	0,40 ± 0,19[a]	0,32 ± 0,14[a]	0,82 ± 0,25[b]
	Coração	1,66 ± 0,40[a]	1,89 ± 0,69[a]	1,02 ± 0,23[b]	2,27 ± 0,61[a]

Tabela 4. Tendências significativas da atividade máxima (U/g de tecido úmido) das enzimas citrato sintase (CS) e β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD) na musculatura dos membros posteriores, tecido hepático e músculo cardíaco de *Pleurodema diplolistris, Proceratophrys cristiceps* e *Physalaemus* coletados no início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). As setas voltadas para cima indicam aumento da atividade máxima da enzima, as setas para baixo indicam a redução da atividade máxima, as setas mais escuras indicam aumento superior ao observado na mesma estação.

Metabolismo aeróbio			***Fase anual***			
			Estação chuvosa		**Estação seca**	
Tecido	**Enzima**	**Animal**	**IEC**	**FEC**	**MES**	**FES**
Músculo	CS	*P. diplolistris*	↑	↑	↓	↓
		Physalaemus	↑	↑	↓	↓
		P. cristiceps	↑	↑	↓	↓
Fígado	CS	*Physalaemus*	↑	↑	→	↓
Coração	CS	*P. diplolistris*	→	↑	↓	↓
		Physalaemus	↑	↑	↓	→
		P. cristiceps	↑	↑	↓	↓
Músculo	HOAD	*P. diplolistris*	↑	↓	↓	↓
		Physalaemus	↑	↑	↓	↓
		P. cristiceps	↑	↓	↓	→
Fígado	HOAD	*Physalaemus*	↓	↓	↑	↑
		P. cristiceps	↓	→	→	↑
Coração	HOAD	*P. cristiceps*	↑	↓	↓	→

Physalaemus albifrons

Em *Physalaemus* (Tabela 5, para tendências observar Tabela 6) a atividade máxima (U/g de tecido úmido) da citrato sintase (CS) foi maior no início e final da estação de chuvas (Kruskal-Wallis X^2=29,298 P<0,001 Tukey P≤0,001), assim como a atividade máxima da HOAD (Anova F=15,719 P<0,001 Tukey P≤0,007). A atividade máxima da piruvato quinase (PK) nos músculos dos membros posteriores não variou ao longo das estações (Anova F=0,551 P=0,651) e a atividade máxima da lactado desidrogenase (LDH) reduziu no início e final da estação chuvosa (Anova F=9,638 P<0,001 Tukey P≤0,022). Ocorreu um aumento da atividade máxima da succinil-CoA cetotransferase (SKT) no início da estação de chuvas e meio da estiagem (Kruskal-Wallis X^2=29,097 P=0,001 Tukey P≤0,001) e não foram observadas mudanças ao longo das estações na atividade máxima da β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) na musculatura dos membros posteriores de *Physalaemus* (Kruskal-Wallis X^2=3,789 P=0,285).

No tecido hepático de *Physalaemus* a atividade máxima da CS foi maior no final da estação chuvosa (ANOVA F=7,982 P<0,001 Tukey P≤0,016) quando comparado as estações de estiagem e a atividade da HOAD foi menor no início da estação chuvosa quando comparada ao final da estação seca (ANOVA F=23,345 P<0,001 Tukey P≤0,017). A atividade da PK foi maior nas estações de chuva quando comparada as estações de seca (Anova F=13,85 P<0,001 Tukey<0,001) e a atividade máxima da LDH foi maior no final da estação chuvosa (Anova F=15,446 P>0,001 Tukey P=0,006). A atividade máxima da SKT foi maior no início da estação de chuvas (Kruskal-Wallis X^2=30,145 P<0,001 Tukey≤0,015) e a atividade máxima da HBDH foi maior no final da estiagem (Kruskal-Wallis X^2=21,744 P<0,001 Tukey=0,018).

No coração de *Physalaemus* a atividade máxima da CS foi maior no início e final as estação chuvosa (Kruskal-Wallis X^2=16,696 P<0,001 Tukey≤0,009). A atividade máxima da HOAD não variou ao longo das estações (Anova F=0,166 P=0,919), assim como a atividade máxima da PK (Kruskal-Wallis X^2=3,990 P=0,263) e da LDH (Anova F=1,961 P=0,137). A atividade máxima da SKT foi maior no início da estação chuvosa quando comparada ao final da estação de chuvas (Anova F=3,542 P=0,024 Tukey P=0,027) e a atividade máxima da HBDH foi menor no meio da estiagem (Kruskal-Wallis X^2=10,747 P=0,013 Tukey≤0,002).

Tabela 5. Atividade máxima (U/g de tecido úmido) das enzimas citrato sintase (CS), β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), succinil-CoA cetotransferase (SKT) e β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) na musculatura dos membros posteriores, tecido hepático e músculo cardíaco de *Physalaemus* coletados no início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). Os valores representam a média ± desvio padrão para um grupo de 10 espécimes.

Physalaemus		***Fase anual***			
		Estação chuvosa		**Estação seca**	
Enzima	**Tecido**	**IEC**	**FEC**	**MES**	**FES**
	Músculo	9,25 ± 4,14[a]	9,61 ± 2,44[a]	1,51 ± 0,46[b]	1,44 ± 0,25[b]
CS	Fígado	3,14 ± 1,53[a]	3,49 ± 1,03[a]	1,95 ± 1,02[a,b]	1,44 ± 0,51[b]
	Coração	3,58 ± 2,01[a]	3,59 ± 2,16[a]	1,27 ± 0,57[b]	1,88 ± 0,44[a,b]
	Músculo	9,67 ± 2,67[a]	9,31 ± 1,50[a]	4,80 ± 1,66[b]	6,37 ± 1,38[b]
HOAD	Fígado	6,48 ± 2,59[a]	6,09 ± 1,56[a]	9,67 ± 2,25[b]	13,58 ± 2,55[c]
	Coração	4,20 ± 1,67[a]	3,74 ± 1,27[a]	3,95 ± 1,18[a]	4,00 ± 1,65[a]
	Músculo	63,23 ± 8,48[a]	67,03 ± 9,77[a]	68,76 ± 12,28[a]	66,48 ± 8,28[a]
PK	Fígado	15,53 ± 2,82[a]	15,46 ± 4,64[a]	8,29 ± 1,83[b]	9,22 ± 3,37[b]
	Coração	18,00 ± 4,32[a]	16,49 ± 3,88[a]	23,24 ± 8,58[a]	19,71 ± 5,63[a]
	Músculo	340,79 ± 86,11[a]	355,25 ± 46,68[a]	535,45 ± 132,71[b]	489,74 ± 108,86[b]
LHD	Fígado	21,86 ± 4,53[a]	30,15 ± 3,75[b]	24,26 ± 3,29[a]	31,57 ± 3,23[b]
	Coração	51,20 ± 18,26[a]	60,04 ± 18,73[a]	43,34 ± 21,20[a]	62,29 ± 20,16[a]
	Músculo	1,11 ± 0,23[a]	0,28 ± 0,14[b]	0,68 ± 0,67[b]	0,24 ± 0,10[b]
SKT	Fígado	0,62 ± 0,18[a]	0,25 ± 0,10[b]	0,43 ± 0,13[c]	0,14 ± 0,07[b]
	Coração	1,10 ± 0,51[a]	0,65 ± 0,29[b]	1,02 ± 0,23[a,b]	0,82 ± 0,28[a,b]
	Músculo	2,64 ± 1,17[a]	1,74 ± 0,55[a]	1,89 ± 0,74[a]	1,92 ± 0,54[a]
HBDH	Fígado	0,25 ± 0,10[a]	0,21 ± 0,07[a]	0,62 ± 0,34[b]	0,92 ± 0,39[b]
	Coração	1,52 ± 0,55[a]	1,63 ± 0,47[a]	1,10 ± 0,30[a,b]	2,07 ± 0,78[a,c]

Tabela 6. Tendências significativas da atividade máxima (U/g de tecido úmido) das enzimas piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) na musculatura dos membros posteriores, tecido hepático e músculo cardíaco de *Pleurodema diplolistris, Proceratophrys cristiceps* e *Physalaemus* coletados no início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). As setas voltadas para cima indicam aumento da atividade máxima da enzima, as setas para baixo indicam a redução da atividade máxima, as setas mais escuras indicam aumento superior ao observado na mesma estação.

Metabolismo glicolítico			***Fase anual***			
			Estação chuvosa		**Estação seca**	
Tecido	**Enzima**	**Animal**	**IEC**	**FEC**	**MES**	**FES**
Músculo	PK	*P. cristiceps*	↓	↑	↑	↑
Fígado	PK	*P. diplolistris*	↑	**↑**	↓	↓
		Physalaemus	↑	↑	↓	↓
Coração	PK	*P. diplolistris*	↑	←	↓	→
		P. cristiceps	↑	↓	↑	→
Músculo	LHD	*P. diplolistris*	↑	↑	↑	↓
		Physalaemus	↓	↓	↑	↑
Fígado	LDH	*P. diplolistris*	→	↑	↓	↓
		Physalaemus	↓	↑	↓	↑
Coração	LHD	*P. cristiceps*	↑	↓	↓	↓

Proceratophrys cristiceps

Em *P. cristiceps* (Tabela 7, para tendências observar Tabela 8) a musculatura dos membros posteriores apresentou um aumento da atividade máxima da citrato sintase (CS) no início da estação chuvosa (Anova F=21,664 P<0,001 Tukey P≤0,023), assim como a atividade máxima da HOAD (Anova F=24,404 P<0,001 Tukey P≤0,0,046). Houve uma redução na atividade máxima da piruvato quinase (PK) no início da estação chuvosa (Kruskal-Wallis X^2=17,223 P=0,001 Tukey P≤0,010) e não houve mudança na atividade máxima da lactado desidrogenase (Anova F=0,465 P=0,709) e da β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) na musculatura dos membros posteriores (Kruskal-Wallis X^2=5,147 P=0,161). A atividade máxima da succinil-CoA cetotransferase (SKT) foi maior no final da estiagem e início da estação chuvosa, ocorrendo também um aumento no meio da estiagem (Anova F=15,582 P<0,001 Tukey P≤0,040).

No tecido hepático de *P. cristiceps* a atividade máxima da CS se manteve constante ao logo das estações (Kruskal-Wallis X^2=3,701 P=0,296) e a atividade da HOAD foi menor no início da estação chuvosa quando comparada ao final da estação seca (ANOVA F=4,864 P<0,006 Tukey P=0,003). Não ocorreram mudanças nas atividades máximas da PK (Anova F=1,501 P=0,231) e LDH (Anova F=0,577 P=0,634) ao longo das estações. A atividade máxima da SKT foi maior no final da estação chuvosa (Anova F=18,492 P<0,001 Tukey P<0,001) e a atividade máxima da HBDH foi maior no meio e final da estação seca (Anova F=6,064 P=0,002 Tukey P≤0,045).

Na musculatura cardíaca de *P. cristiceps* a atividade máxima da CS foi maior no início e final as estação chuvosa (Kruskal-Wallis X^2=19,704 P<0,001 Tukey≤0,016). A atividade máxima da HOAD foi maior no início da estação chuvosa

(Anova F=4,007 P=0,015 Tukey P≤0,014). A atividade máxima da PK aumentou no início da estação chuvosa e meio da estação seca (Anova F=8,180 P<0,001 Tukey P≤0,002), assim como a atividade máxima da SKT (Kruskal-Wallis X^2=19,622 P<0,001 Tukey≤0,005). A atividade máxima da LDH apresentou um aumento no início da estação chuvosa (Kruskal-Wallis X^2=13,128 P=0,004 Tukey≤0,005) e a atividade máxima da HBDH não foi alterada ao longo das estações (Anova F=1,507 P=0,229).

Tabela 7. Atividade máxima (U/g de tecido úmido) das enzimas citrato sintase (CS), β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), succinil-CoA cetotransferase (SKT) e β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) na musculatura dos membros posteriores, tecido hepático e músculo cardíaco de *Proceratophrys cristiceps* coletados no início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). Os valores representam a média ± desvio padrão para um grupo de 10 espécimes.

Proceratophrys cristiceps		***Fase anual***			
		Estação chuvosa		**Estação seca**	
Enzima	**Tecido**	**IEC**	**FEC**	**MES**	**FES**
CS	Músculo	5,29 ± 1,25[a]	3,66 ± 1,04[b]	2,38 ± 0,84[c]	2,33 ± 0,48[c]
	Fígado	1,29 ± 0,49[a]	1,23 ± 0,87[a]	0,92 ± 0,27[a]	1,06 ± 0,37[a]
	Coração	2,95 ± 1,35[a]	3,48 ± 1,87[a,c]	1,23 ± 0,33[b]	1,68 ± 0,63[a,b]
HOAD	Músculo	9,97 ± 1,14[a]	5,93 ± 1,83[b]	5,27 ± 0,94[b]	6,89 ± 1,25[b,c]
	Fígado	5,48 ± 2,37[a]	7,94 ± 1,55[a,b]	7,54 ± 1,84[a]	9,12 ± 2,74[b]
	Coração	7,22 ± 2,43[a]	4,17 ± 2,08[b]	4,71 ± 1,38[b]	5,76 ± 2,42[a,b]
PK	Músculo	40,47 ± 10,50[a]	73,85 ± 21,50[b]	63,71 ± 6,52[b]	62,60 ± 15,95[b]
	Fígado	8,79 ± 6,34[a]	11,47 ± 3,01[a]	9,65 ± 3,86 [a]	8,61 ± 2,89[a]
	Coração	31,19 ± 9,30[a]	16,85 ± 4,87[b]	32,49 ± 9,99[a]	24,29 ± 6,59[a,b]
LHD	Músculo	317,71 ± 61,72[a]	346,31 ± 79,68[a]	353,12 ± 43,15[a]	342,30 ± 91,97[a]
	Fígado	22,62 ± 2,56[a]	20,93 ± 4,20[a]	22,50 ± 3,76[a]	22,34 ± 2,10[a]
	Coração	52,31 ± 21,68[a]	25,74 ± 7,92[b]	28,69 ± 13,04[b]	26,49 ± 12,54[b]
SKT	Músculo	0,69 ± 0,23[a]	0,26 ± 0,13[b]	0,48 ± 0,19[a,c]	0,75 ± 0,15[a,c]
	Fígado	0,24 ± 0,06[a]	0,50 ± 0,15[b]	0,29 ± 0,08[a]	0,20 ± 0,07[a]
	Coração	0,41 ± 0,24[a]	0,89 ± 0,37[b]	0,36 ± 0,13[a]	0,82 ± 0,23[b]
HBDH	Músculo	3,59 ± 1,85[a]	2,13 ± 1,10[a]	2,55 ± 1,69[a]	2,11 ± 0,60[a]
	Fígado	0,53 ± 0,18[a]	0,42 ± 0,20[a]	0,81 ± 0,26[b,c]	0,71 ± 0,25[a,c]
	Coração	2,01 ± 0,94[a]	1,98 ± 0,76[a]	2,68 ± 0,74[a]	2,16 ± 0,90[a]

Tabela 8. Tendências significativas da atividade máxima (U/g de tecido úmido) das enzimas β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) e succinil-CoA-cetotranferase (SKT) na musculatura dos membros posteriores, tecido hepático e músculo cardíaco de *Pleurodema diplolistris, Proceratophrys cristiceps* e *Physalaemus* coletados no início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). As setas voltadas para cima indicam aumento da atividade máxima da enzima, as setas para baixo indicam a redução da atividade máxima, as setas mais escuras indicam aumento superior ao observado na mesma estação.

Metabolismo cetônico			***Fase anual***			
			Estação chuvosa		**Estação seca**	
Tecido	**Enzima**	**Animal**	**IEC**	**FEC**	**MES**	**FES**
Músculo	SKT	*P. diplolistris*	↑	↓	↓	↑
		Physalaemus	↑	↓	↓	↓
		P. cristiceps	↑	↓	→	→
Fígado	SKT	*P. diplolistris*	↑	↓	↑	↓
		Physalaemus	↑	↓	↑	↓
		P. cristiceps	↓	↑	↓	↓
Coração	SKT	*Physalaemus*	↑	↓	→	→
		P. cristiceps	↓	↑	↓	↑
Músculo	HBDH	*P. diplolistris*	↓	↓	↓	↑
Fígado	HBDH	*P. diplolistris*	↓	↓	↓	↑
		Physalaemus	↓	↓	↑	↑
		P. cristiceps	↓	↓	↑	↑
Coração	HBDH	*P. diplolistris*	↑	↑	↓	↑
		Physalaemus	→	→	↓	↑

7.9. Concentração de Proteínas Solúveis

A concentração de proteína solúvel (Figura 9) na musculatura dos membros posteriores de *P. diplolistris* foi menor no início e final da estação chuvosa (Kruskal Wallis X^2=13,428 p=0,004 Tukey P≤0,019). Em *Physalaemus* não houve variação ao longo das estações (Anova F=0,545 P=0,655) e em *P. cristiceps* (Kruskal Wallis X^2=32,719 P>0,001 Tukey P<0,001) foi maior no final da estação seca quando comparada as outras estações observadas. No tecido hepático de *P. diplolistris* a concentração de proteína solúvel foi menor no final da estação seca em comparação ao final da estação chuvosa (Kruskal Wallis X^2=11,975 P=0,007 Tukey P=0,023). Nos espécimes de *Physalaemus* a concentração foi menor no meio e final da estação seca (Anova F=4,671 P=0,007 Tukey≤0,028). Já em *P. cristiceps* a concentração foi menor no final da estação chuvosa (Anova F=6,916 P=0,001 Tukey P≤0,027).

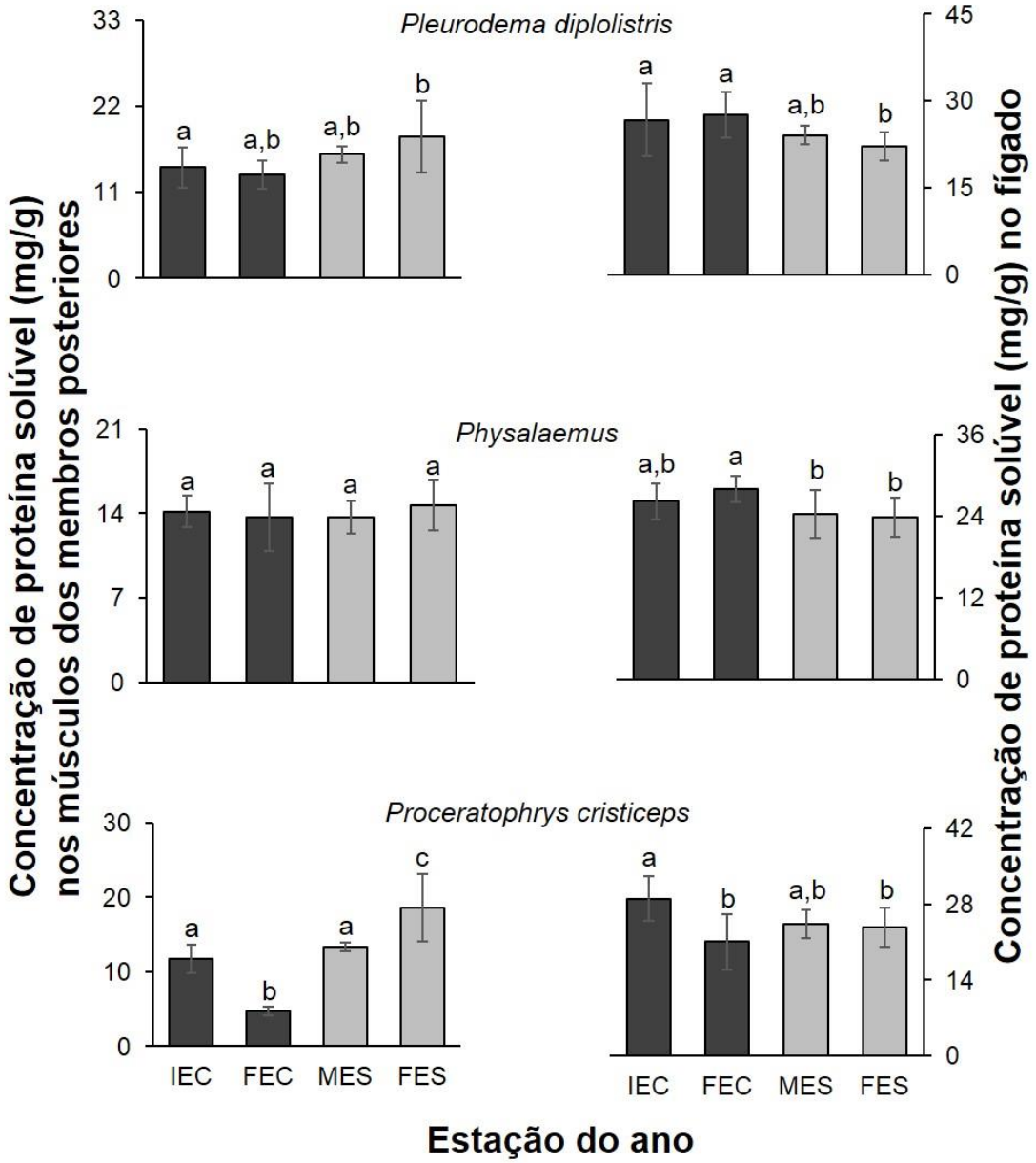

Figura 9. Concentração de proteína solúvel (mg/g) no músculo dos membros posteriores e no fígado de *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae), *Physalaemus* (Leiuperidae) e *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae). Em quatro estações do ano: início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). As letras diferentes representam valores significativamente diferentes entre a mesma espécie nas estações amostradas, as figuras representam a média e desvio padrão de medidas realizadas com 10 animais de cada espécie.

7.10. Concentração de Glicogênio

A concentração de glicogênio (Figura 10) foi reduzida na musculatura dos membros posteriores de *P. diplolistris* no final da estação seca e no final da estação chuvosa (Kruskal Wallis X^2=10,887 P=0,012 Tukey P≤0,05). Contudo, no fígado não foram observadas mudanças ao longo das estações (Anova F=0,677 P=0,572) e o mesmo foi observado no tecido hepático de *Physalaemus* (Anova=0,165 P=0,919) e *P. cristiceps* (Anova F=0,133 P=0,940). Na musculatura dos membros posteriores de *P. albifrons* a concentração foi maior no início da estação chuvosa, quando comparada ao final da estação (Anova F=3,632 P=0,022 Tukey P=0,029). Na musculatura dos membros posteriores de *P. cristiceps* foi observada uma redução durante o início da estação chuvosa quando comparado as outras estações (Anova F=5,430 P=0,003 Tukey P=0,002).

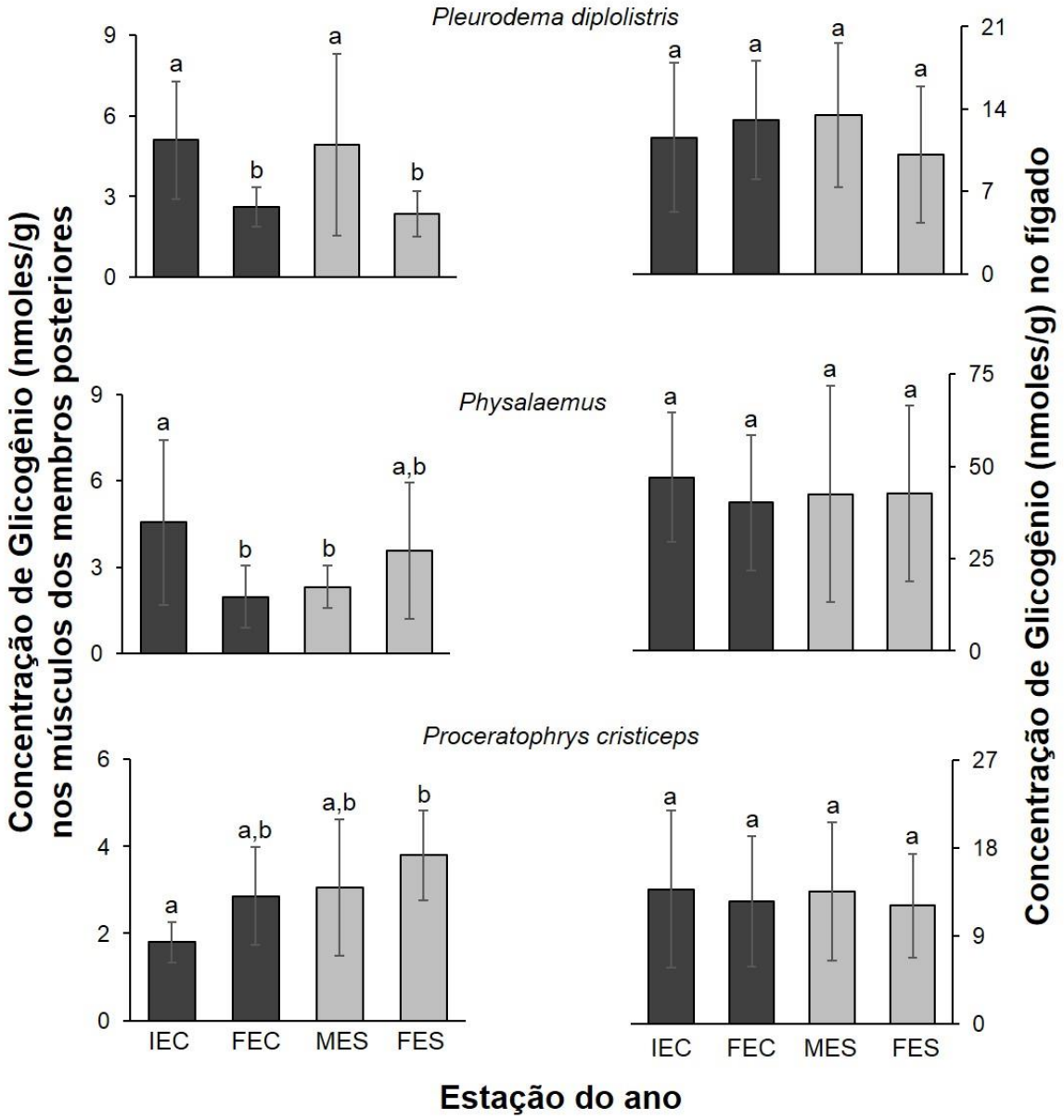

Figura 10. Concentração de glicogênio (nmoles/g) no músculo dos membros posteriores e fígado de *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae), *Physalaemus* (Leiuperidae) e *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae). Em quatro estações do ano: início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). As letras diferentes representam valores significativamente diferentes entre a mesma espécie nas estações amostradas (N=10), média e desvio padrão de medidas realizadas com 10 animais de cada espécie.

7.11. Concentração de Lipídeos Solúveis

A concentração de lipídeos solúveis (Figura 11) nos músculos dos membros posteriores foi menor no final da estação chuvosa em *P. diplolistris* (Kruskal Wallis X^2=16,623 P=0,001 Tukey P≤0,005) e *P. cristiceps* (Kruskal Wallis X^2=10,847 P=0,013 Tukey P=0,050). Em *Physalaemus* a musculatura apresentou uma concentração de lipídeos menor no início da estação chuvosa (Anova F=2,893 P=0,049 Tukey P=0,041).

No tecido hepático a concentração de lipídeos totais foi maior no final da estação chuvosa em *P. diplolistris* (Anova F=3,168 P 0,036 Tukey P=0,030) e *P. cristiceps* (Kruskal Wallis X^2=26,383 P<0,001 Tukey P<0,001). Em *Physalaemus* a concentração de lipídeos foi maior no meio de final da estação de estiagem (Kruskal Wallis X^2=15,139 P=0,002 Tukey P≤0,038).

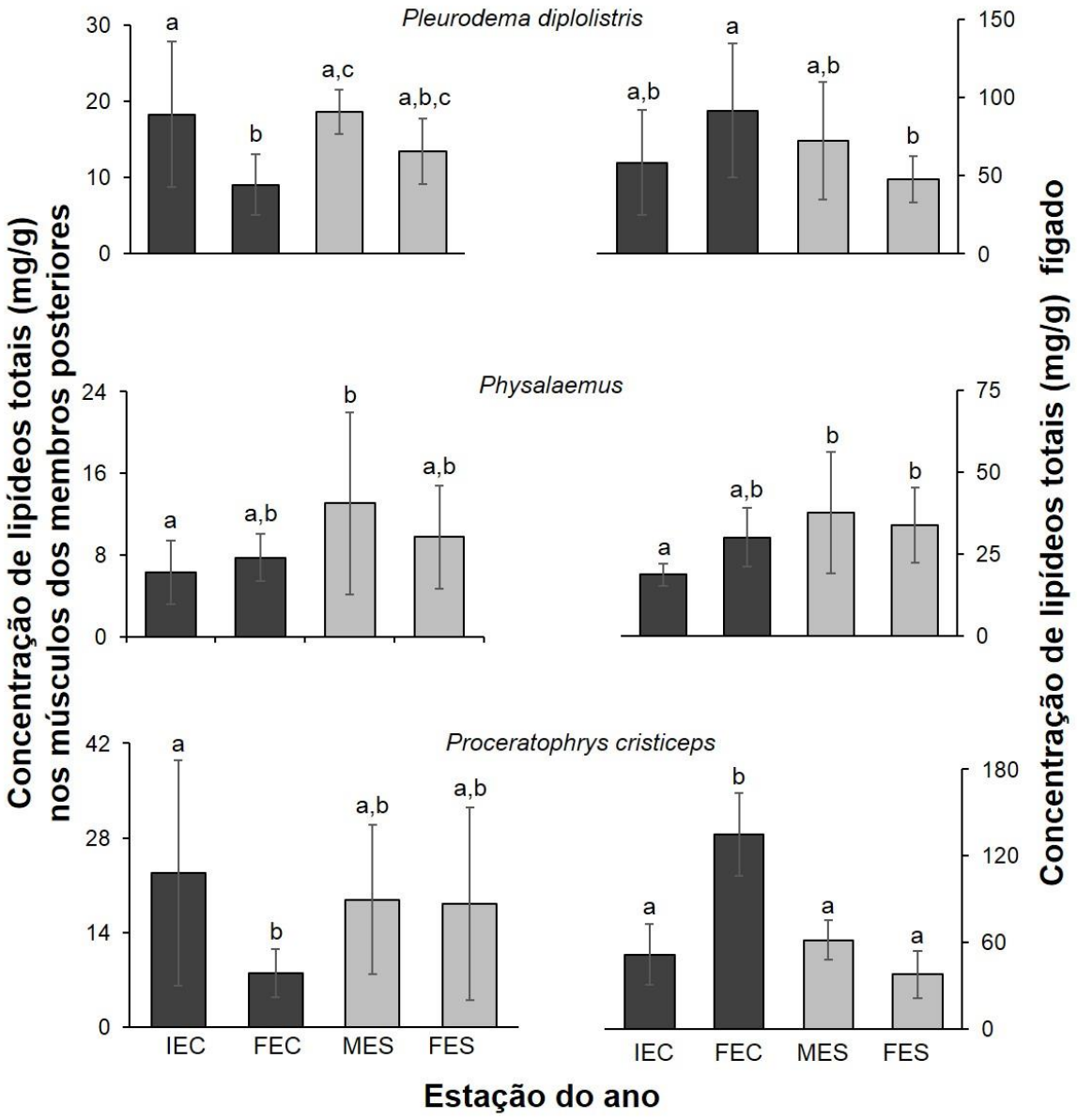

Figura 11. Concentração de lipídeos totais (mg/g) no músculo dos membros posteriores e fígado de *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae), *Physalaemus* (Leiuperidae) e *Proceratophrys cristiceps* (Cycloramphidae). Em quatro estações do ano: início da estação chuvosa (IEC), final da estação chuvosa (FEC), meio da estação seca (MES) e final da estação seca (FES). As letras diferentes representam valores significativamente diferentes entre a mesma espécie nas estações amostradas (N=10), média e desvio padrão de medidas realizadas com 10 animais de cada espécie.

8. DISCUSSÃO

8.1. Relações hídricas comportamentais

8.1.1. Durante a estiagem

A crescente profundidade em que *Pleurodema diplolistris* é encontrado ao longo dos meses após o final da estação chuvosa sugere uma movimentação vertical da espécie no solo ao longo da estiagem, juntamente com a redução da umidade presente no solo. Os sapos *P. diplolistris*, *P. albifrons* e *P. cristiceps* são encontrados enterrados no mesmo micro-habitat com temperatura média de 32°C e umidade relativa acima de 50% durante a estiagem.

A alta umidade encontrada no local pode facilitar a captação de água através da pele (SHOEMAKER, 1965), sendo relatado que a umidade do substrato é fundamental para o sucesso da hidratação realizada através da região pélvica dos animais (BALDWIN, 1974; DOLE, 1967). O que poderia inferir sobre a permanência dos animais em locais úmidos, como observado em *P. diplolistris* encontrados na Bahia, sob as dunas, que permanecem inativos durante toda a estação de seca, não sendo avistados em atividade na superfície (SOUSA; ÁVILA, 2015), permanecendo durante toda a estiagem em abrigados de elevadas temperaturas e baixa disponibilidade hídrica (SANTOS *et al.,* 2003).

A temperatura no substrato observado é constante, permanecendo em aproximadamente 32°C ao longo dos meses, diferentemente dos micro-habitats de *Scaphiopus hammondii*, nos quais a temperatura varia de 5 a 25°C ao longo da estiagem (RUIBAL *et al.,* 1969). Contudo, não é surpresa *P. diplolistris*, *P. albifrons* e *P. cristiceps* estarem enterrados em grandes profundidades, pois há relatos como para *Arenophyrne rotunda*, que chegam a 80 cm, ou até mesmo de sapos que foram encontrados constantemente a mais de 1 m de profundidade, como por exemplo,

sapos do gênero *Breviceps*, encontrados de 100 a 200 cm (POYNTON, 1964; ROSE, 1962).

É possível observar que algumas espécies que estivam são encontradas em diferentes profundidades quando as observações são realizadas em diferentes momentos, como *Arenophys* (TYLER *et al.,* 1980), *Breveceps* (MAYHEW, 1968), e *Scaphiopus* (MCCLANAHAN, 1967; RUIBAL *et al.,* 1969; SEYMOUR, 1973b), o que pode inferir sobre uma possível migração vertical, uma vez que estas espécies não formam casulos, o que poderia limitar a movimentação (RUIBAL & HILLMAN, 1981). Parece recorrente que anuros estivadores ocupam micro-habitats diferentes ao longo das estações. Por exemplo, no sapo *Scaphiopus couchii*, é observado uma mudança de micro-habitat ao longo das estações (MAYHEW, 1965). Já *Scaphiopus hammondii*, apesar de ser encontrado enterrado em solo arenoso em grandes profundidades durante a estivação, é encontrado em solo argiloso próximo a corpos de água na fase chuvosa (SEYMOUR, 1973b).

A caracterização do micro-habitat ao longo dos meses auxilia no entendimento da migração vertical que os animais exibem, sendo encontrados em profundidades maiores com o avanço dos meses de estiagem e atingindo profundidades próximas a 120 cm no ápice da estação seca na Caatinga, o que proporciona o contato das espécies com a umidade presente no solo. A hidratação alcançada por algumas espécies que permanecem em contato com o solo úmido é resultado do equilíbrio entre a perda e a absorção de água , uma vez que a perda hídrica irá variar em função de diversos fatores, entre eles a umidade relativa e a temperatura do substrato (TRACY, 1976). É possível especular ainda que o formato do corpo e a posição que são encontrados durante a estivação, contribua para a manutenção do balanço hídrico, proporcionando uma maior área de absorção

pélvica, pois esta região é mais vascularizada no corpo dos anuros (ROTH, 1973) e sapos de zonas áridas parecem absorver água mais rapidamente através de suas superfícies ventrais (TINGLEY *et al.,* 2012). Mais ainda, *P. diplolistris* possui o formato corpóreo globular, como os encontrados no deserto australiano, descritos como animais de forma arredondada e membros curtos (DAVIES & WITHERS, 1993). Agregando a isso, aparentemente espécies de ambientes áridos perdem menos água em comparação a espécies de ambientes úmidos (CANZIANI & CANNATA, 1980).

8.1.2. Durante a chuva

As espécies estudadas são encontradas em diferentes locais durante a fase de chuvas, apesar de serem encontrados no mesmo micro-habitat durante a estiagem. No decorrer da fase reprodutiva é possível encontrar *P. cristiceps* em regiões alagadas com vegetação rasteira e *P. diplolistris* e *P. albifrons* em corpos d´água formados entre rochas ou em pequenas cavidades no solo, muitas vezes distanciados. Entretanto, durante o forrageamento os sapos observados na Caatinga são encontrados no mesmo micro-habitat ao longo da estação chuvosa. Os espécimes de *P. cristiceps* são encontrados distanciados a cerca de 2 metros e coaxando em intervalos que não permitem que dois ou mais indivíduos sobreponham seu canto, sempre em meio a ramos vegetais totalmente cercados de água. Diferentemente, a espécie *P. diplolistris* é encontrada coaxando em corpos de água que variaram muito de tamanho, desde pequenas poças formadas por pegadas de equinos até grandes corpos de água permanentes, como açudes, por exemplo. Nesta espécie, os machos são encontrados agrupados em coros de 2 a 12 indivíduos com coaxos sobrepostos na maioria dos grupos observados. Os

indivíduos da espécie *Physalaemus* coaxam próximo a vegetação, em corpos d´água de diferentes tamanhos e alguns indivíduos são encontrados em grupos, porém menores que os da espécie *P. diplolistris*, diferente de estivadores típicos como os sapos do gênero S*caphiopus* que ocupam o mesmo corpo de água, mas em profundidades diferentes (BRAGG, 1950).

Na maioria dos espécimes de *P. diplolistris*, *P. albifrons* e *P. cristiceps* coletados no início da estação chuvosa não foi encontrado alimento no estomago e intestino, apenas animais coletados no final da estação chuvosa apresentam alimento no sistema digestório. É provável que *Physalaemus* tenha uma busca ativa por alimento, diferentemente de *P. diplolistris* e *P. cristiceps* que são encontrados aguardando a aproximação dos insetos durante a fase de forrageamento. Os sapos *Scaphiopus hammondii* alimentam-se imediatamente após a primeira chuva da estação (RUIBAL *et al.*, 1969). Distinto do encontrado para as espécies observadas neste trabalho, que são encontradas forrageando apenas após a reprodução, os sapos *S. hammondii* emergem com baixo índice pluviométrico e se alimentam, mesmo na ausência de poças para a reprodução (RUIBAL *et al.,* 1969).

Os espécimes de *P. diplolistris* e *Physalaemus* apresentaram um comportamento reprodutivo explosivo no início da estação chuvosa, assim como sapos *Ceratophrys cornuta* que emergem imediatamente após a primeira chuva (DUELLMAN & LIZANA, 1994), diferentemente sapos *P. cristiceps* exibem comportamento reprodutivo após aproximadamente o nível pluviométrico atingir 40 mm de chuvas, próximo ao observado em sapos *Cyclorana australis* que emergem dos seus abrigos apenas quando o índice pluviométrico atinge 50 mm, *(TRACY et al*., 2007).

8.2. Relações hídricas fisiológicas

8.2.1. Hematócrito

As espécies observadas no semiárido brasileiro, *P. cristiceps, P. albifrons* e *P. diplolistris* apresentam uma mudança peculiar no hematócrito, o que inclui uma redução durante fase de estiagem. Esta redução não é observada com frequência em outras espécies, tornando incomum o padrão exibido pelas três espécies observadas na Caatinga. Os típicos estivadores, sapos *Scaphiopus* que permanecem em locais próximos as raízes, onde provavelmente a umidade do solo é maior, não apresentam mudanças no hematócrito (SEYMOUR, 1973a).

Em alguns animais parece ocorrer uma relação entre o estado hídrico e o hematócrito, sendo frequentemente observado um aumento significativo no hematócrito quando expostos a mudanças hídricas (KONNO *et al*., 2005), o que é observado tanto em espécies aquáticas quanto terrestres, e essas costumam exibir valores maiores de hematócrito (GÜL *et al*., 2011). Em *Hyla arborea*, por exemplo, a média de 30% durante a fase de hidratação sobe para 65% durante a fase de desidratação (DEGANI & WARBURG, 1984) e em espécies de ambientes xéricos como *Pyxicephalus adspersus* também ocorre um aumento significativo do hematócrito durante a estivação (LOVERIDGE & WITHERS, 1981). Diferentemente, em *Ceratophrys ornata,* que também ocupa regiões áridas, não há mudança ao longo das estações (GROOM *et al.,* 2013), assim como *Rhinella marina,* uma espécie invasora, que mesmo vivendo sob a rígida sazonalidade do deserto australiano não apresenta mudanças no hematócrito (BROWN *et al.,* 2011). Há ainda espécies do mesmo gênero que submetidas as mesmas condições apresentam respostas diferentes, como *Lithobates catesbeianus* que mantem o

hematócrito durante a fase de hibernação e *Rana pipiens,* que apresenta um aumento significativo (STEWART *et al.,* 2012).

Uma possível inferência ao padrão observado nestes animais pode ser o grau de hidratação exibida durante a fase de estiagem, uma vez que a bexiga foi sempre encontrada com grande quantidade de água durante a estivação, em média o equivalente a 30% da massa corpórea. Assim, o padrão observado nos anuros da Caatinga pode inferir sobre um possível estado adequado de hidratação, visto que animais hidratados tendem a exibir redução do hematócrito.

8.2.2. Osmolaridade

A osmolaridade plasmática aumenta no final da estivação nas três espécies estudadas, o que é observado em várias espécies estivadoras, inclusive em estivadores típicos, como *Neobatrachus aquilonius* que apresenta um aumento significativo na osmolaridade plasmática durante a fase de estivação (CARTLEDGE *et al.*, 2006b), mas não tão alto como o aumento apresentado por *Ceratophrys ornata* quase três vezes maior durante a fase de estivação (GROOM *et al.,* 2013), e *Pyxicephalus adspersus*, que vive no deserto africano e apresenta um aumento de aproximadamente 50% da osmolaridade plasmática durante a estivação (LOVERIDGE & WITHERS, 1981). Nas três espécies da Caatinga é exibido algo similar ao que ocorre em *Scaphiopus couchii* e *Cyclorana australis* que apresentam aumento da osmolaridade plasmática durante a estiagem (REYNOLDS *et al*., 2011; RUIBAL *et al.,* 1969). É possível observar que mesmo com estratégias diferentes, como a formação de casulo, que reduz a perda de água, *Cyclorana australis*, exibe um aumento da osmolaridade plasmática durante a estivação.

O aumento na osmolaridade plasmática observado nas espécies do semiárido brasileiro é significativo, mas não tão expressivos quanto o observado no plasma de *Scaphiopus couchii* que exibe 810 mOsm/l após dois meses enterrado em solos com baixa umidade (MCCLANAHAN, 1972). Os valores observados no meio e final da estação seca estão mais próximos ao exibido por *Cyclorana australis*, com osmolalidade que atinge 314 mOms/kg após 5 meses de estivação (REYNOLDS *et al*., 2011). Em sapos *Physalaemus*, o aumento gradativo da osmolaridade ao longo das estações foi visto em *Cyclorana platycephala* (CARTLEDGE *et al.,* 2008). Outro padrão encontrado é a manutenção da osmolaridade plasmática durante a estivação, que foi observado durante o segundo e terceiro ano de estiagem em *Notaden nichollsi* e *Neobatrachus aquilonius*, que não apresentaram diferenças nos valores de atividade e estivação (CARTLEDGE *et al*., 2006b).

Outra espécie, típica do deserto norte americano, *Scaphiopus hammondii*, apresenta um aumento ao longo das estações, sendo o maior valor observado no final da estação seca (RUIBAL *et al.,* 1969). Em sapos *Scaphiopus couchi* ocorre uma variação na concentração de solutos ao longo da estiagem, não sendo exibido um aumento quando a disponibilidade de água no substrato é alta (RUIBAL *et al.,* 1969) e utilizam a água presente na bexiga urinaria, não exibindo alterações plasmáticas até que a água presente na bexiga tenha sido utilizada (MCCLANAHAN, 1967).

Os sapos *P. cristiceps* exibem um aumento da osmolaridade apenas no auge da estação seca, diferentemente de *Physalaemus* que apresenta um aumento progressivo ao longo das estações ou de *P. diplolistris* que exprime o aumento a

partir do meio da estação de estiagem. As três espécies, mesmo sob as mesmas condições microclimáticas mostram estratégicas diferentes ao longo das estações.

8.2.3. Ureia

Os valores na concentração plasmática de ureia exibidos pelas três espécies observadas no semiárido brasileiro é um pouco menor do que o observado em sapos *Pelobates syriacus* que se enterram e aumentam a concentração plasmática de ureia em valores próximos a 500 mOms/Kg durante a fase de estiagem (DEGANI *et al.*, 1983; DEGANI, 2015). Nos espécimes de *Physalaemus albifrons* o aumento na concentração de ureia plasmática é crescente em ao longo das estações, sendo o valor registrado no início da fase de hipometabolismo aproximadamente duas vezes maior e após seis meses, 5 vezes maior que os valores observados na fase de atividade. Assim, como os valores observados em outras espécies, como por exemplo, *Cyclorana platycephala* que mostra valores crescentes em medidas realizadas ao longo de 15 meses de estivação (CARTLEDGE *et al.,* WITHERS & BRADSHAW, 2008). Já *P. cristiceps* exibiu um aumento 6 vezes maior, porém, apenas seis meses após o início da estivação.

As espécies de ambientes áridos apresentam incrementos variando de 1.6 vezes, como em *Notaden nichollsi*, até 9 vezes, como *Neobatrachus aquilonius* (CARTLEDGE *et al.*, 2006b). O aumento na concentração de osmólitos contribuintes como Na^+, Cl^- e ureia é observado em *Hyla arborea* durante a desidratação (DEGANI & WARBURG, 1984) e também na maioria das espécies de ambientes desérticos que mantêm o equilíbrio com o micro-habitat através do acumulo de ureia e da mudança na osmolaridade plasmática (MCCLANAHAN, 1967, 1972; RUIBAL *et al.,* 1969; SHOEMAKER *et al.,* 1969). A perda de água

corpórea por evaporação pode aumentar a osmolaridade se o animal não exibir meios de alterar o seu conteúdo de solutos (SHOEMAKER, 1964).

O incremento de ureia pode aumentar o potencial hídrico do plasma e com isso um gradiente osmótico favorável é mantido com o solo, sendo possível assim manter a hidratação dos animais (JONES, 1980; MCCLANAHAN, 1972). É provável que em solos com maior quantidade de água disponível o aumento na concentração de ureia plasmática seja menor quando comparado ao aumento encontrado em animais presentes em solos com mais água disponível. Isto é o que podemos observar *P. albifrons*, pois com o passar dos meses durante a estivação a concentração plasmática de ureia aumenta gradativamente, acompanhando a redução na umidade do solo ao longo dos meses após o final da estação chuvosa. Possivelmente, *P albifrons* migre verticalmente no substrato úmido mais ativamente que *P. diplolistris*, que aumenta a concentração no início da estiagem e permanece com valores altos até o final da estivação.

8.2.4. Papel da bexiga urinária

A concentração de ureia na urina, assim como a osmolaridade possui valores diferentes para cada uma das espécies observadas no semiárido brasileiro, com a ressalva de tratar-se de dados de uma única estação, o final da estação seca. Em típicos estivadores é esperado um valor menor durante a fase de atividade dos animais, assim como o padrão observado em *Cyclorana australis* e *Scaphiopus couchii* (MCCLANAHAN, 1972; REYNOLDS *et al*., 2011). Contudo, como a Caatinga é um ambiente peculiar podemos encontrar um padrão diferente, como foi observado em outro sapo estivador, *Notaden nichollsi* (CARTLEDGE *et al*.,

2006b) que apresentou uma redução na concentração de ureia na urina no final da estivação, diferente do observado em outras espécies.

Durante a estiagem os sapos *P. cristiceps*, chegam a perder 30% da massa corpórea após ter a bexiga esvaziada, o que não é insólito, pois o armazenamento de água na bexiga por sapos *Scaphiopus couchii* pode chegar a 60% da massa corpórea (SHOEMAKER *et al.,* 1969), sendo documentada a absorção desta água durante a fase de estivação (MCCLANAHAN, 1967). Entretendo, durante o início da estação chuvosa, fase na qual as espécies estudadas estão em atividade, não há urina suficiente na bexiga para ser extraída. Possivelmente devido ao contato direto das espécies com a água, uma vez que durante esta fase as espécies são encontradas em áreas alagadas ou com muita umidade. A bexiga urinária tem um papel importante na osmorregulação plasmática, enquanto a osmolaridade da urina varia consideravelmente a osmolaridade plasmática costuma exibir uma baixa variação (KATZ *et al*., 1986). A água presente na bexiga funciona como reservatório de água durante fases de seca e tolerância a alta concentração de ureia nos fluidos corpóreos (JØRGENSEN, 1997b) podendo ser utilizada durante a desidratação para a manutenção da concentração de solutos no plasma, como sódio e ureia por exemplo (REYNOLDS & CHRISTIAN, 2009; SHOEMAKER, 1964).

Finalmente, diferentes mecanismos para a manutenção do balanço hídrico são encontrados durante a estivação em anfíbios do semiárido, e tais mecanismos diversos são evidentes mesmo em anfíbios sintópicos da Caatinga. Entre as espécies estudadas é possível notar diferenças sutis no tegumento das espécies, como por exemplo, *P. diplolistris* com responsividade maior e tegumento ventral menos espesso e mais vascularizado, exibe maior osmolaridade plasmática no meio da estiagem, diferente de *P. albifrons* e *P. cristiceps* que mostram este

aumento da osmolaridade apenas no final da estação seca. Mais ainda, *Physalaemus* que não apresenta um grau de resposividade tão alto quanto *P. diplolistris*, porém maior que *P. cristiceps*, exibe um aumento gradual da osmolaridade ao longo das estações, exibindo medidas osmóticas medianas. Já o tegumento dos sapos *P. cristiceps* aparentam uma espessura maior, em comparações preliminares com as outras espécies estudadas. Possivelmente, características deste tegumento permitem a perda mínima de água pela espécie e assim sendo, podem manter o balanço hídrico sem aumentar drasticamente a osmolaridade plasmática.

Para enfrentar o estresse hídrico os anfíbios usualmente alteram a permeabilidade do tegumento, alterando a permeabilidades e permitindo uma perda mínima através da evaporação ou alterando as concentrações osmóticas (KATZ, 1989), como observado em *Physalaemus* e *P. diplolistris,* que exibem concentrações maiores de solutos, como ureia, no meio da estiagem. Neste momento é possível apenas especular sobre o padrão deste soluto na urina, que geralmente é hipo ou isosmótico em relação ao plasma (WELLS, 2001), como visto em *P. cristiceps*, com a urina hiposmótico em relação ao plasma e isosmótico em *Physalaemus* e *P. diplolistris*.

8.3. Desempenho locomotor

Em sapos *P. diplolistris*, que se locomoveram mesmo quando retirados dos abrigos no auge da estação seca e abrirem os olhos imediatamente, contrastando com *P. cristiceps*, que se mostram menos responsivos, levando alguns minutos para a abertura completa dos olhos. Mais ainda, este contraste também é observado na velocidade, que é reduzida diferentemente nas duas espécies

durante a estivação, sendo a redução em *P. diplolistris* de aproximadamente 50% e em *P. cristiceps* de 87%. Outra observação interessante, é que mesmo se mostrando mais responsivo que *P. cristiceps, Physalaemus albifrons* exibe uma redução de 83% na velocidade durante a estivação. As três espécies mesmo ocupando o mesmo micro-habitat durante a estivação apresentaram diferentes graus de reponsividade, e isto é refletido na velocidade durante a estivação que é reduzida diferentemente para cada uma das espécies estudadas.

É sabido que o prolongado período de inatividade pode comprometer o tecido muscular, causando atrofia (BOOTH, 1982; HUDSON *et al*., 2007; JAMES, 2010). Contudo, em sapos que formam casulos, permanecendo aparentemente imóveis dentro da cobertura formada por várias camadas de pele depositadas gradativamente ao longo do tempo de inatividade (LEE & MERCER, 1967), a musculatura esquelética é preservada, ao menos durante os três primeiros meses de estivação, como é observado em *Cyclorana alboguttata* (HUDSON & FRANKLIN, 2002a). Mais ainda, a velocidade de locomoção dessa espécie durante a fase de estivação não é alterada, comparada à locomoção em atividade (HUDSON & FRANKLIN, 2002a). Entretanto, muitas espécies estivadoras apresentam uma responsividade menor quando estimuladas durante a fase de estiagem, como por exemplo, sapos *Scaphiopus couchii* que respondem a estímulos, mas a abertura dos olhos ocorre somente após 15 a 30 minutos da saída do estado de torpor, quando finalmente os animais se tornam completamente alertas (MCCLANAHAN, 1967).

O tempo de responsividade nas espécies observadas no semiárido é menor do que o reportado para espécies estivadoras, como *S. couchii*. Contudo, entre as espécies estudadas na Caatinga há uma variabilidade, na qual é possível notar que

a espécie mais responsiva, *P. diplilistris*, apresenta uma diferença menor na velocidade medida durante a estação de chuva e de seca e *P. cristiceps* exibe a maior diferença de velocidade entre as espécies.

8.4. Consumo de oxigênio

As três espécies apresentam diferentes graus de responsividade, porém a redução na taxa metabólica durante o repouso é similar para as três espécies, que aparentemente reduzem o metabolismo em aproximadamente 50% durante a fase de estiagem. Essas reduções são relativamente inferiores a da maioria dos reportes para outros anuros estivadores típicos que têm sido estudados, que chegam a quase 85% de depressão do metabolismo (GUPPY *et al.,* 1994; GUPPY & WITHERS, 1999; HAND & HARDEWIG, 1996; STOREY, 2002). Ainda assim, a depressão do metabolismo aeróbio apresenta grande elasticidade entre os anuros estivadores podendo variar de 16% em *Pyxicephalus adspersus* (SECOR, 2005) a 85% em *Neobatrachus* (WITHERS, 1993). Em *P. diplolistris*, a redução do metabolismo é de aproximadamente 50% durante a estiagem.

Em *P. diplolistris* o alto escopo metabólico tanto durante a atividade quanto a estação de estiagem pode indicar que está espécie se mantém sempre apta a realizar tarefas suportadas aerobicamente, uma vez que esta medida muitas vezes é utilizada para inferir a habilidade de desempenhar atividades suportadas aerobicamente (SEYMOUR, 1973c) e tal como acontece com forrageamento ativo, cavar é uma atividade que envolve um amplo recurso do metabolismo aeróbio (TAIGEN & POUGH, 1983). Diferentemente em *P. cristiceps* o escopo metabólico é alto durante as chuvas e baixo na estiagem, o que infere sobre a baixa capacidade aeróbia durante a estivação nesta espécie, pois animais que exibem longos

períodos de atividade sustentada tendem a ter escopos mais altos do que aqueles que são mais letárgicos ou apresentam rajadas curtas de atividade (HARLOW, 1978).

Os espécimes de *Physalaemus albifrons* exibem escopo metabólico mediano, em relação as espécies *P. diplolistris* e *P. cristiceps*. Assim, é possível inferir diretamente sobre a responsividade dos animais, visto que, o escopo metabólico acompanha as observações realizadas, nas quais *P. cristiceps* é a espécie mais letárgica durante a estivação, tanto no desempenho locomotor, quanto no tempo de responsividade quando estimulado durante a coletada, demorando alguns minutos para a abertura dos olhos. Já os sapos *Physalaemus* exibem um tempo de responsividade intermediário, quando comparado a *P. diplolistris* e *P. cristiceps,* não mostrando uma velocidade alta como *P. diplolistris* durante o desempenho locomotor e apresentando um tempo menor para abertura dos olhos em comparação a *P. cristiceps*. Finalmente, o alto escopo metabólico de *P. diplolistris* infere diretamente ao comportamento que esta espécie apresentou, abrindo os olhos imediatamente ao ser incomodada em seu micro-habitat e exibindo a maior velocidade entre as três espécies.

8.5. Atividade enzimática

As alterações no consumo de oxigênio no ciclo anual de atividade das espécies que estivam na Caatinga, *Physalaemus, P. diplolistris* e *P. cristiceps,* são corroboradas pela redução da atividade da citrato sintase (CS), uma das principais enzimas representativas do metabolismo aeróbio, e da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD), pertencente à via da β-oxidação lipídica. Esta redução é observada nos músculos dos membros inferiores, assim como resultados

semelhantes foram vistos no tecido esquelético de sapos *Scaphiopus couchii*, durante a estivação, fase em que a capacidade aeróbia está reduzida (COWAN & STOREY, 2002; ST-PIERRE & BOUTILIER, 2001).

Durante a estação chuvosa, *P. diplolistris* e *P. cristiceps* exibem uma redução da atividade da CS no final das chuvas, possivelmente em razão da fase de forrageando, na qual estes indivíduos permanecem refazendo seus estoques de substratos energéticos. Diferentemente, nesta fase o gasto energético é menor do que o observado durante o início da estação chuvosa, na qual ocorre a reprodução, que envolve vocalização, uma atividade energeticamente custosa para os anfíbios (CARVALHO *et al.,* 2008; NAVAS *et al.,* 2008). Contudo, a atividade da CS no tecido hepático de *P. diplolistris* não apresenta variação significativa, mantendo a capacidade aeróbia durante todas as fases observadas. O que não foi observado no sapo *Ceratophrys ornata*, que após aproximadamente dois meses de estivação induzida, não apresentou redução no consumo de oxigênio e exibiu um aumento significativo da atividade da CS hepática (GROOM *et al.,* 2013). O incremento na atividade da HOAD é observado no tecido hepático de *Physalaemus* e *P. cristiceps* no final da estação seca, corroborando o aumento da β-oxidação lipídica exibida por muitos animais durante a fase de jejum (RUI, 2014). Este aumento também infere ao uso das reservas lipídicas no começo do processo reprodutivo, que tem início antes da estação chuvosa, uma vez que os animais apresentam comportamento reprodutivo oportunista. Mais ainda, anfíbios estivadores costumam exibir ovogênese e espermatogênese durante a estiagem (RYSER, 1989). Porém, o prolongamento desta fase, mesmo com a redução do metabolismo que implica na economia das reservas de substratos energéticos, pode comprometer a formação de gametas (JØRGENSEN, 1992).

A capacidade da via glicolítica no tecido hepático de *P. cristiceps* aparentemente é mantida, posto que a atividade da piruvato quinase (PK) e da lactato desidrogenase (LDH), não exibem mudanças ao longo das estações. Na musculatura dos membros posteriores de *P. diplolistris* e *Physalaemus* a atividade da PK também se mantem constante, mas em *P. cristiceps* é menor no início da estação chuvosa, fase reprodutiva, o que também foi observado na fase de atividade dos sapos *Scaphiopus couchii* (COWAN *et al*., 2000). Possivelmente, *P. cristiceps* tem ajustes não só nas vias aeróbias, mas também na via glicolítica, que neste caso pode estar contribuindo para a manutenção da via dependente de oxigênio, uma vez que não ocorrem ajustes na atividade da LDH e que o piruvato resultante da reação catalisada pela PK pode ter ser utilizado pelas vias aeróbias, pois apesar do consumo de oxigênio ser reduzido em 50%, o ambiente não exibe hipóxia para o animal (PEREIRA, 2009). Assim como salamandras *Notophthalmus viridescens* não há variação sazonal na atividade da LDH na musculatura (BERNER & BESSAY, 2006).

A depressão metabólica parece interagir diferentemente em cada tecido (FLANIGAN *et al.*, 1990; YOUNG *et al*., 2011). Assim, é possível especular que o incremento da LDH na musculatura dos membros posteriores de *Physalaemus* pode inferir a uma atividade de migração vertical, visto que muitos anfíbios usam vias não dependentes de oxigênio para a locomoção (BENNETT, 1974). Contudo *P. cristiceps* e *P. diplolistris* parecem não sofrer ajustes nas vias independentes de oxigênio na musculatura dos membros posteriores durante a migração vertical observada durante a fase de estivação. Esta migração não tem sido relatada para sapos como *Neobatrachus pelabatoides* que durante a estivação exibem uma redução de enzimas representantes da via glicolítica (FLANIGAN *et al.,* 1991) ou

Rana ridibunda que durante a hibernação também exibe uma redução na atividade da LDH (MICHAELIDIS *et al*., 2008). No tecido hepático de *P. diplolisitris* a atividade da PK é maior no final da estação chuvosa e diferentemente, em *Physalaemus* a atividade é maior nas duas fases da estação chuvosa, possivelmente devido a atividade reprodutiva e forrageadora, visto que, em muitos anuros as vias independentes de oxigênio são usadas para a manutenção da produção de ATP durante a locomoção (BENNETT, 1974) ou fase de atividade (SCAPIN & GIUSEPPE, 1994).

8.6. Contribuição de substratos energéticos

8.6.1. Glicogênio

A contribuição do glicogênio para a transição entre as estações é diferente para cada espécie observada. Ainda que concentração de glicogênio muscular apresente uma redução no final da estação de chuva em *P. diplolistris* e *Physalaemus,* e no início desta estação em *P. cristiceps,* a transição para o início da estação seca é diferenciada para as três espécies. Os sapos *P. diplolistris* exibem um aumento da concentração de glicogênio no início da estação seca, o que é observado no final da estação em *Physalaemus*. Aparentemente *P. diplolistris* inicia a fase de estivação com o uso muito reduzido das reservas de glicogênio que voltam a diminuir no final da estivação, fase na qual os espécimes estão se preparando para a reprodução e possivelmente podem usar este substrato para os tecidos dependentes de glicose, como a musculatura cardíaca, por exemplo.

Os sapos *P. cristiceps* terminam a fase de estiagem com estoques altos de glicogênio no tecido muscular dos membros posteriores, apresentam um comportamento letárgico e aparentemente precisam de um maior índice

pluviométrico para iniciar a reprodução, pois nas primeiras noites são encontrados apenas espécimes de *P. diplolistris* e *Physalaemus* coaxando. Os espécimes de *P. cristiceps* parecem manter os estoques de glicogênio até o início da reprodução, quando tem início suas atividades, o que foi relatado para algumas espécies, como *Rana esculente*, por exemplo, que usam a maior parte de seus estoques de glicogênio durante a fase de atividade (SCAPIN & GIUSEPPE, 1994). Assim, estes dados podem indicar que *P. diplolistris* inicia suas atividades antes de *P. cristiceps*, apontando uma diferenciação metabólica interespecífica.

Os dados sugerem ainda que, as três espécies não apresentam alteração na concentração de glicogênio hepático ao longo das estações, assim como descrito em sapos *S. couchii* (Scaphiopodidae), que mantém os estoques hepáticos de glicogênio preservados durante a fase hipometabólica, inferindo a uma baixa utilização de carboidratos durante esta fase (STOREY & STOREY, 1990a). Outra espécie, *Rana ridibunda* tem redução de glicogênio durante a fase de dormência e um incremento na concentração de lipídeo no tecido hepático (LOUMBOURDIS & KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU, 1991). Este aumento também é observado em *Physalaemus* que mantem o estoque hepático de lipídeo alto durante a estivação.

8.6.2. Lipídeos totais

As espécies *P. diplolistris* e *P. cristiceps* possuem concentrações de lipídeos totais musculares maiores no início da chuvosa quando comparada ao final da estação, inferindo uma intensa atividade reprodutiva, porém, pela grande variedade interespecífica não é possível observar o aumento destes estoques no meio da estação seca. Entretanto, há uma tendência a reposição deste substrato energético

para sustentação metabólica durante as fases de estiagem, que é evidenciada no fígado de *P. diplolistris* e *P. cristiceps* que apresentam aumento significativo no final da estação chuvosa. As reservas de lipídio aumentam no tecido hepático após a reprodução, final da estação de chuvas em *P. diplolistris* e *P. cristiceps*, o que pode representar uma preparação para a fase de dormência, como visto em *Rana catesbeiana* que teve seus estoques de lipídeos incrementados do final da reprodução até o início da dormência (BYRNE & WHITE, 1975). Em *Physalaemus*, apesar desta reposição não ser observada no músculo, aparece claramente nas concentrações de lipídeos totais do fígado, no meio da estação seca, que possui valor maior que o início da estação chuvosa. Essa espécie mostra uma tendência a reposição tardia dos estoques lipídicos, o que pode indicar que apesar das espécies ocuparem o mesmo ambiente, o forrageamento ocorre em diferentes momentos.

Nas três espécies estudas são encontrados corpos gordurosos que podem corresponder em média a 3% da massa total dos animais durante a estivação. O que não é insólito, uma vez que em *Scaphiopus couchii*, por exemplo, o orçamento energético durante a estivação é proveniente em sua maior parte pela oxidação de lipídeos (SEYMOUR, 1973b), que pode ser observado, entre outras medidas, através da composição da massa corpórea. No início da fase de dormência 4,5% da massa corpórea dos sapos em *Scaphiopus couchii* é composta por lipídeos, mas na retomada da atividade há menos de 1% do conteúdo anterior. Uma importante reserva energética nos vertebrados é o estoque de lipídeos na forma de corpos gordurosos abdominais, subepiteliais e associados aos tecidos hepático e muscular (DUELLMAN & TRUEB, 1986). Contudo, poucas espécies de anuros apresentam corpos de gordura abdominal durante a fase adulta, com algumas exceções, como

espécies que exibem depressão metabólica sazonal (MCCLANAHAN, 1967) ou que são particularmente ativas vocalizando (CARVALHO *et al.,* 2008).

O estoque de corpos gordurosos representa uma fonte de substrato energético muito importante, contribuindo juntamente com o lipídeo presente no tecido muscular e hepático destes animais durante a estiagem, principalmente para *P. diplolistris* e *P. cristiceps*, que exibem uma concentração hepático reduzida de lipídeo no fígado ao final da estiagem. É sabido que sapos estivadores possuem o fígado proporcionalmente maior quando comparado com outras espécies (WITHERS & HILLMAN, 2001), isto pode auxiliar no estoque de reservas energéticas durante a estivação, pois além de preservar os substratos durante a estivação é necessário para iniciar a reprodução, que nas espécies deste trabalho é explosiva.

8.6.3. Proteínas solúveis

Os estoques proteicos na musculatura dos membros posteriores parecem ser preservados ao longo das estações nas espécies observadas no semiárido brasileiro, apesar de serem significativamente maiores no final da estação seca. Isso pode indicar um preparo para a atividade reprodutiva, o que não é observado frequentemente em espécies descritas com o comportamento de estivação, como, *Neobratrachus pelobatoides* (Limnodynastidae)*,* que reduz a síntese proteica em 67% durante a estivação, (FLANIGAN *et al.,* 1991) ou sapos *Cyclorana alboguttata* que não exibem mudanças na concentração de proteína na musculatura esquelética (REILLY *et al*., 2014). Por ser um dos processos mais custosos energeticamente, em muitos animais é observada uma redução acentuada neste processo durante a fase hipometabólica (HAND & HARDEWIG, 1996). Em *Bufo*

marinus a síntese proteica responde por 12% do consumo de oxigênio no tecido hepático (FUERY *et al.,* 1998).

A concentração de proteína no tecido hepático é diferenciada, pois *P. diplolistris* e *Physalaemus* apresentam um aumento no final da estação de chuva, momento no qual teoricamente já obtiveram êxito na reprodução e estão repondo os estoques para a manutenção da homeostase durante a estivação. Contudo, em *P. cristiceps* ocorre uma redução nesta fase, o que pode indicar uma reposição tardia, dos estoques de substrato, uma vez que parece iniciar a reprodução tardiamente, quando grandes poças estão formadas e os rios intermitentes estão com água. Os sapos *P. cristiceps* exibem redução significativa na concentração de proteína solúvel na musculatura dos membros posteriores no final da estação chuvosa, fase de forrageamento. Concomitante com a redução da concentração de proteína solúvel exibida pela musculatura dos membros posteriores, ocorre uma redução no tecido hepático que pode estar contribuindo para a síntese de ureia, assim como observado em sapos *Scaphiopus couchi* que aumentam o catabolismo de proteínas e a síntese de ureia durante a estivação (JONES, 1980).

Os anfíbios estivadores são descritos com comportamento reprodutivo oportunista e explosivo, que ocorre imediatamente após o início das chuvas (PINTER *et al.,* 1992). Assim, em muitas espécies os estoques energéticos são responsáveis também pelo sucesso reprodutivo, nos sapos *S. couchii*, por exemplo, os estoques lipídicos são importantes não só para a preparação de gametas (RYSER, 1989), mas também sustentam a atividade vocal dos machos na nesta fase (COWAN *et al*., 2000). Em *Rana temporaria*, o prolongamento da fase de estivação diminui a produção de gametas (JØRGENSEN, 1992), tornando o sucesso reprodutivo depende da manutenção dos níveis proteicos durante a fase

reprodutiva (GUPPY *et al.,* 1994; PINTER *et al.,* 1992). Em algumas espécies é observado uma produção de gametas mesmo após o término da estação reprodutiva (HARVEY *et al*., 1997; SHALAN *et al*., 2004). Em sapos do gênero *Scaphiopus* os ovos produzidos pelas fêmeas podem ser reabsorvidos durante a estiagem quando a precipitação de chuva não é suficiente para a reprodução (SEYMOUR, 1973c). O que pode estar mantendo o nível proteico ao longo das estações nas espécies observadas na Caatinga, como por exemplo, *Physalaemus*, que exibe manutenção da concentração de proteína ao longo das estações.

8.7. Contribuição de corpos cetônicos

A atividade de algumas das enzimas representativas da via cetogênica, como a β-hidroxibutirato desidrogenase (HBDH) por exemplo, exibe um aumento da sua atividade na musculatura dos membros posteriores de *P. diplolistris* no final da estação seca, já no tecido hepático há um aumento da atividade dessa enzima e da succinil-CoA-cetotranferase (SKT) no início da estiagem. Os sapos *P. cristiceps*, também exibem um aumento da SKT na musculatura dos membros inferiores no final da estação seca e um aumento da atividade no musculo cardíaco no final da estação chuvosa. No tecido hepático de *Physalaemus* ocorre um aumento na atividade da HBDH durante a fase de estiagem e no tecido cardíaco o aumento ocorre no final da estação seca, possivelmente inferindo uma exportação para a manutenção do coração.

As três espécies aparentam usar mais corpos cetônicos durante a estivação, contudo em *Physalaemus* parece exibir uma dependência deste substrato energético no início da reprodução, possivelmente por estes espécimes não terem se alimentado ainda, se reproduzindo imediatamente após a primeira chuva. Já os

anfíbios *P. cristiceps*, que por apresentar uma responsividade menor durante a estivação e serem encontrados exibindo um comportamento reprodutivo apenas após algumas horas de chuva, podem ter se alimentado, mesmo que em pequena quantidade no início da estação chuvosa. Mais ainda, podem estar oxidando os estoques lipídicos que estão altos no início da estação chuvosa, pois além da grande quantidade de corpos gorduroso, há uma grande concentração de lipídeo no músculo dos membros posteriores.

É possível que ocorra uma exportação dos corpos cetônicos produzidos no fígado para o sistema nervoso central, concomitantemente com a oxidação das reservas de lipídeos, uma vez que a β-oxidação lipídica resulta na produção de acetil-CoA que pode ser utilizado na formação de corpos cetônicos (ZAMMIT & NEWSHOLME, 1979). Assim, durante a fase hipometabólica muitas espécies costumam apresentar um aumento no metabolismo de corpos cetônicos juntamente com o aumento da oxidação lipídica (STOREY, 2002), como no caracol *Archachatina ventricosa* em que corpos cetônicos representam um importante substrato energético (STUART& BALLANTYNE, 1997) e em rã *Rana sylvatica* que exibe um aumento na concentração de corpos cetônicos durante a hibernação (HEMMINGS & STOREY, 1996). Ou ainda em peixes pulmonados, em que os corpos cetônicos contribuem para a manutenção do organismo durante a estivação (FRICK *et al*., 2008).

Nas fases de estiagem é possível observar uma redução na atividade das enzimas representativas da produção de corpos cetônicos em alguns tecidos, o que sugere que estão preferencialmente sendo oxidados por outros tecidos (COWAN *et al*., 2000). É possível observar ainda o aumento na atividade de enzimas relacionadas a formação de corpos cetônicos no tecido hepático destas espécies,

o que não é insólito uma vez que a cetogênese ocorre primeiramente no fígado. Ainda assim, é importante ressaltar que a ausência de alteração na atividade enzimática não significa que o fluxo metabólico não foi alterado, as alterações podem ocorrer em vivo, alostericamente.

Por fim, cálculos metabólicos sugerem que nas condições atuais a reserva de corpos gordurosos é suficiente para manter os animais por pouco mais de 15 meses, pois há um consumo de energia de aproximadamente 50% durante a fase de estivação quando comparado ao consumo de oxigênio em repouso durante a fase chuvosa e um acúmulo de corpos gordurosos equivalente a 1,2% da massa corpórea em *P. cristiceps*, 3,6% em *P. albifrons* e 2,5% em *P. diplolistris*. Algumas estimativas feitas a partir da taxa metabólica durante a estivação em outros modelos, como no caso de sapos *Scaphiopus couchii*, *Scaphiopus multiplicatus* e *Pyxicephalus adpersus* indicam que os animais podem permanecer por alguns anos sobrevivendo às custas de suas reservas internas de lipídeos e carboidratos (GEHLBACH *et al.,* 1973; JONES, 1980; SMITH, 1950). Em sapos *Scaphiopus couchii* o estoque de lipídeos contribui em grande parte para a preservação do organismo durante a estivação (MCCLANAHAN, 1967), porém a oxidação lipídica colabora em diferentes frações, juntamente com outros substratos energéticos na manutenção da estivação em anuros (JONES, 1980). Algumas estimativas mostram que os estoques lipídicos juntamente com a redução do metabolismo podem manter os anfíbios em estivação por alguns anos (GEHLBACH *et al.,* 1973; SMITH, 1950).

As reservas de lipídeos e carboidratos são os mais importantes substratos energéticos em anuros, sendo comumente as proteínas relativamente conservadas durante a estivação (COWAN *et al*., 2000; PAKAY, 2003). O uso de proteínas como

substrato energético é reduzido durante a fase de estivação em *Cyclorana platycephalus* (VANBEURDEN, 1980), mas em condições de estresse hídrico pode aumentar consideravelmente, como relatado em *S.couchii* (MCCLANAHAN, 1972). Ainda assim, a síntese de proteínas pode ser retomada no início da fase de atividade (DUELLMAN & TRUEB, 1986), o que pode estar sendo observados nas espécies brasileiras, porém antecipadamente, uma vez que antes do início das chuvas é possível observar o aumento na concentração de proteína total na musculatura dos membros posteriores.

8.8. Principais considerações sobre as diferentes estratégicas utilizadas

Os ajustes observados sugerem que há diferentes estratégias de estivação entre anuros sintópicos da Caatinga, que diferem principalmente: (1) uso de substratos energéticos; (2) consumo de oxigênio e (3) estado hídrico.

A utilização da reserva lipídica parece ocorrer em diferentes momentos, em sapos *P. diplolistris* e *P. cristiceps* o estoque hepático de lipídios está reduzido no final da estação seca, possivelmente estes animais continuam forrageando após o término das chuvas até o início da estiagem, construindo seus estoques lipídicos. Já em *Physalaemus* esses estoques estão maiores no meio da estação seca, inferindo sobre um possível forrageamento tardio dessa espécie. E, ainda que os lipídeos sejam responsáveis por até 62% do suprimento de energia durante a fase hipometabólica em estivadores típicos, do gênero *Scaphiopus* (JONES, 1980), ocorre uma redução da reserva de glicogênio muscular em *P. diplolistris*, no final da estação seca, inferindo que este tipo de substrato energético contribui mais para a manutenção da estivação nessa espécie, quando comparado com *P. cristiceps* e *Physalaemus*. Uma vez que, o estoque de glicogênio costuma ser preservado

durante a fase hipometabólica em estivadores clássicos (STOREY & STOREY, 1990a), o uso desse substrato energético pode inferir sobre a estivação diferenciada observada em *P. diplolistris*, posto que esta espécie exibe valores maiores de consumo de oxigênio e velocidade de locomoção, além de migrar verticalmente no solo ao logo da estiagem.

O consumo de oxigênio, é reduzido em aproximadamente 50% nas três espécies, ainda que, sapos *P. diplolistris* apresentem um consumo durante a estiagem menor que o de *P. cristiceps* durante a estação de chuva. Além do valor reduzido no consumo de oxigênio, *P. cristiceps* é a única espécie que difere entre as duas estações no consumo de oxigênio durante a atividade forçada e exibe a maior queda na velocidade de locomoção durante a estiagem. Estes fatos podem inferir sobre uma tendência a estivação mais profunda, como reportado tradicionalmente para anfíbios estivadores, sem exibir migração vertical.

O desempenho locomotor das três espécies é algo surpreendente e infere que diferentes sistemas semiáridos podem favorecer distintos tipos de estivação. A literatura publicada tende a sugerir que os anuros estivadores apresentam tempo mínimo de resposta a um estímulo de aproximadamente 20 minutos (MCCLANAHAN, 1967), muito mais do que o observado nas espécies neste estudo, e muito particularmente em *P. diplolistris*. Nesta espécie a moderada depressão metabólica pode estar relacionada a atividade de migração vertical ao longo dos meses de estiagem, uma vez que *P. diplolistris* apresentou a maior velocidade de locomoção e o menor tempo de responsividade, durante a estação seca, o que não é observado em *P. cristiceps* e *Physalaemus albifrons*, espécies que mantêm o balanço hídrico aumentando a osmolaridade plasmática. Apesar de exibirem estratégias diferentes, o hematócrito das três espécies se mantêm constante ao

longo das estações de estiagem, inferindo sobre um estado adequado de hidratação durante as fases de seca, o que não é observado em estivadores comuns.

9. CONCLUSÕES

- A depressão metabólica é de aproximadamente 50% para as três espécies, porém com ajustes enzimáticos diferenciados entre as espécies e entre os tecidos. A oxidação de lipídios no tecido hepático é diferente nas três espécies, sendo visualizada uma dependência maior em *Physalaemus* no final da estivação. Já o metabolismo oxidativo da musculatura dos membros posteriores começa a ser reduzido final da estação chuvosa em *P. cristiceps* e *Physalaemus*, e no meio da estivação em *P. diplolistris*. Mais ainda, a via glicolítica apresenta poucos ajustes em *P. cristiceps*, porém a musculatura dos membros posteriores de *Physalaemus* aparenta usar mais vias independentes de oxigênio para a manutenção durante a fase de estivação. Entretanto, todas as espécies estudas apresentam preservação da capacidade locomotora durante a fase de estiagem, sugerindo a conservação da capacidade funcional do tecido muscular durante toda a fase de estivação.

- A redução de aproximadamente 50% no consumo de oxigênio apresentada por *Proceratophrys cristiceps, Pleurodema diplolistris* e *Physalaemus* durante a estivação certamente leva a uma redução na taxa de utilização dos estoques energéticos além de uma diminuição na taxa de desidratação, como consequência da diminuição da respiração cutânea e da perda evaporativa de água.

- A utilização de lipídeos e glicogênio é diferenciada entre as espécies e tecidos ao longo das estações, sendo a oxidação de lipídeos maior nos músculos dos membros posteriores de *P. cristiceps* durante toda fase de

estiagem e reduzida no final da estivação em *P. diplolistris* e *Physalaemus*. Aparentemente a migração vertical no final da estivação é mantida pelo uso de glicogênio e pela oxidação de lipídios em *P. diplolistris*. E mais, o acúmulo de reservas energéticas nas três espécies é realizado em tempos diferentes, sendo mais tardio em *P. cristiceps*, que tem o aumento das suas reservas lipídicas no meio da estação seca, o que possivelmente indica uma atividade de forrageamento prolongada antes do prolongamento da estação seca.

- A utilização de corpos cetônicos parece ser realizada de forma diferente entre as espécies estudas. Os sapos *Physalaemus* aparentam maior dependência deste substrato energético no início da reprodução, possivelmente por estes espécimes não terem se alimentado ainda, reproduzindo-se imediatamente após a primeira chuva, diferente de *P. cristiceps*, que por ser encontrado exibindo um comportamento reprodutivo apenas após algumas chuvas, pode ter se alimentado, mesmo que em pequena quantidade no início da estação chuvosa e não ser tão dependente deste substrato.

- As três espécies ocupam o mesmo micro-habitat durante e estivação, mas apresentaram padrões diferentes tanto no escopo metabólico quanto em características plasmáticas observadas. Aparentemente *Proceratophrys cristiceps* possui uma estratégia diferenciada durante a estivação, o que é evidenciado pela menor responsividade, maior redução na velocidade durante o desempenho locomotor e pela redução da osmolaridade plasmática no meio da estação de seca.

- As estratégias observadas nos anuros estivadores da Caatinga são diferentes das descritas para anuros estivadores de outras comunidades em ambiente semiárido. Mais ainda, o conjunto de estratégias observadas nestas espécies sugere tipos diferenciados de estivação dentro da Caatinga, e na comparação da Caatinga com outros ambientes nos que ocorre a estivação de anuros. Ou seja, diferentes estratégias têm sido favorecidas na preservação do balanço energético e hídrico nas radiações evolutivas de anuros no semiárido.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER, A. N. O domínio Morfoclimático Semi-árido das Caatingas Brasileiras. **Geomorfologia**, v. 43, p. 1–32, 1974.

ABE, A. S. Estivation in South American amphibians and reptiles. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 28, n. 11-12, p. 1241–1247, 1995.

BALDWIN, R. A. The water balance response of the pelvic "patch" of Bufo punctatus and Bufo boreas. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 47, n. 4, p. 1285–1295, abr. 1974.

BASTOS, R. P.; ABE, A. S. Dormancy in the Brazilian horned toad Ceratophrys aurita (Anura, Lepdodactylidae). **Ciência e Cultura**, v. 68-70, 1998.

BENNETT, A. F. Enzymatic correlates of activity metabolism in anuran amphibians. **The American journal of physiology**, v. 226, n. 5, p. 1149–1151, maio 1974.

BENTLEY, P. J. Adaptations of amphibia to arid environments. **Science (New York, N.Y.)**, v. 152, n. 3722, p. 619–623, abr. 1966.

BENTLEY, P. J.; LEE, A. K.; MAIN, A. R. Comparison of dehydration and hydration of two genera of frogs (Heleioporus and Neobatrachus) that live in areas of varying aridity. **Journal of Experimental Biology**, v. 35, p. 677–684, 1958.

BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. 2. ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1983.

BERNER, N. J.; BESSAY, E. P. Correlation of seasonal acclimatization in metabolic enzyme activity with preferred body temperature in the Eastern red spotted newt (Notophthalmus viridescens viridescens). **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 144, n. 4, p. 429–436, ago. 2006.

BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 10, p. 53–60, 1997.

BOOTH, D. T. Effect of soil type on burrowing behavior and cocoon formation in the green-striped burrowing frog , Cyclorana alboguttata. **Canadian Journal of Zoology**, v. 838, p. 832–838, 2006.

BOOTH, F. W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 52, n. 5, p. 1113–8, maio 1982.

BRAGG, A. N. Observations on Scaphiopus, 1949(Salientia: Scaphiopodidae). **Wasmann Journal of Biology**, v. 8, n. 2, p. 221–228, 1950.

BRAGG, A. N. **Gnomes of the night: The Spadefoot toads**. University ed. Philadelphia: [s.n.].

BROWN, G. P.; KELEHEAR, C.; SHINE, R. Effects of seasonal aridity on the

ecology and behaviour of invasive cane toads in the Australian wet-dry tropics. **Functional Ecology**, v. 25, n. 6, p. 1339–1347, dez. 2011.

BUCHER, T. L.; RYAN, M. J.; BARTHOLOMEW, G. A. Oxygen Consumption during Resting, Calling, and Nest Building in the Frog Physalaemus Pustulosus. **Physiological Zoology**, v. 55, n. 1, p. 10–22, 1982.

BYRNE, J. J.; WHITE, R. J. Cyclic changes in liver and muscle glycogen tissue lipid and blood glucose in a naturally occurring population of Rana catesbeiana. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 50, n. 4, p. 709–715, abr. 1975.

CANO, F. H. Estructura y función en la piel de anfibios anuros. **Caldasia**, v. 10, n. 48, p. 317–328, 1969.

CANZIANI, G. A.; CANNATA, M. . Water balance in Ceratophrys ornata from two different environments. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 66, n. 4, p. 599–603, jan. 1980.

CARTLEDGE, V. A. WITHERS, P. C.; THOMPSON, G. G.; MCMASTER, K. A. Water relations of the burrowing sandhill frog, Arenophryne rotunda (Myobatrachidae). **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 176, n. 4, p. 295–302, maio 2006a.

CARTLEDGE, V. A. WITHERS, P. C.; MCMASTER, K.; THOMPSON, G. G.; BRADSHAW, S. D. Water balance of field-excavated aestivating Australian desert frogs, the cocoon-forming Neobatrachus aquilonius and the non-cocooning Notaden nichollsi (Amphibia: Myobatrachidae). **The Journal of experimental biology**, v. 209, n. Pt 17, p. 3309–3321, set. 2006b.

CARTLEDGE, V.; WITHERS, P. C.; BRADSHAW, S. D. Water balance and arginine vasotocin in the cocooning frog Cyclorana platycephala (hylidae). **Physiological and biochemical zoology : PBZ**, v. 81, n. 1, p. 43–53, 2008.

CARVALHO, J. E.; GOMES, F. R.; NAVAS, C. A. Energy substrate utilization during nightly vocal activity in three species of Scinax (Anura/Hylidae). **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 178, n. 4, p. 447–456, maio 2008.

CARVALHO, J. E.; NAVAS, C. A.; PEREIRA, I. C. Energy and water in aestivation amphibians. In: NAVAS, C. A.; DE CARVALHO, J. E. (Eds.). . **Progress in molecular and subcellular biology**. [s.l.] Springer, 2010. v. 49p. 141–169.

COSTANZO, J. P. MARJANOVIC, M.; FINCEL, E. A.; LEE, R. E. Urea loading enhances postfreeze performance of frog skeletal muscle. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 178, n. 3, p. 413–420, mar. 2008.

COWAN, K. J. MACDONALD, J. A.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Metabolic reorganization and signal transduction during estivation in the spadefoot toad. **Experimental Biology Online**, v. 5, n. 1, p. 1–25, dez. 2000.

COWAN, K. J.; STOREY, K. B. Urea and KCl have differential effects on enzyme activities in liver and muscle of estivating versus nonestivating species. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, v. 80, n. 6, p.

745–755, jan. 2002.

DAVIES, M.; WITHERS, P. C. Morphology and physiology of the Anura. In: GLASBY, C.; ROSS, G.; BEESLEY, P. (Eds.). . **Fauna of Australia**. 2A. ed. Canberra: Australian Government Printing Service:, 1993. p. 15–27.

DEGANI, G. The Habitats, Burrowing Behavior, Physiology Adaptation and Life Cycle of Spadefoot Toads (Pelobates syriacus, Boettger, 1869) at the Southern Limit of Its Distribution in Israel. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 05, n. 03, p. 249–257, 2015.

DEGANI, G.; GOLDENBERG, S.; WARBURG, M. R. changes in ion, urea concentrations and blood plasma osmolarity of Pelobates syriacus juveniles under varying conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 75, n. 4, p. 619–623, jan. 1983.

DEGANI, G.; WARBURG, M. R. Changes in concentrations of ions and urea in both plasma and muscle tissue in a dehydrated hylid anuran. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 77, n. 2, p. 357–360, jan. 1984.

DOLE, J. W. The Role of Substrate Moisture and Dew in the Water Economy of Leopard Frogs, Rana pipiens. **Copeia**, v. 1967, n. 1, p. 141, 20 mar. 1967.

DUBOIS, M. GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956.

DUELLMAN, W. E.; LIZANA, M. Biology of a Sit-and-Wait Predator, the Leptodactylid Frog Ceratophrys cornuta. **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 51–64, 1994.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibian**. McGraw-Hil ed. New York: [s.n.].

FERNANDES, A. Província das Caatingas ou nordestina. **Anais da Academia Brasileira**, v. 71, p. 299–310, 1999.

FLANIGAN, J. WITHERS, P.; STOREY, K.; GUPPY, M. Changes in enzyme binding and activity during aestivation in the frog Neobatrachus pelobatoides. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 96, n. 1, p. 67–71, jan. 1990.

FLANIGAN, J. E.; WITHERS, P. C.; GUPPY, M. In vitro metabolic depression of tissues from the aestivating Frog Neobatrachus pelobatoides. **Journal of Experimental Biology**, v. 161, p. 273–283, 1991.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, maio 1957.

FRICK, N. T. BYSTRIANSKY, J. S.; IP, Y. K.; CHEW, S. F. BALLANTYNE, JAMES, S. Lipid, ketone body and oxidative metabolism in the African lungfish, Protopterus dolloi following 60 days of fasting and aestivation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 1, p. 93–101, set. 2008.

FRINGS, C. S. FENDLEY, T. W.; DUNN, R. T.; QUEEN, C. A. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 7, p. 673–674, jul. 1972.

FRINGS, C. S.; DUNN, R. T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. **American journal of clinical pathology**, v. 53, n. 1, p. 89–91, jan. 1970.

FRY, F. E. J. Effects of an environment on animal activity. **University of Toronto Studies Biological Series**, v. 55, p. 1–62, 1947.

FUERY, C. J. WITHERS, P. C.; HOBBS, A. A.; GUPPY, M. The role of protein synthesis during metabolic depression in the Australian desert frog Neobatrachus centralis. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 119, n. 2, p. 469–476, fev. 1998.

FUERY, C. J.; WITHERS, P. C.; GUPPY, M. Protein synthesis in the liver of Bufo marinus: cost and contribution to oxygen consumption. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 119, n. 2, p. 459–467, fev. 1998.

GEHLBACH, F. R.; GORDON, R.; JORDAN, J. B. Aestivation of the Salamander , Siren intermedia. **American Midland Naturalist**, v. 89, p. 455–463, 1973.

GOMEZ-MESTRE, I.; PYRON, R. A.; WIENS, J. J. PHYLOGENETIC ANALYSES REVEAL UNEXPECTED PATTERNS IN THE EVOLUTION OF REPRODUCTIVE MODES IN FROGS. **Evolution**, v. 66, n. 12, p. 3687–3700, dez. 2012.

GRAFE, T. U.; THEIN, J. Energetics of calling and metabolic substrate use during prolonged exercise in the European treefrog Hyla arborea. **JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY B-BIOCHEMICAL SYSTEMIC AND ENVIRONMENTAL PHYSIOLOGY**, v. 171, n. 1, p. 69–76, 2001.

GROOM, D. J. E.; KUCHEL, L.; RICHARDS, J. G. Metabolic responses of the South American ornate horned frog (Ceratophrys ornata) to estivation. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 164, n. 1, p. 2–9, jan. 2013.

GÜL, Ç. TOSUNOGLU, M.; ERDOGAN, D.; ÖZDAMARr, D. Changes in the blood composition of some anurans. **Acta Herpetologica**, v. 6, n. 2, p. 137–147, 2011.

GUPPY, M.; FUERY, C. J.; FLANIGAN, J. E. Biochemical principles of metabolic depression. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 2-3, p. 175–189, out. 1994.

GUPPY, M.; WITHERS, P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. **Biological Reviews**, v. 74, p. 1–40, 1999.

HAND, S. C.; HARDEWIG, I. Down regulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. **Annual review of physiology**, v. 58, n. 539-563, 1996.

HARLOW, H. J. Seasonal aerobic and anaerobic metabolism at rest and during activity in the salamander Taricha torosa. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 61, n. 2, p. 177–182, jan. 1978.

HARVEY, L. A. PROPPER, C. R.; WOODLEY, S. K.; MOORE, M. Reproductive endocrinology of the explosively breeding desert spadefoot toad, Scaphiopus couchii. **General and comparative endocrinology**, v. 105, n. 1, p. 102–113, jan. 1997.

HAZEL, J. R. Cold Adaptation in Ectotherms: Regulation of Membrane Function and Cellular Metabolism. In: [s.l: s.n.]. p. 1–50.

HEMMINGS, S. J.; STOREY, K. B. Characterization of gamma-glutamyltranspeptidase in the liver of the frog: 3. Response to freezing and thawing in the freeze-tolerant wood frog Rana sylvatica. **Cell biochemistry and function**, v. 14, n. 2, p. 139–48, jun. 1996.

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

HUDSON, N. J. LEHNERT, S. A.; INGHAM, A. B.; SYMONDS, B.; FRANKLIN, C. E.; HARPER, G. S. Lessons from an estivating frog: sparing muscle protein despite starvation and disuse. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 290, n. 3, p. R836–43, mar. 2006.

HUDSON, N. J. HARPER, G. S.; ALLINGHAM, P. G.; FRANKLIN, C. E.; BARRIS, W.; LEHNERT, S. A. Skeletal muscle extracellular matrix remodelling after aestivation in the green striped burrowing frog, Cyclorana alboguttata. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 146, n. 3, p. 440–445, mar. 2007.

HUDSON, N. J. LONHIENNE, T. G. A.; FRANKLIN, C. E.; HARPER, G. S.; LEHNERT, S A. Epigenetic silencers are enriched in dormant desert frog muscle. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 178, n. 6, p. 729–734, ago. 2008.

HUDSON, N. J.; FRANKLIN, C. E. Effect of aestivation on muscle characteristics and locomotor performance in the Green-striped burrowing frog, Cyclorana alboguttata. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 172, n. 2, p. 177–182, fev. 2002a.

HUDSON, N. J.; FRANKLIN, C. E. Maintaining muscle mass during extended disuse: aestivating frogs as a model species. **The Journal of experimental biology**, v. 205, n. Pt 15, p. 2297–2303, ago. 2002b.

IP, Y. K.; CHEW, S. F. Nitrogen metabolism and excretion during aestivation. **Progress in molecular and subcellular biology**, v. 49, p. 63–94, jan. 2010.

JAMES, R. S. Effects of aestivation on skeletal muscle performance. In: **Progress in molecular and subcellular biology**. [s.l: s.n.]. v. 49p. 171–181.

JARED, C. ANTONIAZZI, M. M.; NAVAS, C. A.; KATCHBURIAN, E.; FREYMÜLLER, E.; TAMBOURGI, D. V.; RODRIGUES, M T. Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-headed tree frog Corythomantis greeningi. **Journal of Zoology**, v. 265, n. 1, p. 1–8, jan. 2005.

JONES, R. M. Metabolic consequences of accelerated urea synthesis during seasonal dormancy of spadefoot toads, Scaphiopus couchi and Scaphiopus

multiplicatus. **Journal of Experimental Zoology**, v. 212, n. 2, p. 255–267, maio 1980.

JØRGENSEN, C. B. Effects of arginine vasotocin, cortisol and adrenergic factors on water balance in the toad Bufo bufo: physiology or pharmacology? **Comparative biochemistry and physiology. Comparative physiology**, v. 101, n. 4, p. 709–716, abr. 1992.

JØRGENSEN, C. B. 200 years of amphibian water economy: from Robert Townson to the present. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, n. 2, p. 153–237, maio 1997a.

JØRGENSEN, C. B. Urea and amphibian water economy. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology**, v. 117, n. 2, p. 161–70, jun. 1997b.

KATZ, U. PAGI, D.; HAYAT, S.; DEGANI, G. Plasma osmolality, urine composition and tissue water content of the toad Bufo viridis Laur. in nature and under controlled laboratory conditions. **Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology**, v. 85, n. 4, p. 703–713, jan. 1986.

KATZ, U. Strategies of adaptation to osmotic stress in anuran Amphibia under salt and burrowing conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 93, n. 3, p. 499–503, jan. 1989.

KNIGHT, J. A.; ANDERSON, S.; RAWLE, J. M. Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 3, p. 199–202, 1972.

KONNO, N. HYODO, S.; TAKEI, Y.; MATSUDA, K.; UCHIYAMA, M. Plasma aldosterone, angiotensin II, and arginine vasotocin concentrations in the toad, Bufo marinus, following osmotic treatments. **General and Comparative Endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 86–93, jan. 2005.

LEE, A. K.; MERCER, E. H. Cocoon surrounding desert-dwelling frogs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 157, n. 3784, p. 87–8, 7 jul. 1967.

LILLYWHITE, H. B. Water relations of tetrapod integument. **The Journal of experimental biology**, v. 209, n. Pt 2, p. 202–226, jan. 2006.

LOUMBOURDIS, N.; KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU, P. Reproductive and lipid cycles in the male frog Rana ridibunda in northern greece. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 99, n. 4, p. 577–583, jan. 1991.

LOVERIDGE, J. P. Strategies of water conservation in southern African frogs. **Zoology African**, v. 11, p. 319–333, 1976.

LOVERIDGE, J. P.; WITHERS, P. C. Metabolism and Water Balance of Active and Cocooned African Bullfrogs Pyxicephalus adspersus. **Physiological Zoology**, v. 54, n. 2, p. 203–214, 1981.

LOWRY, O. H. ROSEN BROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, n. 265-275, 1951.

MAIN, A. R.; BENTLEY, P. J. Water Relations of Australian Burrowing Frogs and Tree Frogs. **Ecology**, v. 45, n. 2, p. 379, abr. 1964.

MARENGO, J. A. **Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade: caracterização do clima atual e definição das alterações climáticas para o território brasileiro ao longo do século XXI**. Brasilia: MMA, 2006.

MARENGO, J. A. Água e mudanças climáticas. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, p. 1–14, 2008.

MAYHEW, W. W. Adaptations of the Amphibian, Scaphiopus couchi, to Desert Conditions. **American Midland Naturalist**, v. 74, n. 1, p. 95–109, 1965.

MAYHEW, W. W. Biology of desert amphibians and reptiles. In: BROWN, G. W. (Ed.). . **Desert Biology**. Academic P ed. New York: [s.n.]. p. 195–356.

MCCLANAHAN, L. J. Adaptations of the spadefoot toad Scaphiopus couchi, to desert environments. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 20, n. 1, p. 73–99, jan. 1967.

MCCLANAHAN, L. J. Changes in Body Fluids of Burrowed Spadefoot Toads as a Function of Soil Water Potential. **Copeia**, v. 1972, p. 209–216, 1972.

MCCLANAHAN, L. J.; BALDWIN, R. Rate of water uptake through the integument of the desert toad, Bufo punctatus. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 28, n. 1, p. 381–389, jan. 1969.

MCCLANAHAN, L. J.; SHOEMAKER, V. H.; RUIBAL, R. Structure and Function of the Cocoon of a Ceratophryd Frog Lon. **Copeia**, v. 1976, p. 179–185, 1976.

MICHAELIDIS, B. KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU, P.; STAIKOU, A.; PAPATHANASIOU, I.; KONSTANTINOU, K. Glycolytic adjustments in tissues of frog Rana ridibunda and land snail Helix lucorum during seasonal hibernation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 151, n. 4, p. 582–589, dez. 2008.

NAVAS, C. A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. **International Congress Series**, v. 1275, p. 298–305, dez. 2004.

NAVAS, C. A.; GOMES, F. R.; CARVALHO, J. E. Thermal relationships and exercise physiology in anuran amphibians: integration and evolutionary implications. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 151, n. 3, p. 344–362, nov. 2008.

PAKAY, J. L. The role of eukaryotic initiation factor 2 during the metabolic depression associated with estivation. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 14, p. 2363–2371, jul. 2003.

PALTRIDGE, R.; SOUTHGATE, R. The effect of habitat type and seasonal conditions on fauna in two areas of Tanami Deset. **Wildlife Research**, v. 28, p. 247–260, 2001.

PARRISH, C. C. Determination of total lipids, lipid classes and fatty acids in

aquatic samples. In: ARTS, M. T.; WAINMAN, B. C. (Eds.). . **Lipids in Freshwater Ecosystems**. New York, NY: Springer New York, 1999.

PEREIRA, I. C. **Aspectos Fisiológicos e Ecológicos da Estivação em Pleurodema diplolistris (Leiuperidae / Anura)**. [s.l: s.n.].

PINDER, A. W.; STOREY, K. B.; ULTSCH, G. R. Estivation and Hibernation. In: FEDER, M. E.; BURGGREEN, W. W. (Eds.). . **Environmental Physiology of the Amphibians**. Chicago: Univercity of Chicago Press, 1992. p. 250–274.

POYNTON, J. C. Amphibia of southern Africa : a faunal study. **Annals of the Natal Museum**, v. 17, p. 1–334, 1964.

REILLY, B. D. HICKEY, A. J. R.; CRAMP, R. L.; FRANKLIN, C. E. Decreased hydrogen peroxide production and mitochondrial respiration in skeletal muscle but not cardiac muscle of the green-striped burrowing frog, a natural model of muscle disuse. **The Journal of experimental biology**, v. 217, n. Pt 7, p. 1087–93, 1 abr. 2014.

REYNOLDS, S. J.; CHRISTIAN, K. A.; TRACY, C. R.; HUTLEY, L. B. Changes in body fluids of the cocooning fossorial frog Cyclorana australis in a seasonally dry environment. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 160, n. 3, p. 348–354, nov. 2011.

REYNOLDS, S. J.; CHRISTIAN, K. A. Environmental Moisture Availability and Body Fluid Osmolality in Introduced Toads, Rhinella marina, in Monsoonal Northern Australia. **Journal of Herpetology**, v. 43, n. 2, p. 326–331, jun. 2009.

RODRIGUES, M. T. Herpetofauna da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds.). . **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária UFPE, 2003. p. 181–236.

ROMARIZ, D. A. **Aspectos da vegetação do Brasil**. São Paulo: [s.n.].

ROSE, W. **The Reptiles and Amphibians of Southern Africa**. Cape Town: Maskew Miller Press, 1962.

ROTH, J. J. Vascular supply to the ventral pelvic region of anurans as related to water balance. **Journal of Morphology**, v. 140, n. 4, p. 443–460, ago. 1973.

RUI, L. Energy Metabolism in the Liver. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 177–197.

RUIBAL, R.; HILLMAN, S. Cocoon Structure and Function in the Burrowing Hylid Frog, Pternohyla fodiens. **Journal of Herpetology**, v. 15, n. 4, p. 403–407, 1981.

RUIBAL, R.; LLOYD, T. J.; ROIG, V. The Terrestrial Ecology of the Spadefoot Toad Scaphiopus hammondii. **Copeia**, v. 1969, p. 571–584, 1969.

RYSER, J. Weight loss, reproductive output, and the cost of reproduction in the common frog, Rana temporaria. **Oecologia**, v. 78, p. 264–268, 1989.

SANTOS, J. W. A. D.; DAMASCENO, R. P.; ROCHA, P. L. B. D. Feeding Habits of the Frog Pleurodema Diplolistris (Anura, Leptodactylidae) in Quaternary Sand Dunes of the Middle Rio Sao Francisco, Bahia, Brazil. **Phyllomedusa**, v. 2, n. 2, p. 83–92, 2003.

SCAPIN, S.; GIUSEPPE, G. Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the frog Rana esculenta. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 107B, p. 189–195, 1994.

SCHILLER, T. M.; COSTANZO, J. P.; LEE, R. E. Urea production capacity in the wood frog (Rana sylvatica) varies with season and experimentally induced hyperuremia. **Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology**, v. 309, n. 8, p. 484–493, out. 2008.

SECOR, S. M. Physiological responses to feeding, fasting and estivation for anurans. **The Journal of experimental biology**, v. 208, n. Pt 13, p. 2595–2608, jul. 2005.

SETH, H.; GRÄNS, A.; SANDBLOM, E.; OLSSON, C.; WIKLANDER, K.; JOHNSSON, J.; AXELSSON, M. Metabolic scope and interspecific competition in sculpins of Greenland are influenced by increased temperatures due to climate change. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e62859, jan. 2013.

SEYMOUR, R. S. Gas exchange in spadefoot toad beneath the ground. **Copeia**, v. 1973, p. 452–460, 1973a.

SEYMOUR, R. S. Energy Metabolism of dormant spadefoot toadas. **Copeia**, v. 1973, p. 435–445, 1973b.

SEYMOUR, R. S. Physiological correlates of forced activity and burrowing in the Spade foot Toad. **Copeia**, v. 1973, p. 103–115, 1973c.

SHALAN, A. G.; BRADSHAW, S. D.; WITHERS, P. C.; THOMPSON, G.; BAYOMY, M. F. F.; BRADSHAW, F. J.; STEWART, T. Spermatogenesis and plasma testosterone levels in Western Australian burrowing desert frogs, Cyclorana platycephala, Cyclorana maini, and Neobatrachus sutor, during aestivation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 136, n. 1, p. 90–100, 2004.

SHOEMAKER, V. H. The effects of dehydration on electrolyte concentrations in a toad, Bufo marinus. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 13, p. 261–271, 1964.

SHOEMAKER, V. H. The stimulus for the water-balance response to dehydration in toads. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 15, n. 2, p. 81–88, jun. 1965.

SHOEMAKER, V. H. et al. Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: FEDER, M. E.; BURGGREN, W. (Eds.). . **Environmental physiology of the amphibian**. Chicago: University of Chicago, 1992. p. 125–150.

SHOEMAKER, V. H.; MCCLANAHAN, L. J.; RUIBAL, R. Seasonal Changes in Body Fluids in a Field Population of Spadefoot Toads. **Copeia**, v. 1969, p. 585–591, 1969.

SLATER, P.; MAIN, A. R. Notes on the biology of Notaden nicollsi Parker (Anura: Leptodactylidae). **Western Australian National**, v. 7, p. 163–166, 1963.

SMITH, C. L. Seasonal changes in blood sugar, fat body, liver glycogen and gonads in the common frog, Rana temporaria. **Journal of Experimental Biology**, v. 26, n. 412-429, 1950.

SOUSA, J. G. G.; ÁVILA, R. W. Body size, reproduction and feeding ecology of Pleurodema diplolister (Amphibia: Anura: Leiuperidae) from Caatinga, Pernambuco state, Northeastern Brazil. **Acta Herpetologica**, v. 10, n. 2, p. 129–134, 2015.

SOUZA REIS, A. C. D. Climate of Caatinga. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 48, p. 325–335, 1976.

SPENCER, B. **Report of the Horn Expedition to Central Australia**. Melbourne: Ford and Son, 1896.

STEWART, E. R.; REESE, S. A; ULTSCH, G. R. The physiology of hibernation in Canadian leopard frogs (Rana pipiens) and bullfrogs (Rana catesbeiana). **Physiological and biochemical zoology : PBZ**, v. 77, n. 1, p. 65–73, 2012.

STOREY, K. B. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 133, n. 3, p. 733–754, nov. 2002.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic Rate Depression and Biochemical Adaptation in Anaerobiosis, Hibernation and Estivation. **The Quarterly review of biology**, v. 65, n. 2, p. 145–174, 1990a.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Frozen and alive. **Scientific American**, v. 263, n. 6, p. 92–97, dez. 1990b.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 79, n. 1, p. 207–233, fev. 2004.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic regulation and gene expression during aestivation. In: **Progress in molecular and subcellular biology**. [s.l: s.n.]. v. 49p. 25–45.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Aestivation: signaling and hypometabolism. **The Journal of experimental biology**, v. 215, n. Pt 9, p. 1425–1433, maio 2012.

ST-PIERRE, J.; BOUTILIER, R. G. Aerobic capacity of frog skeletal muscle during hibernation. **Physiological and biochemical zoology : PBZ**, v. 74, n. 3, p. 390–397, 2001.

STUART, J.; BALLANTYNE, J. Importance of Ketone Bodies to the Intermediary Metabolism of the Terrestrial Snail, Archachatina ventricosa: Evidence from Enzyme Activities. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 117, n. 2, p. 197–201, jun. 1997.

SUAREZ, R. K. Upper limits to mass-specific metabolic rates. **Annual review of physiology**, v. 58, n. c, p. 583–605, jan. 1996.

TAIGEN, T. L.; POUGH, F. H. Prey Preference, Foraging Behavior, and Metabolic Characteristics of Frogs. **The American naturalist**, v. 122, n. 4, p. 509–520, 1983.

THORSON, T.; SVIHLA, A. Correlation of the Habitats of Amphibians with Their Ability to Survive the Loss of Body Water. **Ecology**, v. 24, n. 3, p. 374–381, 1943.

TINGLEY, R.; GREENLEES, M. J.; SHINE, R. Hydric balance and locomotor

performance of an anuran (Rhinella marina) invading the Australian arid zone. **Oikos**, v. 121, n. 12, p. 1959–1965, dez. 2012.

TOLEDO, R.; JARED, C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 105, n. 4, p. 593–608, ago. 1993.

TRACY, C. R. A Model of the Dynamic Exchanges of Water and Energy between a Terrestrial Amphibian and Its Environment. **Ecological Monographs**, v. 46, n. 3, p. 293–326, 1976.

TRACY, C. R.; REYNOLDS, S. J.; MCARTHUR, L.; TRACY, C. R.; CHRISTIAN, K. A. Ecology of Aestivation in a Cocoon-forming Frog, Cyclorana australis (Hylidae). **Copeia**, v. 2007, n. 4, p. 901–912, 2007.

TYLER, M.; ROBERTS, J.; DAVIES, M. Field Observations on Arenophryne Rotunda Tyler, a Leptodactylid Frog of Coastal Sandhills. **Wildlife Research**, v. 7, n. 2, p. 295, 1980.

UCHIYAMA, M.; KONNO, N. **Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians.General and comparative endocrinology**, maio 2006.

VANBEURDEN, E. K. Energy Metabolism of Dormant Australian Water-Holding Frogs (Cyclorana platycephalus). **Copeia**, v. 1980, n. 4, p. 787–799, 1980.

WARBURG, M. Studies on the water economy of some Australian frogs. **Australian Journal of Zoology**, v. 13, n. 2, p. 317, 1965.

WELLS, K. D. The Energetics of Calling in Frogs. In: RYAN, M. J. (Ed.). . **Anuran Communication**. Washington: Smithsonian Inst, 2001. p. 45–60.

WITHERS, P. Cocoon Formation and Structure in the Estivating Australian Desert Frogs, Neobatrachus and Cyclorana. **Australian Journal of Zoology**, v. 43, n. 5, p. 429, 1995.

WITHERS, P. C. Metabolic Depression During Estivation in the Australian Frogs, Neobatrachus and Cyclorana. **Australian Journal of Zoology**, v. 41, p. 467–473, 1993.

WITHERS, P. C.; GUPPY, M. Do Australian desert frogs co-accumulate counteracting solutes with urea during aestivation? **The Journal of experimental biology**, v. 199, n. Pt 8, p. 1809–1816, ago. 1996.

WITHERS, P. C.; HILLMAN, S. S. Allometric and ecological relationships of ventricle and liver mass in anuran amphibians. **Functional Ecology**, v. 15, n. 1, p. 60–69, 2001.

WITHERS, P. C.; THOMPSON, G. G. Cocoon formation and metabolic depression by the aestivating hylid frogs Cyclorana australis and Cyclorana cultripes (Amphibia: Hylidae). **Journal of the Royal Society of Western Australia**, v. 83, n. 1, p. 39–40, 2000.

YOUNG, K. M. ; CRAMP, R. L.; WHITE, C. R.; FRANKLIN, C. E. Influence of elevated temperature on metabolism during aestivation: implications for muscle disuse atrophy. **The Journal of experimental biology**, v. 214, n. Pt 22, p. 3782–3789, nov. 2011.

ZAMMIT, V. A.; NEWSHOLME, E. A. Activities of enzymes of fat and ketone-body metabolism and effects of starvation on blood concentrations of glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish. **Biochemical Journal**, v. 184, p. 313–322, 1979.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th Editio ed. New Jersey: Prentice Hall, 2010.