

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências - Departamento de Fisiologia Geral
Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Geral)

Lídia Sumie Yano

**Efeitos de altas temperaturas e do termoperíodo
sobre a capacidade metabólica dos tecidos de
rãs-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).**

São Paulo

2023

Lídia Sumie Yano

**Efeitos de altas temperaturas e do termoperíodo
sobre a capacidade metabólica dos tecidos de
rãs-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).**

Effects of high temperature and termoperiod in tissue metabolic
capacity in the bullfrog *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802).

Versão Original

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Fisiologia Geral

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:
'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Yano, Lidia Sumie.
Efeitos de altas temperaturas e do termoperíodo sobre a capacidade metabólica dos tecidos de rãs touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). / Lidia Sumie Yano ; orientadora Silvia Cristina Ribeiro de Souza ; coorientador Fernando Ribeiro Gomes -- São Paulo, 2023.
82 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas (Fisiologia).

1. Aquecimento global. 2. Anfíbios. 3. Metabolismo energético. 4. Atividade enzimática. 5. Capacidade aeróbia. I. de Souza, Silvia Cristina Ribeiro, orient. II. Gomes, Fernando Ribeiro, coorient. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

YANO, L. S. Efeitos de altas temperaturas e do termoperíodo sobre a capacidade metabólica dos tecidos de rãs touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). 2023.
Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo suporte nos momentos difíceis e alegria nos momentos de comemoração e ao meu companheiro Lucas Henrique por ter escolhido batalhar ao meu lado nesta vida e estar sempre presente em todas as situações.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Silvia Cristina Ribeiro de Souza, por gentilmente me acolher em seu laboratório, por todos os ensinamentos e por sua dedicação em acompanhar de perto o meu trabalho e me auxiliar da melhor forma possível.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes e à Prof^a Dr^a Gisele Akemi Oda pelo suporte, acompanhamento, dicas e discussões para melhorar meu trabalho e amadurecer ideias.

Aos colegas de laboratório Beatriz, Bruno e Marina pelo trabalho duro na construção do sistema de circulação de água, na realização dos experimentos e nas discussões de ideias. Ao Gabriel também pela sua paciência e participação ativa na construção do sistema e na programação do Arduíno e pelas dicas preciosas sobre a manutenção dos animais.

Agradeço também aos funcionários do Instituto de Biociências, em especial aos técnicos do Departamento de Fisiologia (Vagner, Manoel e Márcio), aos integrantes e alunos do Laboratório de Comportamento e Fisiologia Evolutiva, do Laboratório Binacional Argentina-Brasil de Cronobiologia, do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos e do Laboratório de Neurociência e Comportamento pelo auxílio em diversas atividades e participação ao longo dos experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Nos anfíbios, a flexibilidade dos mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta a mudanças na temperatura determina a sua sobrevivência aos desafios ambientais. Entretanto, a previsibilidade dos efeitos do aquecimento global nos anfíbios ainda é alvo de controvérsia. Muitos estudos analisaram os efeitos de altas temperaturas em regime constante, condição distinta da variação cíclica que ocorre no ambiente natural. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de altas temperaturas sobre a capacidade metabólica de órgãos e tecidos da rã *L. catesbeianus*, comparando-se o regime constante ao regime com termociclo diário. Rãs macho (massa corpórea = 176 ± 23 g) foram mantidas isoladas em um sistema de recirculação de água e alimentadas com ração para peixe e baratas vivas. As rãs foram mantidas em temperatura constante de 23 °C por 7 dias; após, um grupo foi morto por decapitação (T23; n= 6) e as restantes foram expostas à 30 °C (T30; n= 9) ou a temperaturas diárias variando de 25 a 30°C (T25-30; n= 9) por 20 dias e então foram mortas. A massa dos órgãos foi medida e o teor de substratos energéticos e a atividade máxima (Vmax) de enzimas foram analisados em amostras de tecidos. O teor lipídico foi analisado por gravimetria e o teor de glicogênio e a Vmax de enzimas foram medidos por espectrofotometria à 23 e à 30 °C. A massa corpórea e a massa relativa do ventrículo cardíaco, do fígado e dos corpos gordurosos não diferem entre os grupos, porém, a massa relativa do intestino médio e dos rins é menor nos grupos T30 e T25-30 em relação ao T23, sugerindo um efeito de altas temperaturas no metabolismo proteico destes tecidos. O teor lipídico do músculo esquelético e do fígado não difere entre os grupos, porém, a concentração de glicogênio é menor no músculo esquelético do T25-30 e maior no fígado do T30. No músculo esquelético, a Vmax da GPtotal não difere entre os grupos e a Vmax da PK e LDH é maior no T30. No fígado, a Vmax da GPtotal, LDH e HOAD não difere entre os grupos, porém a Vmax da GPa e da PK é menor no T30. Destaca-se, ainda, a menor Vmax da CS no coração das rãs T30 e no fígado das rãs T30 e T25-30. Não há evidências de alteração da sensibilidade térmica das enzimas (Q10) nos ensaios realizados à 23 e 30 °C. Os dados indicam aumento do catabolismo de carboidratos e do uso de glicose como fonte de energia no músculo esquelético em repouso; em contraste, indicam inibição da glicogenólise e acúmulo de carboidratos no fígado das rãs expostas a altas temperaturas. Assim, dada a reduzida capacidade aeróbia das rãs em temperatura elevada, os carboidratos possivelmente desempenham um importante papel na tolerância térmica. No longo prazo, a redução do potencial de fosforilação oxidativa do coração e do fígado em altas temperaturas pode causar prejuízos a processos e funções vitais.

Palavras-chave: Aquecimento global, Anfíbios, Metabolismo energético, Atividade enzimática, Capacidade aeróbia.

Abstract

In amphibians, the flexibility of physiological mechanisms involved in the response to changes of temperature determines their survival to environmental challenges. However, the predictability of the effects of global warming on amphibians is still controversial. Many studies have analyzed the effects of high temperature under constant regimen, a condition which differs from the cyclical variation that occurs in the natural environment. The present study aimed to investigate the effects of high temperature on the metabolic capacity of organs and tissues of *L. catesbeianus* frogs under constant and cyclic regimens. Juvenile male frogs (body mass = 176 ± 23 g) were kept isolated in a water recirculation system and were fed with fish food and live cockroaches. Frogs were kept at 23 °C for 7 days; after, one group was killed by decapitation (T23; n= 6), and the remaining frogs were exposed to constant 30 °C (T30; n= 9) or to temperatures ranging daily from 25 to 30 °C (T25-30; n= 9), for 20 days, and then were killed. The organs mass was measured, and the content of energy substrates and maximum enzymes activity (V_{max}) were analyzed in tissue samples. The lipid content was analyzed by gravimetry, and the glycogen content and the V_{max} of enzymes were measured by spectrophotometry at 23 °C and 30 °C. The body mass and the relative mass of the cardiac ventricle, liver and fat bodies do not differ between groups, however the relative mass of the midgut and kidneys is lower in T30 and T25-30 compared to T23, suggesting an effect of elevated temperatures on the protein metabolism in these tissues. The lipid content of skeletal muscle and liver does not differ between groups, however glycogen concentration is lower in skeletal muscle of T25-30 and higher in liver of T30 frogs. In skeletal muscle, V_{max} of GPtotal does not differ between groups, whereas V_{max} of PK and LDH is higher in T30. In the liver, V_{max} of GPtotal, LDH and HOAD is similar between groups, however V_{max} of GPa and PK is lower in T30 frogs. Noteworthy, V_{max} of CS is lower in the heart of T30 and in the liver of 30 and T25-30 groups of frogs. There is no evidence of changes of thermal sensitivity of enzymes (Q_{10}) in the assays performed at 23 and 30 °C. The data indicate an increase of carbohydrate catabolism and glucose use as energy source in the muscle at rest; in contrast, they indicate inhibition of glycogenolysis and accumulation of carbohydrates in the liver of frogs exposed to high temperatures. Thus, given the reduced aerobic capacity of frogs at elevated temperatures, carbohydrates possibly play an important role in thermal tolerance. However, the reduced oxidative phosphorylation potential of heart and liver tissues under high temperatures can impair vital processes and functions in the long term.

Key-words: Global warming, Amphibians, Energy metabolism, Enzyme activity, Aerobic capacity

Lista de ilustrações

- Figura 1** - Variação diária da temperatura da água no ranário em que as rãs *L. catesbeianus* foram cultivadas.26
- Figura 2** - Esquema geral de uma estante com o sistema termostático de circulação de água, mostrando a disposição dos equipamentos e acessórios28
- Figura 3** - Imagens fotográficas de uma estante com o sistema termostático de circulação de água.28
- Figura 4** - Acima, esquema representativo do balde utilizado para alojar as rãs no sistema de circulação de água, com destaque para a vista superior da tampa do balde. Abaixo à esquerda, foto com vista superior de uma rã parcialmente submersa na água no interior do balde, e à direita, foto com vista superior de uma rã totalmente exposta ao ar em cima do pote que serve como plataforma de emersão.....30
- Figura 5** - Esquema geral dos regimes térmicos usados nos experimentos com rãs touro *L. catesbeianus*.32
- Figura 6** - Temperaturas da água e do ar registradas durante a exposição crônica da rã-touro *L. catesbeianus* a diferentes regimes térmicos.33
- Figura 7** - Imagens fotográficas do modelo em ágar usado para estimar os efeitos da exposição aos regimes térmicos sobre a temperatura corpórea de rãs *L. catesbeianus*.35
- Figura 8** - Variação da temperatura interna em modelos de ágar expostos ao regime cíclico de temperatura, utilizando o protocolo dos experimentos realizados com a rã *L. catesbeianus*.35
- Figura 9** - Esquema geral ilustrando as enzimas e vias metabólicas analisadas nos tecidos da rã-touro.40
- Figura 10** - Ingestão voluntária de alimento por massa corpórea em rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos.44
- Figura 11** - Massa relativa dos órgãos de rãs *L. catesbeianus* cronicamente expostas a diferentes regimes térmicos.45
- Figura 12** - Concentração de glicogênio e glicose livre ($\text{mg} \cdot \text{g} \text{ tecido}^{-1}$) nos músculos tríceps femoral e gastrocnêmio e no fígado de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos..49
- Figura 13** - Atividade máxima (V_{max}) de enzimas no músculo esquelético (tríceps femoral) de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos.50
- Figura 14** - Atividade máxima (V_{max}) de enzimas no ventrículo cardíaco de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes tratamentos térmicos.51
- Figura 15** - Atividade máxima (V_{max}) de enzimas no fígado de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos.54

Lista de tabelas

- Tabela 1** - Temperaturas médias da água e do ar registradas durante a exposição crônica da rã-touro *L. catesbeianus* a diferentes regimes térmicos.33
- Tabela 2** - Massa corpórea (g) e massa relativa dos órgãos (%) de rãs *L. catesbeianus* cronicamente expostas a diferentes regimes térmicos.....46
- Tabela 3** - Concentração de lipídios ($\text{mg} \cdot \text{g tecido}^{-1}$) nos músculos tríceps femoral e gastrocnêmio e no fígado de rãs *L. catesbeianus* cronicamente expostas a diferentes regimes térmicos.47
- Tabela 4** - Concentração de glicogênio e glicose livre ($\text{mg} \cdot \text{g tecido}^{-1}$) nos músculos tríceps femoral e gastrocnêmio) e no fígado de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos.48
- Tabela 5** - Efeito termodinâmico (Q10) nas taxas de reação de enzimas do músculo esquelético (tríceps femoral) e cardíaco de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos.51
- Tabela 6** - Análise de variância (ANOVA 'two way') dos dados de atividade máxima (V_{max}) de enzimas no músculo esquelético e cardíaco de rãs *L. catesbeianus*, em função do regime térmico (Fator 1) e da temperatura de ensaio das enzimas (Fator 2).
.....53
- Tabela 7** - Razão entre as atividades máximas de enzimas (V_{max}) medidas à 23 °C no músculo esquelético e cardíaco e no fígado de rãs *L. catesbeianus* expostas a diferentes regimes térmicos.55

Lista de Siglas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADP	Adenosina-5-difosfato
AG	Amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3)
AMP	Adenosina-5-monofosfato
ATP	Adenosina-5-trifosfato
CoA	Coenzima A
CORT	Corticosteróide
CS	Citrato sintase (E.C. 4.1.3.7)
DTNB	Reagente de Ellman ou 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
F1,6P ₂	Frutose 1,6 bisfosfato
G6PDH	Glicose 6 fosfato desidrogenase
GP	Glicogênio fosforilase (E.C. 2.4.1.1)
HK	Hexoquinase (E.C. 2.7.1.1)
HMTL	Hierarchical Mechanisms of Thermal Limitation
HOAD	β- Hidroxiacil-desidrogenase (E.C. 1.1.1.35)
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPI	Hipotálamo-hipófise-interrenal
LDH	Lactato desidrogenase (E.C. 1.1.1.27)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OCLTT	Oxygen- and Capacity-Limited Thermal Tolerance
OXA	Oxaloacetato
PCA	Ácido perclórico
PEP	Fosfo(enol)piruvato
PIR	Piruvato
PK	Piruvato quinase (E.C. 2.7.1.40)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
Q10	Coeficiente de temperatura
T23	Grupo de animais expostos à 23°C em regime constante
T25-30	Grupo de animais expostos à 25 - 30°C em regime com termociclo diário
T30	Grupo de animais expostos à 30°C em regime constante
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
PM	Peso molecular
Δ Abs	Variação de absorbância
ε	Coeficiente de absorção molar
d	Distância percorrida pelo feixe de luz
V _{max}	Velocidade máxima da reação enzimática
U	Unidade de atividade enzimática
ANOVA	Análise de variância

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1. Animal experimental.....	26
2.2. Sistema termostático de circulação de água.....	27
2.2.1. Instalação hidráulica e equipamentos.....	27
2.2.2. Controle e registro de temperatura	30
2.3. Regimes térmicos e protocolo experimental	31
2.3.1. Medidas de temperatura em modelos de ágar	34
2.3.2. Alimentação das rãs e outras rotinas.....	36
2.4. Análise da concentração de substratos metabólicos	37
2.4.1. Lipídios totais.....	37
2.4.2. Glicose e Glicogênio	37
2.5. Medida da atividade enzimática máxima (V_{max})	39
2.6. Análise estatística	42
3. RESULTADOS.....	44
3.1. Efeitos dos regimes térmicos na massa corpórea e dos órgãos.....	44
3.2. Efeitos dos regimes térmicos no teor de substratos metabólicos	47
3.3. Efeitos dos regimes térmicos na atividade enzimática máxima (V_{max}).....	50
4. DISCUSSÃO	56
4.1. Temperatura elevada em regime constante versus cíclico	56
4.2. Alimentação, alterações da massa dos órgãos e do conteúdo de substratos em temperatura elevada	57
4.3. Reorganização do metabolismo de carboidratos em temperatura elevada	61
4.4. Redução da capacidade aeróbia em temperatura elevada.....	64
5. CONCLUSÕES.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

ANEXO	80
-------------	----

1. INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas têm causado um aumento da temperatura ambiental e da frequência com que ocorrem eventos térmicos extremos, portanto, os organismos estão cada vez mais sujeitos a vivenciar temperaturas que ultrapassam os limites fisiológicos (DIFFENBAUGH; FIELD, 2013; SUNDAY; BATES; DULVY, 2012). As mudanças climáticas afetam diretamente a fisiologia e o desempenho individual, especialmente nos animais ectotérmicos, cuja temperatura corporal é em grande parte determinada pela temperatura ambiental (HOCHACHKA; SOMERO, 2002). Entretanto, no longo prazo, os ectotermos possuem a capacidade de alterar de forma flexível os processos bioquímicos que respondem a mudanças da temperatura ambiental (plasticidade fenotípica), o que, por sua vez, determina a capacidade destes animais de se adequar às mudanças (ANGILLETTA, 2009; JOHNSTON; TEMPLE, 2002; SEEBACHER; WHITE; FRANKLIN, 2015; WILSON; FRANKLIN, 2002). Apesar da sua importância, a plasticidade fenotípica raramente é levada em conta nos cálculos de risco do superaquecimento para populações que vivem em diferentes habitats ou para diferentes grupos taxonômicos (DUARTE et al., 2012). Embora o número de espécies estudadas seja reduzido, as evidências indicam que o risco de superaquecimento será pouco diminuído pela aclimação nos ectotermos, mesmo nos grupos mais plásticos (GUNDERSON; STILLMAN, 2015).

Nos vertebrados, a percepção do estresse ocorre inicialmente no sistema nervoso central e os hormônios do eixo neuroendócrino do estresse são os principais mediadores das respostas fisiológicas e comportamentais (DENVER, 2009). Em resposta aos estressores, o sistema nervoso simpático estimula a síntese das catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) que são secretadas pelas células cromafins da glândula interrenal dos anfíbios (HERMAN, 1977). Além disso, nos anfíbios também ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI; homólogo ao eixo HPA de mamíferos e aves), responsável pela mediação da resposta do animal ao seu ambiente. Após a percepção do agente estressor, o hipotálamo produz o hormônio liberador de corticotrofina, que estimula a hipófise a produzir o hormônio corticotrofina. Por sua vez, a corticotrofina atua nas células do córtex da glândula interrenal, onde estimula a produção de hormônio corticosteroide (CORT) nas células

esteroidogênicas, e esse hormônio liga-se ao receptor nos tecidos e ativa uma cascata de mudanças fisiológicas e comportamentais (DE ANDRADE; BEVIER; DE CARVALHO, 2016; ROLLINS-SMITH, 2017; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; SOPINKA et al., 2015). Desse modo, o estresse agudo pode desencadear inúmeros efeitos mediados por hormônios, tais como maior mobilização de energia para a atividade muscular, melhora no suprimento de substratos para o músculo através do tônus cardiovascular aumentado, ativação da função imune, inibição da reprodução, diminuição do apetite e da ingestão de alimento, aumento da perfusão e da utilização de glicose no cérebro, dentre outros (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Os efeitos podem ser sustentados por um curto espaço de tempo, porém, a longo prazo eles podem resultar em dificuldades de recuperação pós-estresse ou mesmo na morte do animal (MOBERG; MENCH, 2000). Em anfíbios, a exposição crônica ou repetida a altas temperaturas pode levar ao aumento da linha de base da corticosterona ou à redução da magnitude de resposta ao hormônio, evidenciando um papel do eixo HPI na resposta ao estresse térmico (NARAYAN; HERO, 2014).

Os efeitos deletérios causados por altas temperaturas podem ocorrer em diferentes níveis de organização e, de um modo geral, funções sistêmicas são prejudicadas em temperaturas abaixo daquelas que afetam diretamente o desempenho de seus componentes subcelulares (PÖRTNER et al., 2006). Pörtner e colaboradores formularam uma hipótese para explicar o modo como a elevação da temperatura afeta os organismos aquáticos, inicialmente proposta para peixes, a qual se baseia no conceito de tolerância térmica limitada por oxigênio e por capacidade (OCLTT - Oxygen- and Capacity-Limited Thermal Tolerance). De acordo com este conceito, a demanda de oxigênio para o metabolismo aeróbico em altas temperaturas supera a capacidade dos sistemas cardiovascular e respiratório de fornecer oxigênio aos tecidos (PÖRTNER, 2002; PÖRTNER; BOCK; MARK, 2017; PÖRTNER; KNUST, 2007). O aumento da demanda de oxigênio e energia em altas temperaturas ocorre devido ao efeito cinético sobre as taxas de reações químicas, medido pelo coeficiente Q₁₀, e também devido às respostas de restauração da homeostase celular durante e após o estresse térmico (KÜLTZ, 2005). Esse aumento na demanda por oxigênio geralmente causa uma diminuição no escopo aeróbico do organismo e, portanto, a capacidade de aclimação pode ser essencial para que o organismo mantenha o desempenho fisiológico diante de mudanças da temperatura ambiental (SOMERO, 2010).

A teoria OCLTT foi proposta originalmente para ectotermos aquáticos e estudos realizados posteriormente mostraram que a mesma não se aplica a alguns anfíbios adultos e aos grupos taxonômicos terrestres (GANGLOFF; TELEMECO, 2018). Por exemplo, o consumo de oxigênio, a saturação de oxigênio arterial e a concentração de hemoglobina não se alteram no sapo *Rhinella marina* aclimatado a temperaturas próximas da crítica máxima (OVERGAARD et al., 2012; SEEBACHER; FRANKLIN, 2011; WINWOOD-SMITH et al., 2015). Recentemente, Gangloff e Telemeco (2018) propuseram uma hipótese integrativa, baseada no conceito de mecanismos hierárquicos de limitação térmica (HMTL – Hierarchical Mechanisms of Thermal Limitation), o qual incorpora a ideia de que a capacidade de difusão e transporte de oxigênio definem o escopo aeróbico em temperaturas abaixo do valor crítico e, ao mesmo tempo, reconhece a importância dos mecanismos subcelulares como determinantes de limites térmicos absolutos, tais como a temperatura crítica máxima e a temperatura letal. O comprometimento no nível subcelular resulta tanto da desnaturação de moléculas-chave, como enzimas e membranas celulares, quanto da redução da eficiência dessas moléculas para o desempenho de suas funções (Revisão em ANGILLETTA, 2009; CHUNG; SCHULTE, 2015; HOCHACHKA; SOMERO, 2002). Esse comprometimento, por sua vez, resulta na falha de funções que ocorrem em níveis de organização mais elevados e levaria a uma rápida perda de desempenho. Nesse contexto, pesquisas que analisem os efeitos de altas temperaturas em processos que ocorrem em diferentes tecidos e diferentes níveis de organização são de grande importância para expandir esta discussão.

Muitos estudos sobre os efeitos da temperatura em ectotermos utilizam temperaturas constantes, condição distinta das variações observadas no ambiente natural e que pode não responder com precisão à questão sobre como estes animais se adaptam à temperatura na natureza (CAREY, 1979; MORASH et al., 2018). Bartheld e colaboradores (2017) observaram que girinos aclimatados à temperatura fixa de 20 °C, frequente no ambiente natural desses animais, exibem uma curva de desempenho na natação elevada em relação a girinos aclimatados a mesma temperatura com uma variação de 1,5 °C. Tendo em vista esse cenário, um número crescente de estudos tem utilizado protocolos com variação térmica diária para analisar os efeitos de temperaturas elevadas em relação ao regime constante e os padrões de resposta encontrados são, em geral, contrastantes. Alguns autores reportaram um maior aumento da demanda metabólica em resposta a temperaturas

elevadas no regime cíclico em relação ao regime constante e sugeriram que o maior gasto energético no regime cíclico poderia afetar negativamente o desempenho, incluindo o crescimento, o desenvolvimento, a atividade de enzimas metabólicas e o forrageio ou a fuga de predadores (ARRIGHI et al., 2013; BOZINOVIC et al., 2013; DONG et al., 2006; DU; FENG, 2008; KERN; CRAMP; FRANKLIN, 2015; RAYNAL et al., 2022; WILLIAMS et al., 2012). De outro modo, alguns autores reportaram uma melhora do desempenho no regime cíclico, como um maior crescimento populacional, uma maior taxa de desenvolvimento e um maior tamanho corporal (BOZINOVIC et al., 2011; DONG et al., 2006; KINGSOLVER; RAGLAND; DIAMOND, 2009). Estes padrões distintos podem ser explicados, em grande parte, pelo fato de que a curva de desempenho é uma função não linear da temperatura e esta propriedade resulta no efeito conhecido como desigualdade de Jansen (Revisão em DENNY, 2017). De acordo com este efeito, a média do desempenho de animais expostos a temperaturas variáveis é diferente do desempenho de animais expostos a uma temperatura intermediária e ambos diferem do desempenho na temperatura mais alta do ciclo. Além disso, as diferenças dependem de onde a temperatura média se situa em relação à temperatura crítica (RUEL; AYRES, 1999) e a faixa de variação da temperatura do regime cíclico. Em girinos, a exposição crônica a um regime cíclico de temperaturas que ocorrem no ambiente natural resultou em aumento de atividade de enzimas metabólicas, porém, o efeito oposto foi observado quando as temperaturas eram próximas do limite térmico dos animais (KERN; CRAMP; FRANKLIN, 2015).

Outro fator que contribui para os diferentes padrões de resposta à temperatura em regime cíclico e constante é o tempo de exposição. Em peixes, por exemplo, a exposição de curto prazo (menos de 5 dias) a temperaturas elevadas no regime cíclico induziu uma resposta catabólica, como seria de esperar durante períodos de estresse; porém, à medida que os ciclos térmicos se repetiram ao longo dos dias, processos de custo energético elevado, como a síntese proteica, foram reativados e os estoques de energia recuperados (CALLAGHAN et al., 2016). Segundo os autores, os peixes foram capazes de remodelar o seu metabolismo em antecipação ao estresse ambiental mais prolongado. Em síntese, diferenças metodológicas influenciam as conclusões dos estudos sobre a capacidade de manutenção da homeostase diante do estresse térmico (Revisão em ØRSTED; JØRGENSEN; OVERGAARD, 2022).

Além de diferenças metodológicas, diferenças interespecíficas influenciam as conclusões em estudos que analisam os efeitos das mudanças climáticas. Estudos

sugerem, por exemplo, que ectotermos de regiões tropicais são mais vulneráveis ao aquecimento, pelo fato de que a plasticidade na tolerância térmica diminui conforme diminuem a latitude e a sazonalidade térmica (HUEY et al., 2009; BOZINOVIC, 2011); outros sugerem que a plasticidade é menor em animais que vivem em ambientes extremos e possuem alta tolerância térmica (SOMERO, 2010; STILLMAN, 2003). Recentemente, modelos matemáticos têm sido utilizados para prever os efeitos do aquecimento global sobre a distribuição e sobrevivência das espécies (DILLON; WANG; HUEY, 2010; HUEY et al., 2012). Apesar dos dados sobre os anfíbios ainda serem escassos para prever padrões dos efeitos do aquecimento global (SEEBACHER; WHITE; FRANKLIN, 2015), estudos indicam uma tendência deste grupo taxonômico ao declínio e à extinção (BLAUSTEIN et al., 2012; WAKE; VREDENBURG, 2008). Por outro lado, espécies de anfíbios invasoras e que apresentam uma alta taxa de sucesso na ocupação de novos ambientes são exemplos de como a plasticidade fenotípica frente às mudanças ambientais favorecem o crescimento, a reprodução e outras funções vitais (KAEFER; BOELTER; CECHIN, 2007; SEEBACHER; FRANKLIN, 2011; WAKE; VREDENBURG, 2008). Em 1935, 300 casais de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) do Canadá foram introduzidos no Brasil no ranário Aurora, localizado no estado do Rio de Janeiro, na época o maior ranário da América do Sul (FERREIRA; PIMENTA; NETO, 2002). As condições tropicais e subtropicais favoreceram esta espécie, que apresenta um desempenho metabólico melhorado devido às temperaturas ambientais mais altas (CUNHA; DELARIVA, 2009). Nestas condições, o alto potencial invasor da espécie provavelmente está associado a características reprodutivas como desenvolvimento contínuo de gônadas, período de reprodução prolongado, alta fecundidade e maturidade sexual precoce (KAEFER; BOELTER; CECHIN, 2007). Desse modo, estudos sobre os efeitos de altas temperaturas associadas à variação térmica diária podem contribuir para o entendimento das consequências das mudanças ambientais nessas rãs invasoras e nos anfíbios de um modo geral.

No presente estudo, nós analisamos os efeitos da exposição crônica a altas temperaturas sobre o metabolismo energético de tecidos da rã-touro *Lithobates catesbeianus*, comparando-se rãs expostas a três regimes térmicos distintos: 23 °C constante (**T23**), 30 °C constante (**T30**), e termociclo diário com temperaturas variando entre 25 e 30 °C (**T25-30**). Considerando a relativa estabilidade térmica no ambiente em que *L. catesbeianus* é cultivada, com média diária em torno de 22 °C no verão

(Figura 1), nós hipotetizamos que a exposição à 30 °C em regime constante ou cíclico aumentará a demanda metabólica e, conseqüentemente, haverá aumento da ingestão de alimento, diminuição do teor de substratos armazenados e aumento da atividade das enzimas metabólicas nos tecidos das rãs. Adicionalmente, nós formulamos a hipótese de que os efeitos no regime cíclico seriam mais severos e possivelmente distintos em relação ao regime constante. Esta hipótese de diferença entre os regimes baseia-se na premissa de que, no regime cíclico, a amplitude de variação térmica diária corresponderia a uma condição de estresse agudo que se repete ao longo dos dias, retardando respostas de aclimatação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animal experimental

Indivíduos machos adultos da rã-touro *Lithobates catesbeianus* (n= 24) foram adquiridos do ranário Rãs' World, localizado na cidade de São Paulo (23°28'5.945"S, 46°41'59.402"O), em janeiro de 2020. As rãs foram transportadas até o laboratório e alojadas em uma caixa plástica de 150 litros, contendo pedras e um volume de água sem cloro correspondente a uma coluna de aproximadamente 8 cm de altura, onde foram mantidas à 22 °C e fotoperíodo natural, durante 24 horas. Esta etapa teve o objetivo de reduzir o conteúdo de alimento e fezes no trato digestório das rãs, e de reduzir o estresse causado pelo transporte. Em seguida, as rãs foram pesadas e alojadas individualmente no sistema de circulação de água, que será descrito no próximo item.

A temperatura da água no ranário onde as rãs *L. catesbeianus* foram cultivadas foi registrada durante um mês no verão, usando um 'data logger' (HOBO Pendant® UA-001-64), obtendo-se valores de referência da temperatura no ambiente natural das rãs. Conforme ilustrado na **Figura 1**, a média diária no período foi de $21,6 \pm 1,9$ °C, sendo que a menor e a maior média de temperatura registradas em 24h foram $20,3 \pm 1,4$ °C (às 8h) e $23,2 \pm 2,1$ °C (às 18h), respectivamente.

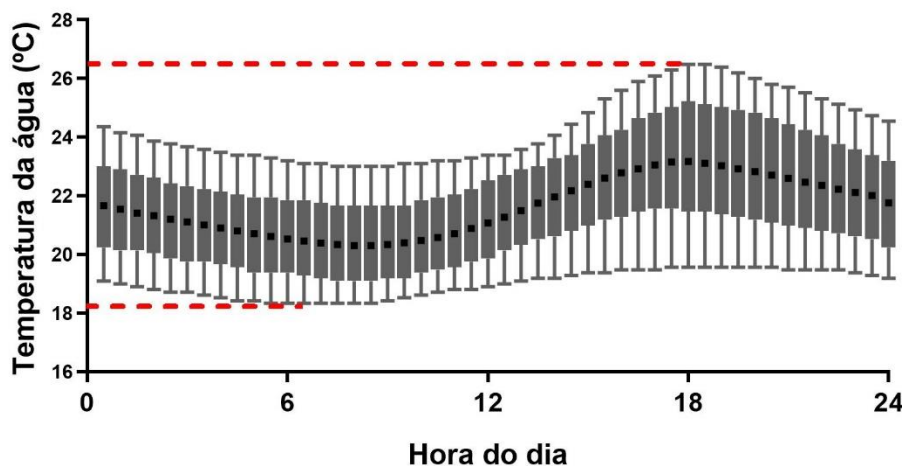


Figura 1 - Variação diária da temperatura da água no ranário em que as rãs *L. catesbeianus* foram cultivadas. Os dados foram coletados durante 30 dias, a intervalos de meia hora, em fevereiro de 2020. Os pontos representam a média das temperaturas registradas em cada horário, as caixas em cinza representam o DP e as linhas acima e abaixo das caixas representam a temperatura máxima e mínima registradas em cada horário. As linhas tracejadas indicam a temperatura máxima e mínima ao longo de todo o período.

2.2. Sistema termostático de circulação de água

2.2.1. Instalação hidráulica e equipamentos

O sistema termostático de circulação de água utilizado no presente estudo foi construído no biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), em parceria com Gabriel Massami Izumi de Freitas, pós-graduando do Departamento de Zoologia, IB-USP. A estrutura de apoio do sistema é composta de duas estantes de madeira, cada uma com dois andares: a Estante 1, medindo 2,45 m de comprimento e 1,80 m de altura, com capacidade para alojar 14 rãs, e a Estante 2, medindo 1,80 m de comprimento e 1,80 m de altura, com capacidade para alojar 10 rãs (**Fig. 2**). A água circula no sistema através de canos e registros de PVC, mangueiras de silicone e baldes instalados nas prateleiras das estantes. Adicionalmente, a água circula através de dois reservatórios de 100 - 150 litros apoiados no piso, embaixo das estantes, um deles contendo uma bomba submersa (Sunsun JEP-8000, 8000L/h e Sarlobetter SB2700, 2740L/h) e um aquecedor com termostato, e o outro contendo os elementos de filtragem da água (ver detalhes abaixo). A água filtrada e na temperatura adequada é bombeada do reservatório em direção ao topo da estante, onde o excesso de fluxo é dissipado através de um 'ladrão', e então a água se distribui para os dois andares por gravidade. O fluxo de água é regulado na entrada de cada balde com o auxílio de válvulas e torneiras, mantendo-se em torno de 600 ml por minuto. Uma torneira instalada nos baldes, a uma altura de 8cm em relação ao fundo, permite a contínua vazão de água e a manutenção de um volume de aproximadamente 5,7L no seu interior (**Fig. 2**). A água que escoar dos baldes é drenada por uma calha até o reservatório que contém os elementos filtrantes e, após a filtragem, chega ao reservatório contendo a bomba que promove a recirculação da água.

A luminosidade da sala de experimentos é proporcionada por uma combinação de luz natural, que penetra através das janelas, e luz artificial proveniente de duas lâmpadas vermelhas (**Fig. 3**). As lâmpadas vermelhas permanecem acesas de dia e à noite, possibilitando a realização de atividades noturnas como a inspeção e alimentação dos animais e filmagens destinadas a um estudo paralelo, sobre o comportamento das rãs.

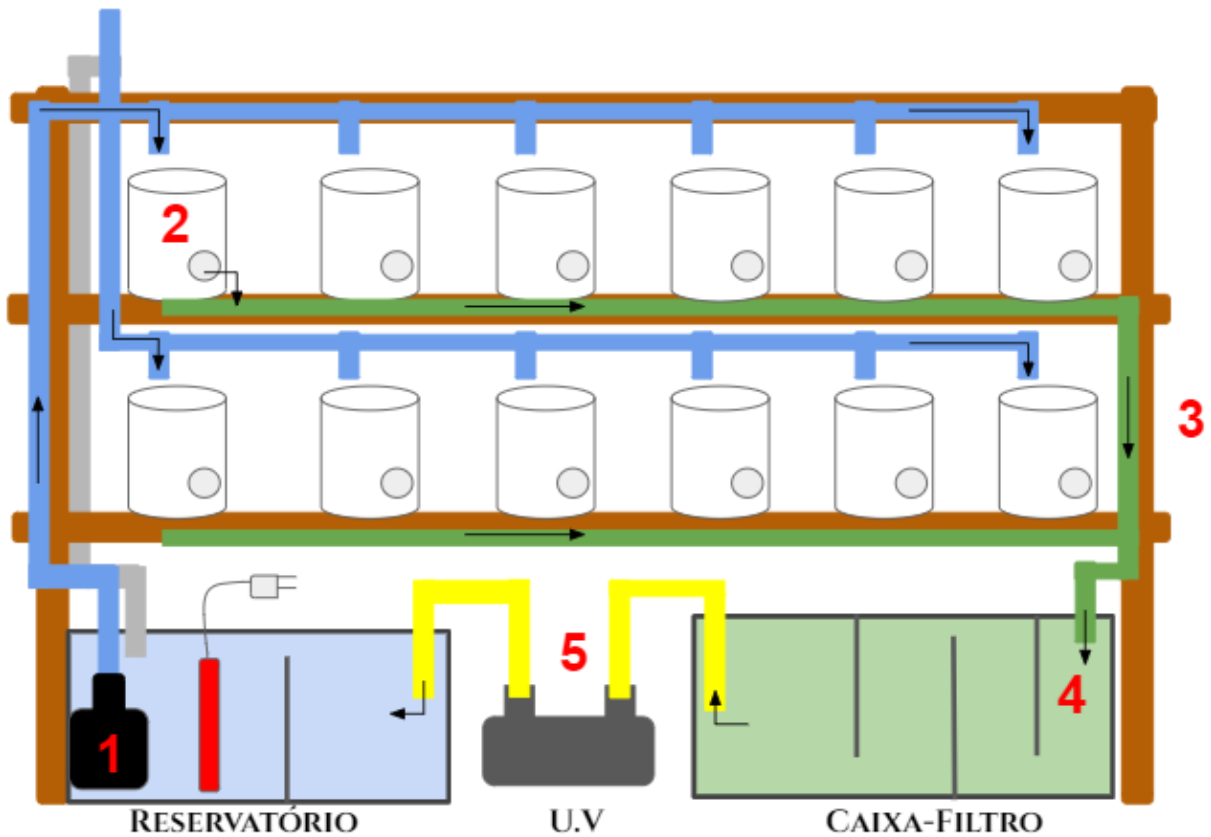


Figura 2 - Esquema geral de uma estante com o sistema termostático de circulação de água, mostrando a disposição dos equipamentos e acessórios (ver texto para detalhes). 1- Reservatório com aquecedor e bomba submersa; 2- Baldes de manutenção das rãs; 3- Calha e tubos de escoamento da água dos baldes; 4- Reservatório com elementos de filtração (filtro mecânico, biológico e químico; ver texto para detalhes); 5- Filtro U.V.



Figura 3 - Imagens fotográficas de uma estante com o sistema termostático de circulação de água. À esquerda, detalhe da luminosidade da sala no período diurno, proporcionada por luz natural e por duas lâmpadas vermelhas; à direita, detalhe da luminosidade no período noturno, proporcionada apenas pelas lâmpadas vermelhas.

Os baldes utilizados para alojar as rãs são de plástico branco opaco e medem 37 cm de altura e 30 cm de diâmetro e volume de 20 litros (**Fig. 4**). Os baldes são fechados por uma tampa que possui um orifício coberto por tela removível, possibilitando a alimentação e inspeção das rãs. A água ingressa no balde através de uma mangueira que se estende até o fundo, causando mínima turbulência, e escoar através de uma torneira instalada a uma altura de cerca de 8 cm em relação ao fundo. Um conjunto de válvulas e torneiras permite que cada balde seja desconectado sem que haja interrupção do fluxo de água no restante do sistema. Um pote plástico transparente e redondo, medindo 13,5 cm de diâmetro e 7 cm de altura (Helsimplast), foi colado ao fundo de cada balde na posição invertida e serve como plataforma de apoio para a rã permanecer fora da água. Uma abertura feita na lateral do pote permite que a rã o utilize como um abrigo quando submersa. Assim, a rã pode alternar entre diferentes microambientes no interior do balde: submersão total na água, submersão parcial na água e emersão na plataforma.

A água que circula no sistema é naturalmente poluída por excretas e fezes que podem ocasionar o crescimento de fungos e bactérias patogênicos. Sendo assim, a limpeza da água é feita continuamente durante a sua passagem por um reservatório contendo diversos elementos filtrantes, como a seguir. Primeiro, a água flui através de um filtro mecânico constituído de manta acrílica, para a retenção de material particulado. Em seguida, a água percorre um filtro biológico constituído de mídia filtrante K1 (Ocean Tech, Professional Aquarium), que proporciona ótimas condições para o crescimento de bactérias que removem amônia e nitrito da água. A cultura destas bactérias tem início uma semana antes da introdução das rãs no sistema e é mantida ao longo do experimento com a adição de anticloro condicionador Prime (Seachem Stability) e acelerador biológico para aquário (Seachem Stability), de acordo com as especificações do fabricante. Por último, a água passa pelo filtro químico constituído de carvão ativado, cuja função é adsorver moléculas poluentes carregadas negativamente. Além destes, um filtro ultravioleta (Ace Pet) foi utilizado alternadamente nas duas estantes para auxiliar no controle do crescimento de microorganismos patogênicos e, a cada semana, foi feita a troca de cerca de 2/3 do volume de água do sistema.

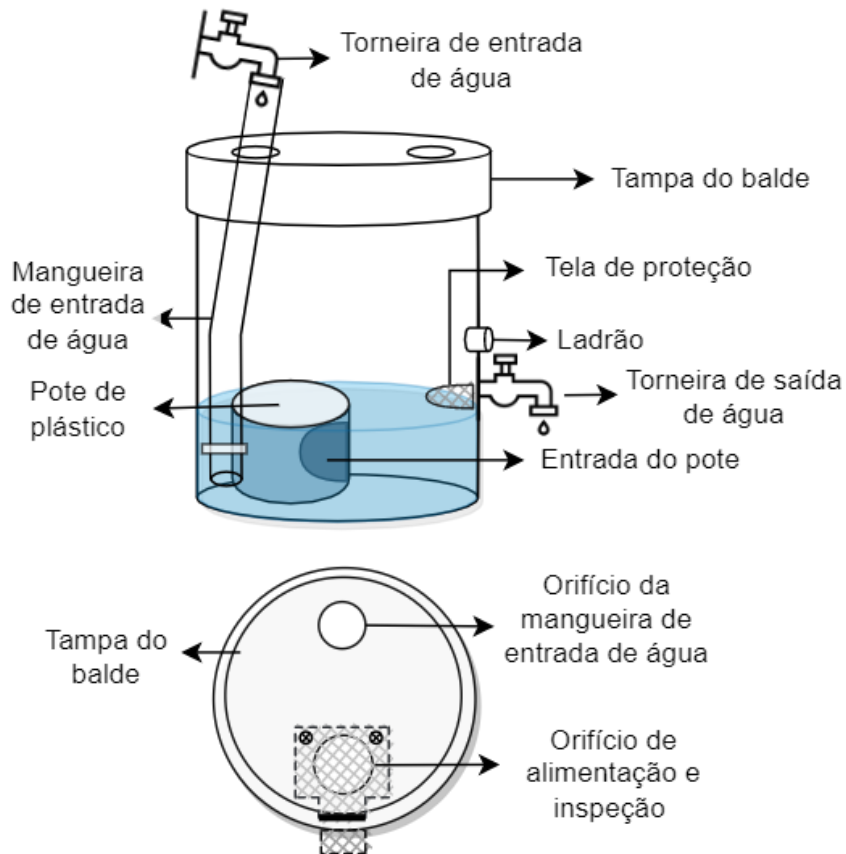


Figura 4 - Acima, esquema representativo do balde utilizado para alojar as rãs no sistema de circulação de água, com destaque para a vista superior da tampa do balde. Abaixo à esquerda, foto com vista superior de uma rã parcialmente submersa na água no interior do balde, e à direita, foto com vista superior de uma rã totalmente exposta ao ar em cima do pote que serve como plataforma de emersão.

2.2.2. Controle e registro de temperatura

A temperatura da água no sistema é controlada por termostatos de aquário (HOPAR[®] H-606; ATMAN[®] AT-100W), os quais são conectados diretamente à rede

elétrica ou através de temporizadores de tomada programáveis (KIENZLE Ecológica-400, KEY WEST DNI6601). As temperaturas usadas para configuração dos termostatos no início dos experimentos situam-se entre um patamar mais baixo, próximo às condições do ranário (23 °C) e um patamar mais alto (30 °C). Na Estante 1, os aquecedores permaneceram ligados continuamente; na Estante 2, o temporizador foi configurado para ligar o aquecedor no início da manhã (6h) e desligar ao final da tarde (18h), resultando numa variação cíclica da temperatura da água e do ar no interior dos baldes em associação ao fotoperíodo diário. Um aparelho de ar-condicionado permaneceu ligado para resfriar o ar da sala e auxiliar na queda passiva da temperatura da água no período noturno. Adicionalmente, as estantes foram revestidas com plástico-bolha durante os experimentos para permitir algum grau de isolamento térmico e a manutenção do regime de temperatura específico de cada estante.

No decorrer dos experimentos, a temperatura da água e do ar em cada estante foi medida continuamente por meio de termômetros digitais Maxim (modelo DS18B20), posicionados do seguinte modo: um sensor imerso na água do reservatório com o aquecedor (**Fig. 2, item 1**) e dois sensores no interior de um balde de cada prateleira da estante, um imerso na água e outro suspenso no ar próximo à superfície da plataforma de emersão. As medições feitas pelos cinco sensores foram registradas por meio de uma placa Arduíno conectada a um cartão SD, onde os dados foram armazenados. Adicionalmente, medidas de temperatura da água e do ar foram feitas esporadicamente com um termômetro de mercúrio para verificação e correção de eventuais desvios causados por ruído ou falha nos componentes eletrônicos.

2.3. Regimes térmicos e protocolo experimental

Após o período de aclimação ao laboratório, as rãs alojadas nas Estantes 1 e 2 (n= 24) foram inicialmente expostas a temperaturas baixas e constantes, em torno de 23 °C, durante sete dias (**Fig. 5**). Ao final da exposição, uma parte das rãs (n= 6) foi morta para coleta de amostras de tecidos representativas do regime térmico denominado **T23**. Em seguida, as rãs da Estante 1 (n= 9) foram expostas a temperaturas altas e constantes, em torno de 30 °C, durante 20 dias, ao mesmo tempo que as rãs da Estante 2 (n= 9) foram expostas a um regime cíclico de temperatura, com mínima em torno de 25 e máxima em torno de 30 °C, associado ao fotoperíodo

diário (**Fig. 5**). Ao final da exposição, as rãs foram mortas para coleta de amostras de tecidos representativas dos regimes térmicos denominados **T30** e **T25-30**, respectivamente.

As temperaturas da água e do ar registradas durante a exposição das rãs aos regimes térmicos **T23**, **T30** e **T25-30** estão descritas na **Tabela 1** e na **Figura 6**. De modo geral, nota-se que a temperatura da água foi sempre maior do que a temperatura do ar no interior dos baldes. Adicionalmente, no regime **T25-30** a taxa de aquecimento da água e do ar foi maior do que a taxa de resfriamento. Estas características do sistema refletem limitações impostas pelos equipamentos.

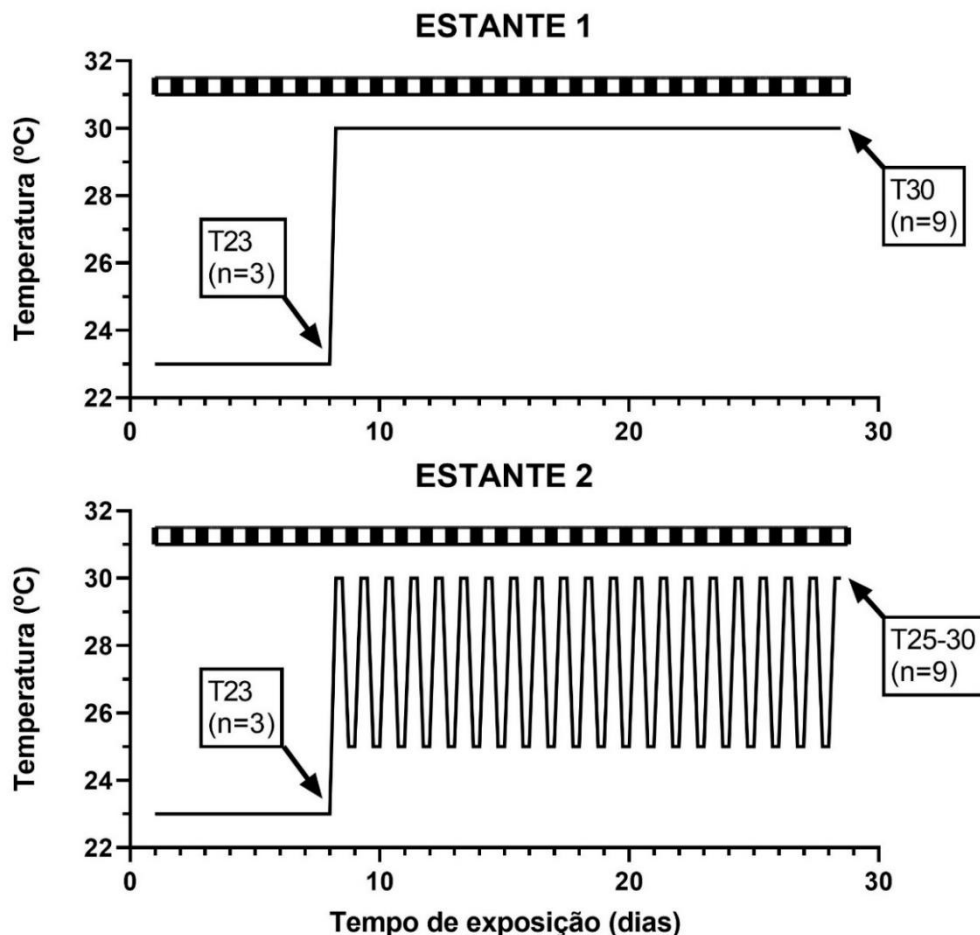


Figura 5 - Esquema geral dos regimes térmicos usados nos experimentos com rãs touro *L. catesbeianus*. Nas Estantes 1 e 2, as rãs foram inicialmente expostas a temperaturas baixas e constantes, em torno de 23 °C, durante sete dias. Em seguida, uma parte das rãs (n= 6) foi morta para coleta de amostras de tecidos representativas do regime térmico denominado T23. Após este período, as rãs alojadas na Estante 1 (n= 9) foram expostas a temperaturas altas e constantes, em torno de 30 °C, durante 20 dias, ao mesmo tempo que as rãs na Estante 2 (n= 9) foram expostas a um regime cíclico de temperatura, com a mínima em torno de 25 °C e a máxima em torno de 30 °C, associado ao fotoperíodo diário. Ao final, as rãs foram mortas e representam respectivamente os regimes térmicos denominados T30 e T25-30.

Tabela 1 - Temperaturas médias da água e do ar registradas durante a exposição crônica da rã-touro *L. catesbeianus* a diferentes regimes térmicos.

Temperatura (°C)	Regime térmico		
	T23	T30	T25-30
Água	23,4 ± 0,3	29,9 ± 0,4	6h: 24,7 ± 0,7 18h: 30,3 ± 0,3
Ar	22,9 ± 0,4	27,7 ± 0,8	6h: 23,9 ± 0,6 18h: 28,4 ± 0,7

Os valores são a média e o erro padrão da temperatura da água e do ar dos grupos expostos à 23 °C (T23) por sete dias e expostos a 30 °C em regime constante (T30) ou cíclico (T25-30) por 20 dias. No grupo T25-30, as médias das temperaturas mínima e máxima da água e do ar foram registradas às 06 h e às 18 h, respectivamente.

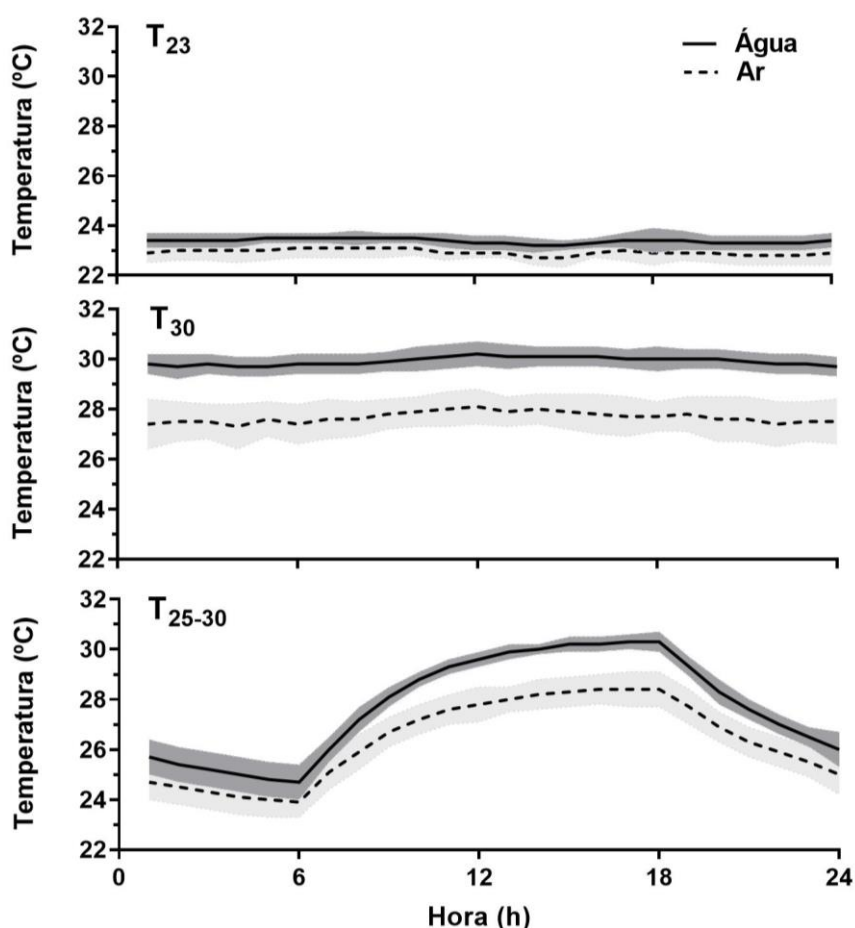


Figura 6 - Temperaturas da água e do ar registradas durante a exposição crônica da rã-touro *L. catesbeianus* a diferentes regimes térmicos. As linhas descrevem o comportamento das médias de temperaturas registradas a intervalos de uma hora, durante vários dias, e as áreas sombreadas representam o desvio padrão das médias. **T23** - temperatura da água constante em torno de 23 °C (7 dias); **T30** - temperatura da água constante em torno de 30 °C (20 dias); **T25-30** - regime cíclico de temperatura da água com mínima em torno de 25 e máxima em torno de 30 °C, associado ao fotoperíodo diário (20 dias).

Ao final do tempo de exposição aos regimes térmicos, as rãs foram mortas por decapitação e os órgãos (ventrículo cardíaco, fígado, intestino médio, rins, corpos gordurosos) foram dissecados sobre gelo, pesados em uma balança analítica e picotados para a obtenção de amostras. Além destes órgãos, amostras dos músculos gastrocnêmio e tríceps femoral foram removidas dos membros posteriores. Todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e depois armazenadas em freezer - 80°C até a realização dos ensaios.

O experimento foi conduzido sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, número de protocolo: 340/2018), do Instituto de Biociências, da Universidade de São Paulo, SP.

2.3.1. Medidas de temperatura em modelos de ágar

Uma estimativa da temperatura corpórea das rãs durante a exposição aos diferentes regimes térmicos foi feita utilizando modelos em ágar 3% (**Fig. 7**). O modelo foi produzido em um tamanho equivalente ao de uma rã com 170 g de massa corpórea, a partir de um contramolde representativo da rã *Rinella marina* gentilmente cedido por Dr. Braz Titon Jr. (Laboratório de Comportamento e Fisiologia Evolutiva). Registros contínuos de temperatura foram feitos com o modelo (i) emerso sobre a plataforma e (ii) totalmente imerso em água no interior do balde, ao longo de 24 horas, utilizando os mesmos equipamentos descritos no item acima. O sensor foi introduzido em um orifício na região posterior do tronco, para registrar a temperatura nas camadas mais internas do modelo de ágar.

A **Figura 8** mostra a variação da temperatura interna do modelo exposto ao regime cíclico T25-30 durante 24 h. Com o modelo imerso em água, os dados indicam que a sua temperatura interna varia ao mesmo tempo e na mesma proporção que a temperatura da água no interior do balde, tanto na fase de aquecimento quanto na de resfriamento da água. Nota-se, apenas, um pequeno atraso no decaimento da temperatura do modelo em relação à queda da temperatura da água. Por outro lado, com o modelo totalmente emerso e exposto ao ar sobre a plataforma, os dados mostram que a sua temperatura interna assume um valor intermediário entre a temperatura do ar e da água no interior do balde, particularmente na fase de aquecimento, e acompanha o padrão de variação da temperatura da água.

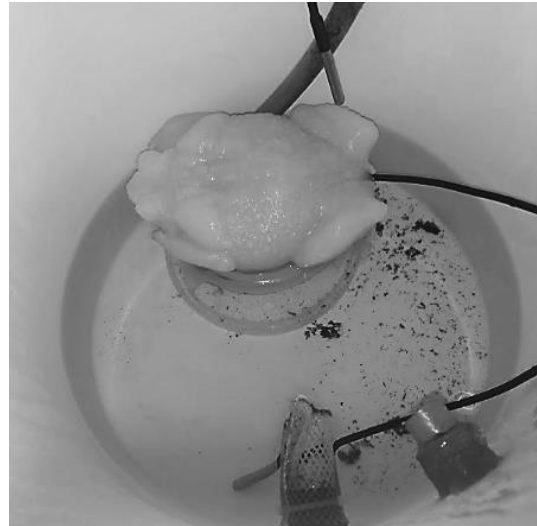


Figura 7 - Imagens fotográficas do modelo em ágar usado para estimar os efeitos da exposição aos regimes térmicos sobre a temperatura corpórea de rãs *L. catesbeianus*. À esquerda, detalhe do modelo equivalente a uma rã com 170 g de massa corpórea. À direita, detalhe do modelo no interior do balde, emerso sobre a plataforma, mostrando a posição dos sensores de temperatura usados no teste: um no interior de um orifício na região posterior do corpo do modelo, outro imerso na água e outro suspenso no ar próximo à superfície da plataforma.

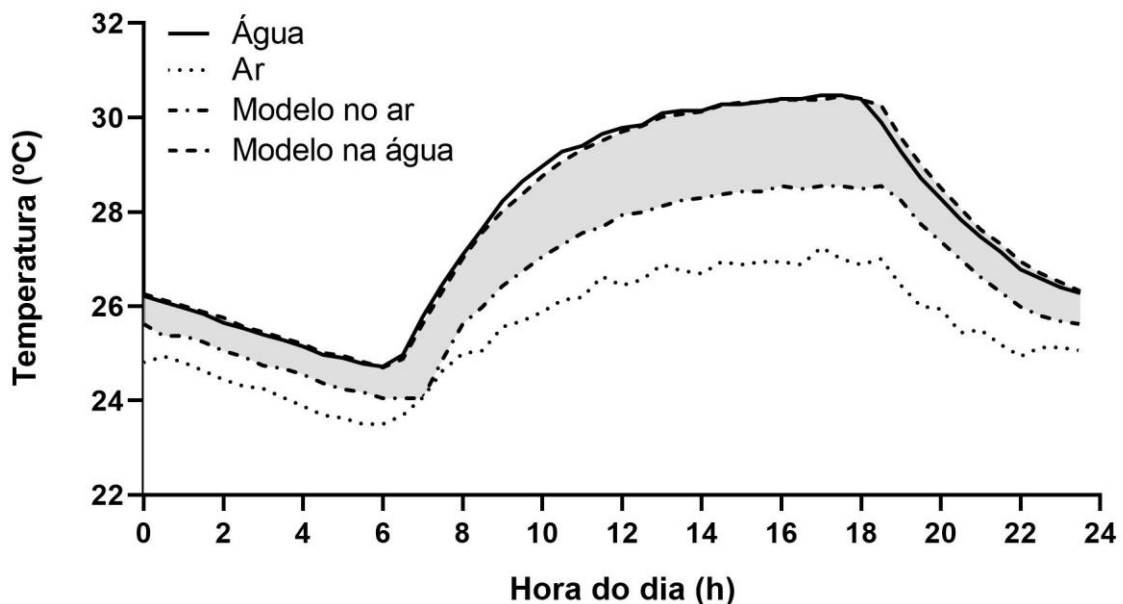


Figura 8 - Variação da temperatura interna em modelos de ágar expostos ao regime cíclico de temperatura, utilizando o protocolo dos experimentos realizados com a rã *L. catesbeianus*. Os registros de temperatura foram feitos com o modelo imerso em água ou exposto ao ar no interior dos baldes do sistema termostático, a intervalos de meia hora, durante um ciclo diário completo. A área sombreada representa a diferença entre a temperatura interna do modelo e a temperatura da água.

Dado que a temperatura da água é sempre maior do que a do ar no interior do balde, é provável que o contato das patas e da superfície ventral do modelo com a superfície da plataforma, aquecida pela água, seja suficiente para que a temperatura interna do modelo se mantenha alguns graus acima da temperatura do ar. Por fim, os dados obtidos com o modelo sugerem que a amplitude de variação da temperatura da água no regime cíclico e a velocidade com que as mudanças ocorrem têm o potencial de causar alterações semelhantes na temperatura corpórea das rãs.

2.3.2. Alimentação das rãs e outras rotinas

As rãs foram alimentadas três vezes por semana em dias fixos, de acordo com um cronograma previamente estabelecido em que os horários, em que um dos quatro intervalos de tempo de cada ciclo diário (0 - 6h; 6h - 12h; 12h - 18h; 18h - 24h), foram alternados para evitar habituação e interferência no comportamento termorregulatório das rãs. A alimentação foi composta de ração (Poli-Nutri Poli-peixe 400 Intensivo), obtida do ranário onde as rãs foram cultivadas e oferecida duas vezes por semana, e de ninfas de barata dúbia (*Blaptica dúbia*), cultivadas no laboratório e oferecidas uma vez por semana. A quantidade de ração ou barata em cada refeição foi equivalente a cerca de 1 - 1,5% da massa corpórea média das rãs e o peso médio da barata, cerca de 1,7 g, foi padronizado para evitar discrepâncias entre os grupos (CASTRO et al., 2017; LIMA; CASALI; AGOSTINHO, 2003). O alimento foi introduzido nos baldes através do orifício na tampa e, após dez minutos, as sobras foram retiradas com o auxílio de uma rede de aquário, com máximo cuidado para não causar estresse nos animais. As sobras de alimento foram contabilizadas para a estimativa da quantidade de ração ou barata ingerida por cada rã, por refeição, em gramas, e para a estimativa da ingestão voluntária média de alimento em cada grupo experimental.

A inspeção dos equipamentos e do sistema foi realizada diariamente também em horários alternados. Além destas atividades, as rãs foram pesadas uma vez por semana.

2.4. Análise da concentração de substratos metabólicos

2.4.1. Lipídios totais

A concentração de lipídios totais foi medida em amostras de tecido hepático e de músculo esquelético (tríceps femoral e gastrocnêmio), de acordo com o método modificado de Folch e colaboradores (1957). As amostras congeladas foram rapidamente pesadas e homogeneizadas em 1 ml de solução de clorofórmio-metanol (2:1) utilizando o equipamento Ultra-Turrax (IKA LaborTechnik). Ao volume do homogeneizado adicionou-se 9 ml de clorofórmio-metanol (2:1) e 2 ml de água miliQ e a mistura foi agitada em vortex (Thermolyne Maxi Mix II) e centrifugada à 1741 g durante 10 minutos (Eppendorf 5804R). Após a centrifugação, a fase inferior, contendo os lipídios, foi removida com o auxílio de duas pipetas Pasteur e transferida para outro frasco. Em seguida, 1 ml de clorofórmio foi adicionado ao volume restante e a mistura foi novamente agitada e centrifugada para separação das fases. A fase inferior foi pipetada e adicionada ao volume reservado na etapa anterior e o mesmo procedimento foi repetido mais duas vezes. Os tubos contendo o extrato lipídico da amostra foram mantidos em uma capela com fluxo de ar constante até a completa evaporação do solvente. Em seguida, os tubos contendo o resíduo seco foram mantidos em um dessecador por mais 1 dia e, então, pesados em balança analítica para o cálculo do conteúdo lipídico das amostras.

$$\text{mg} \cdot \text{g tecido úmido}^{-1} = (\text{massa do resíduo seco} / \text{massa da amostra inicial})$$

2.4.2. Glicose e Glicogênio

As concentrações de glicose e glicogênio foram medidas em amostras de fígado e de músculo esquelético (tríceps femoral e gastrocnêmio), com base no procedimento descrito por Keppler & Decker (1984).

As amostras congeladas foram pesadas e homogeneizadas em 4 volumes de ácido perclórico 0,6 M (PCA) com um homogeneizador Ultra-Turrax (IKA LaborTechnik), mantendo-se o extrato em gelo durante todo o tempo. Uma alíquota de 100 µl do extrato ácido foi removida e utilizada para a medida da concentração de glicose livre na amostra. Outros 100 µl do extrato ácido foram incubados a 40 °C com

50 µl de KHCO_3 1 M e 1.000 µl de Amiloglicosidase, diluído em tampão acetato 0,2 M pH 4,8, por 3 horas, para a hidrólise do glicogênio em unidades glicosil. A hidrólise foi interrompida com 26 µl de PCA 70% e em seguida o extrato foi neutralizado com K_2CO_3 3 M e centrifugado à 926 g por 15 minutos (Hettich, Universal 30 RF) para utilização do sobrenadante no ensaio de medida da concentração de D-glicose.

A concentração de D-glicose no extrato ácido e no extrato hidrolisado foi medida por meio de cinética enzimática, com base na variação de absorbância do NAD^+ à 340 nm e 25 °C, utilizando um espectrofotômetro de placa (SpectraMax 250, Molecular Device). O meio de reação consistiu de 162 µl de tampão NaH_2PO_4 100 mM (pH 7,7); 25 µl de MgSO_4 3,8 mM; 25 µl de ATP 15 mM; 25 µl de NAD^+ 15 mM; e 10 µl de amostra neutralizada. Após a adição destes reagentes e agitação da placa, a absorbância (A1) foi lida em espectrofotômetro. Em seguida, foram adicionados 1 µL de hexoquinase (HK) $540 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ e 2 µl de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) $1.000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ em cada pocinho da placa, completando um volume final de 250 µl. Após a agitação da placa, a variação de absorbância foi lida até atingir um valor constante (A2). O branco da reação foi constituído de todos os reagentes, exceto o extrato do tecido, que foi substituído por tampão.

Os ensaios foram realizados no mínimo em duplicata e a concentração de glicose foi calculada com a fórmula:

$$\text{mg} \cdot \text{g tecido úmido}^{-1} = (\Delta \text{ Abs} \cdot \text{ diluição total da amostra} \cdot \text{PM}) / (\varepsilon \cdot d \cdot 1000)$$

onde $\Delta \text{ Abs}$ é a variação de absorbância, PM é o peso molecular da D-glicose (180,16); ε é o coeficiente de absorção molar do NAD^+ ($6,22 \text{ ml} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$) e d é a distância percorrida pelo feixe de luz na solução (0,65 cm). O coeficiente de variação intra-ensaio das amostras hidrolisadas de músculo esquelético (tríceps femoral e gastrocnêmio) e fígado foram em média 6%, 9,5% e 7%, respectivamente, e das amostras de glicose livre foram, 4%, 8% e 7%. Por fim, a concentração de glicogênio no tecido é dada pela diferença entre a concentração de glicose medida no extrato hidrolisado e a concentração de glicose livre medida no extrato bruto.

Curvas-padrão de glicose e de glicogênio foram feitas simultaneamente aos ensaios para validar o protocolo e ajustar a diluição das amostras. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. e possuem alto grau de pureza.

2.5. Medida da atividade enzimática máxima (V_{max})

A V_{max} das enzimas citrato sintase (CS), que participa do metabolismo oxidativo no Ciclo de Krebs, piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH), que catalisam o metabolismo de carboidratos na via glicolítica, β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD), que participa da β -oxidação lipídica, e glicogênio fosforilase (GP), que catalisa a degradação de glicogênio em glicose foi medida em amostras de tecidos da rã-touro (**Fig. 9**). A V_{max} da PK e LDH foi medida no tríceps femoral, a da PK, LDH e CS no ventrículo cardíaco e a da GP, PK, LDH, HOAD e CS no tecido hepático.

A LDH catalisa a interconversão de piruvato e lactato, utilizando os cofatores NADH e NAD⁺, respectivamente, e a utilização de lactato ou piruvato como substrato energético depende da isoforma predominante no tecido. A variação das isoformas nos tecidos está associada a diferenças na taxa metabólica e às necessidades energéticas e funções dos tecidos, que se refletem em diferenças de expressão gênica das subunidades da enzima. A isozima LDH-5 é abundantemente expressa no fígado e no músculo esquelético e funciona preferencialmente como piruvato redutase (piruvato \rightarrow lactato). Por outro lado, a isozima LDH-1 é predominante em tecidos aeróbios como o cardíaco e funciona preferencialmente como lactato desidrogenase (lactato \rightarrow piruvato), embora também possa atuar como piruvato redutase (HOCHACHKA; SOMERO, 2014; NELSON; COX, 2013).

No dia dos ensaios, as amostras dos tecidos foram descongeladas sobre gelo e homogeneizadas em 9 volumes de tampão Imidazol-HCl 20 mM (pH 7,4) contendo EDTA 2 mM, NaF 20 mM, PMSF 1 mM, Triton X-100 0,1 % e DTT 5 mM (exceto para medida da CS), utilizando um homogeneizador Ultra-Turrax (IKA LaborTechnik). Adicionalmente, o extrato destinado à medida de atividade de enzimas mitocondriais, CS e HOAD, foi submetido ao ultrassom utilizando um sonicador U-200S control (IKA LaborTechnik) e realizando três séries de 30 segundos para ruptura das membranas mitocondriais.

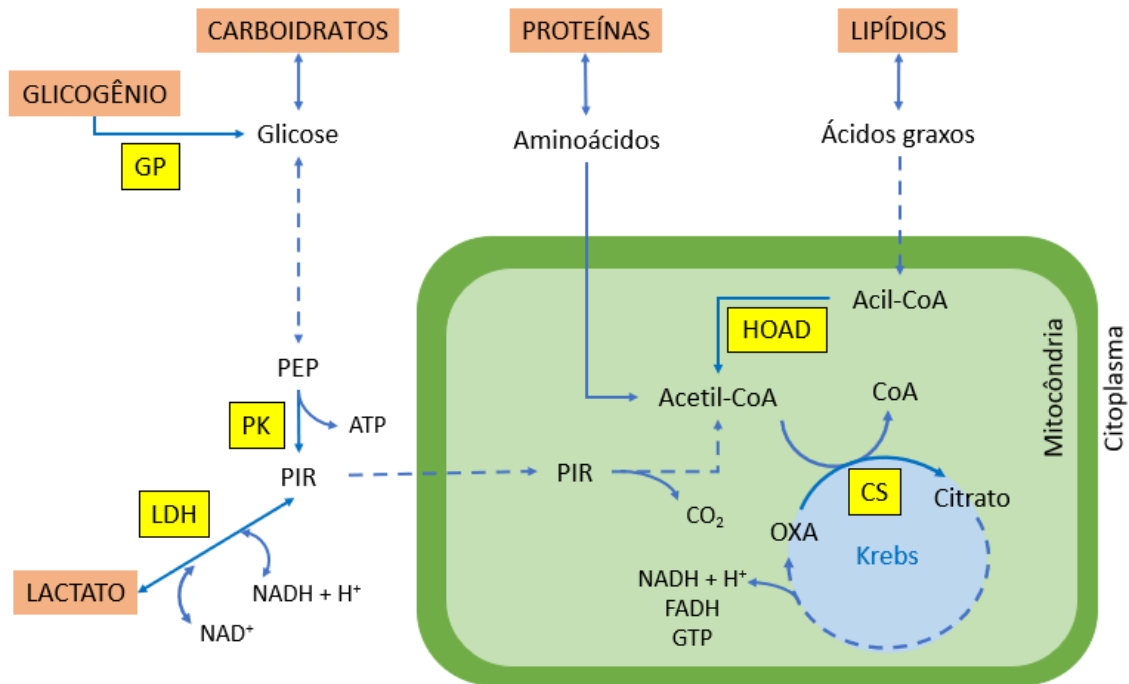


Figura 9 - Esquema geral ilustrando as enzimas e vias metabólicas analisadas nos tecidos da rã-touro. CS - citrato sintase; PK - piruvato quinase; LDH - lactato desidrogenase, HOAD - β -hidroxiacil-CoA desidrogenase; e GP - glicogênio fosforilase.

Os ensaios foram feitos em cubetas de vidro ou quartzo utilizando um espectrofotômetro (*Beckman DU-70*) e a V_{max} das enzimas foi calculada a partir das alterações de absorvância de NADH e $NADP^+$ a 340 nm, ou DTNB a 412 nm, em condições de saturação não inibitórias de substrato, de acordo com Bergmeyer (1983). Os ensaios com o tecido muscular foram realizados à 23 °C e à 30 °C, após 5 minutos de incubação para a termoestabilização das soluções, e os ensaios com o tecido hepático foram realizados à 23 °C apenas. O pH do ensaio foi ajustado para um valor constante ao longo do gradiente de temperatura, de acordo com as características funcionais de cada enzima. O meio de reação empregado nas medidas de V_{max} de cada enzima está descrito a seguir.

CS – tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0); DTNB 0,1 mM; acetil-CoA 0,3 mM e extrato na diluição apropriada para cada tecido. Após a leitura do branco de reação, adicionou-se o substrato OXA 0,5 mM e a variação de absorvância foi medida por mais 3 minutos.

PK – tampão Imidazol-HCl 50 mM (pH 7,0); DTT 5 mM; $MgCl_2$ 10 mM; KCl 100 mM; ADP 2,5 mM (para tecido muscular esquelético) ou a 5 mM (para tecido cardíaco e hepático); F1,6P 0,02 mM; NADH 0,15 mM; LDH 4,2 $U \cdot ml^{-1}$ e extrato na diluição apropriada para cada tecido. Após a leitura do branco de reação, adicionou-se o

substrato PEP 2,5 mM (tecido muscular esquelético) ou 5 mM (tecido muscular cardíaco e hepático) e a variação de absorvância foi medida por mais 3 minutos.

LDH – tampão Imidazol-HCl 50 mM (pH 7,0); DTT 5 mM; NADH 0,15 mM e extrato na diluição apropriada para cada tecido. Após a leitura do branco de reação, adicionou-se o substrato PIR 1 mM e a variação de absorvância foi medida por mais 3 minutos.

HOAD – tampão Imidazol-HCl 50 mM (pH 7,0); NADH 0,15 mM e extrato diluído a uma concentração apropriada a cada tecidos. Após a leitura do branco de reação, adicionou-se o substrato acetoacetyl-CoA 0,1 mM e a variação de absorvância foi medida por mais 3 minutos.

GP - tampão fosfato de potássio 50 mM; MgCl₂ 10 mM; NADP 0,5 mM; G1,6P4 μM; PGM 1,2 U · ml⁻¹; G6PDH de *Leuconostoc* 1 U · ml⁻¹ e extrato bruto não centrifugado. Após a leitura do branco de reação, adicionou-se glicogênio 2 mg · ml⁻¹ e a variação de absorvância foi medida por mais 3 minutos, resultando na V_{max} da fração ativa de GP (GP_a). Por fim, adicionou-se AMP 1 mM e a variação de absorvância foi medida por mais 3 minutos, resultando na V_{max} total da enzima, ativa e inativa (GP_{total} ou GP_(a+b)). A partir destas medidas, calculou-se a %GP_a: (GP_a · 100) / GP_{total}.

A V_{max} da GP_a foi medida apenas no tecido hepático. No músculo esquelético, os valores estavam abaixo do limiar de sensibilidade do ensaio, possivelmente porque no músculo esquelético de anfíbios a GP é ativada pela contração do músculo (MOMMAERTS et al, 1975). Todos os ensaios enzimáticos foram realizados, no mínimo, em duplicata e a V_{max} foi calculada com a equação:

$$V_{max} = [(\Delta Abs \cdot \text{min}^{-1}) \cdot \text{diluição total}] / (\epsilon \cdot d)$$

onde $\Delta Abs \cdot \text{min}^{-1}$ é a diferença entre a variação de absorvância por minuto após a adição de substrato e a variação de absorvância do branco; ϵ é o coeficiente de absorção molar para o NADH ($6,22 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$) ou DTNB ($13,6 \cdot 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$); e “d” é a distância percorrida pelo feixe de luz até a solução (10 mm).

As atividades específicas foram expressas em μmol de substrato convertido a produto por minuto por grama de tecido úmido, equivalentes à U · g tecido úmido⁻¹, onde uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade em μmol

de substrato que a enzima converte em produto pelo tempo de 1 minuto nas condições de ensaio.

O coeficiente de temperatura (Q10) é uma medida da alteração da taxa de um determinado processo biológico ou químico (R) como consequência de um aumento de 10 °C na temperatura (T), segundo a fórmula abaixo. No presente estudo, o Q10 da atividade catalítica das enzimas PK, LDH e GP_{total} no tríceps femoral e da PK, LDH e CS no ventrículo cardíaco foi calculado a partir da diferença de Vmax nos ensaios à 23 e 30°C.

$$Q_{10} = \left(\frac{R_2}{R_1} \right)^{10(T_2 - T_1)}$$

A razão entre a Vmax de enzimas foi calculada para fornecer um indicativo de reorganização do metabolismo energético dos tecidos, por exemplo, mudanças na relação entre o potencial aeróbio e anaeróbio ou na capacidade de uso de substratos nas vias metabólicas. A razão foi calculada pela equação:

$$A : B = (V_{\max} \text{ da enzima A} / V_{\max} \text{ da enzima B})$$

2.6. Análise estatística

As diferenças entre a massa corpórea inicial e final das rãs de cada grupo experimental foram analisadas com o “teste t” pareado. Adicionalmente, as diferenças na massa corpórea, na massa dos órgãos, na ingestão voluntária de alimento, no teor de glicose, glicogênio e lipídio e na Vmax das enzimas entre os grupos de rãs cronicamente expostos aos regimes térmicos T23, T30 e T25-30 foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA one-way), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados expressos em porcentagem (massa relativa dos órgãos) foram submetidos a uma transformação arco-seno previamente aos testes. Nos casos em que os testes de normalidade e homocedasticidade indicaram desvios significativos, utilizou-se os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e de Dunn.

A hipótese de alteração de sensibilidade térmica das enzimas no músculo esquelético e cardíaco foi analisada com base na interação do efeito da exposição aos regimes térmicos T23, T30 e T25-30 com o efeito das temperaturas de ensaio 23 e 30°C nas medidas de Vmax, utilizando-se a análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way).

As diferenças na ingestão voluntária de alimento das rãs causadas pela exposição aos diferentes regimes térmicos foram investigadas apenas entre os grupos T30 e T25-30, devido ao reduzido tempo de manutenção e alimentação do grupo T23. Adicionalmente, um grupo de rãs de um estudo paralelo realizado em dezembro de 2019, mantidas à 24°C (n= 24; T24; massa corpórea= 237,2 ± 27 g) com o mesmo protocolo de alimentação e manutenção por um período de 21 dias, foi incluído em comparações com T30 e T25-30 por meio do teste de Anova 'one-way' através da variável normalizada pela massa corpórea (ingestão voluntária total de alimentos (g) / massa corpórea (g)).

A análise estatística foi feita com base em Zar (1974) e os testes estatísticos e os gráficos foram feitos com o auxílio dos programas Excel (Microsoft Corp.), Rstudio e Prism 7 (GraphPad Software).

3. RESULTADOS

3.1. Efeitos dos regimes térmicos na massa corpórea e dos órgãos

A massa corpórea das rãs não difere significativamente entre os grupos expostos aos regimes térmicos T23, T30 e T25-30 (**Tabela 4**). Além disso, o teste t pareado indica que não há diferença significativa entre a massa corpórea inicial e final das rãs expostas aos regimes T30 ($P= 0,30$) e T25-30 ($P= 0,34$), durante 20 dias. A razão da ingestão de alimentos por massa corpórea não difere significativamente entre os grupos T24, T30 e T25-30 ($P= 0,7$) (**Fig. 10**). Embora a quantidade de baratas seja uma pequena fração do total de alimento ofertado (~30 %), é notável que as rãs ingeriram perto de 100% das baratas versus 50% da ração, sugerindo que o uso de presas vivas contribuiu para o sucesso na alimentação das rãs.

A massa relativa do ventrículo cardíaco, do fígado e dos corpos gordurosos não difere significativamente entre os grupos expostos aos diferentes regimes térmicos (**Tabela 2; Fig. 11**). Entretanto, a massa relativa do intestino médio e dos rins é menor nos grupos expostos a T30 e T25-30 em relação à T23. Especificamente, a massa do intestino médio é 50% menor no grupo T30 ($P= 0,003$) e 37% menor no grupo T25-30 ($P= 0,01$) e a massa dos rins é 22% menor nos dois grupos ($P \leq 0,01$).

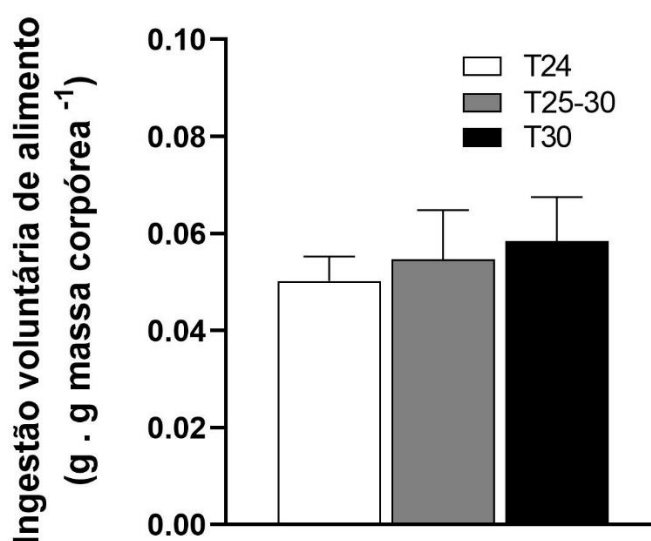


Figura 10 - Ingestão voluntária de alimento por massa corpórea em rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos. As colunas e as barras representam a média e o desvio padrão de grupos de animais expostos à 24 °C (T24, n=24, massa corpórea= 237,2 ± 27) e expostos à 30 °C em regime constante (T30, n=9) ou cíclico (T25-30, n=9), durante 20 dias.

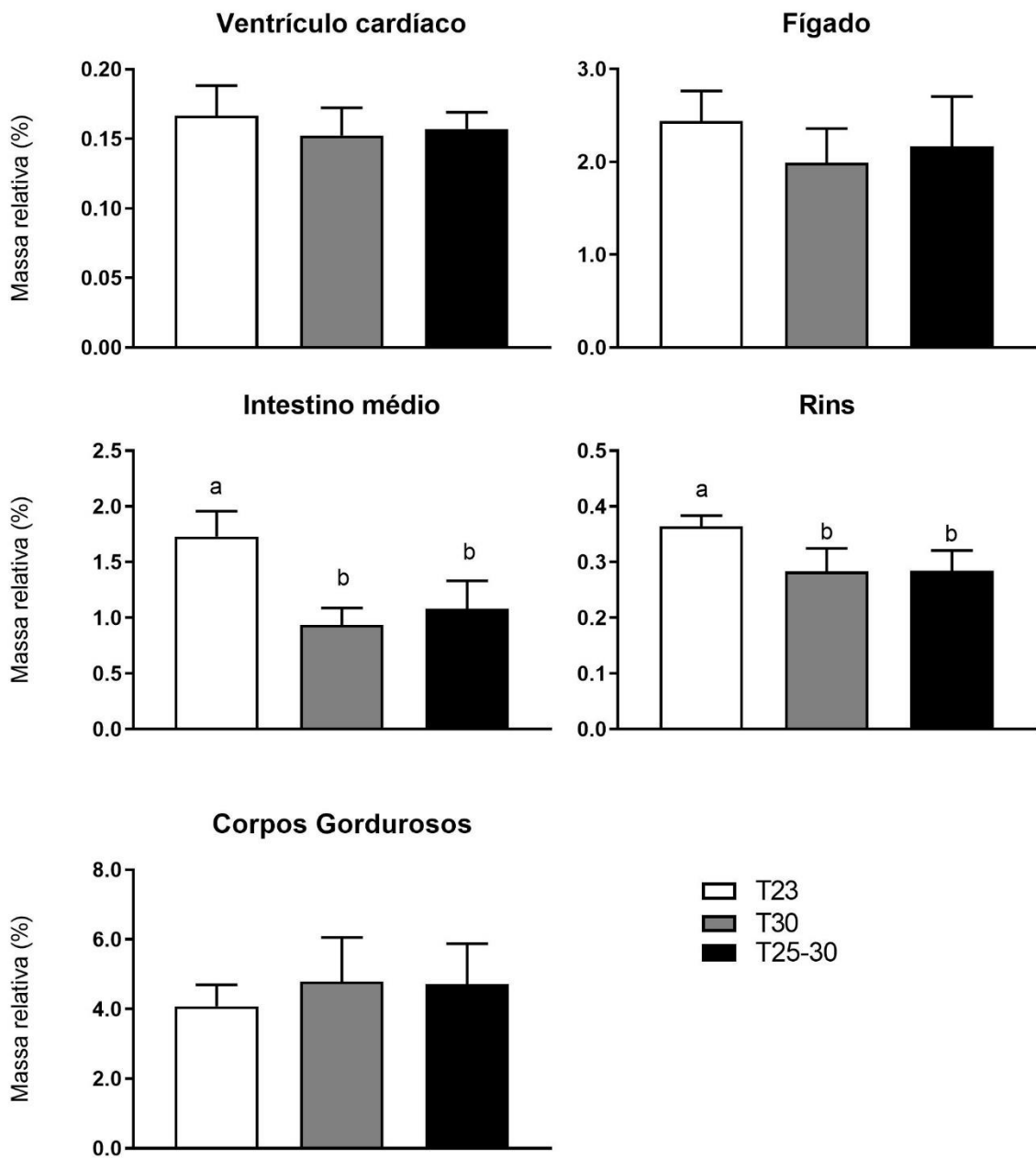


Figura 11 - Massa relativa dos órgãos de rãs *L. catenatus* cronicamente expostas a diferentes regimes térmicos. As colunas e as barras representam a média e o desvio padrão de grupos de animais expostos à 23 °C (T23; n= 6), durante 7 dias, e expostos a 30 °C em regime constante (T30; n= 9) ou cíclico (T25-30; n= 9), durante 20 dias. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os grupos conforme o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Massa corpórea (g) e massa relativa dos órgãos (%) de rãs *L. catenifer* cronicamente expostas a diferentes regimes térmicos.

	Regime térmico			F	P
	T23	T30	T25-30		
Massa corpórea	174 ± 24 (6)	175 ± 30 (9)	179 ± 20 (9)	F _{2,21} = 0,077	0,927
Ventrículo cardíaco	0,17 ± 0,01 (6)	0,15 ± 0,02 (9)	0,16 ± 0,01 (9)	F _{2,21} = 1,165	0,331
Fígado	2,44 ± 0,33 (6)	1,99 ± 0,37 (9)	2,17 ± 0,54 (9)	F _{2,21} = 1,933	0,170
Intestino médio	1,73 ± 0,22 ^a (6)	0,94 ± 0,15 ^b (9)	1,08 ± 0,25 ^b (9)	F _{2,21} = 31,80	<0,001
Rins	0,37 ± 0,02 ^a (5)	0,29 ± 0,04 ^b (9)	0,29 ± 0,04 ^b (9)	F _{2,20} = 9,300	0,001
Corpos Gordurosos	4,08 ± 0,61 (6)	4,79 ± 1,26 (9)	4,71 ± 1,17 (9)	F _{2,21} = 0,716	0,500

Os valores são a média e o erro padrão, com o n amostral entre parênteses, de grupos de animais expostos à 23 °C (T23) e expostos a 30 °C em regime constante (T30) ou cíclico (T25-30). No grupo T23, a massa corpórea foi medida uma vez em 7 dias de exposição; nos grupos T30 e T25-30, a massa corpórea é a média de três medidas em 20 dias de exposição. O valor P na última coluna foi calculado na Anova e as letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos conforme o teste de Tukey (P<0,05).

3.2. Efeitos dos regimes térmicos no teor de substratos metabólicos

A concentração lipídica ($\text{mg} \cdot \text{g tecido úmido}^{-1}$) do fígado e dos músculos esqueléticos não varia significativamente entre os grupos experimentais (**Tabela 3**).

Em contraste, as concentrações de glicogênio e glicose livre dos grupos T30 e T25-30 apresentam diferenças em relação ao grupo T23, porém os grupos T30 e T25-30 não diferem entre si (**Tabela 4; Fig. 12**). Nos músculos tríceps femoral e gastrocnêmio, o teor de glicogênio é cerca de 50% menor nas rãs do grupo T25-30 em relação ao grupo T23 ($P = 0,04$ e $0,01$, respectivamente); no grupo T30, a diferença é de 18% para o tríceps femoral e de 33% para o gastrocnêmio, mas não alcançou significância estatística. Por outro lado, a concentração de glicose livre do gastrocnêmio é 140% maior nas rãs do grupo T25-30 em relação ao grupo T23 ($P = 0,003$); no grupo T30, a diferença é de 80% para o tríceps femoral ($P = 0,03$). No fígado, o teor de glicogênio variou de modo oposto ao músculo, sendo 45% maior nas rãs do grupo T30 em relação ao T23 ($P = 0,04$) e 33% maior nas rãs do grupo T25-30, mas neste último a diferença não alcançou significância estatística. Além disso, ao contrário do músculo esquelético a concentração de glicose livre do fígado não difere significativamente entre os grupos experimentais.

Tabela 3 - Concentração de lipídios ($\text{mg} \cdot \text{g tecido}^{-1}$) nos músculos tríceps femoral e gastrocnêmio e no fígado de rãs *L. catesbeianus* cronicamente expostas a diferentes regimes térmicos.

	Regime térmico			F ou H	P
	T23	T30	T25-30		
Tríceps femoral	5,9 ± 2,0 (5)	6,8 ± 1,7 (8)	6,1 ± 1,3 (9)	$F_{2,19} = 0,609$	0,56
Gastrocnêmio	5,4 ± 0,7 (5)	6,5 ± 1,9 (9)	6,4 ± 1,1 (8)	$F_{2,19} = 0,968$	0,40
Fígado	63,5 ± 31 (6)	38,2 ± 14 (8)	49,0 ± 14 (9)	$H_2 = 3,752$	0,15

Os valores representam a média e o desvio padrão, com o N amostral entre parênteses, de grupos de animais expostos à 23 °C (T23), durante 7 dias, e expostos a 30 °C em regime constante (T30) ou cíclico (T25-30), durante 20 dias. O valor df (graus de liberdade), F e P na última coluna foi obtido no teste de ANOVA nos músculos tríceps femoral e gastrocnêmio. O valor de df, H e P do teste de Kruskal Wallis foi aplicado apenas para o fígado.

Tabela 4 - Concentração de glicogênio e glicose livre ($\text{mg} \cdot \text{g tecido}^{-1}$) nos músculos tríceps femoral e gastrocnêmio e no fígado de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos.

	Regime térmico			F ou H	P
	T23	T30	T25-30		
Tríceps femoral					
Glicogênio	5,65 ± 3,17 ^a (6)	4,65 ± 1,27 ^{ab} (9)	2,90 ± 1,53 ^b (9)	F _{2,19} = 3,772	0,040
Glicose livre	0,30 ± 0,07 ^a (6)	0,56 ± 0,13 ^b (9)	0,52 ± 0,27 ^{ab} (9)	F _{2,19} = 4,089	0,029
Gastrocnêmio					
Glicogênio	5,57 ± 2,12 ^a (6)	3,73 ± 1,38 ^{ab} (9)	2,80 ± 2,21 ^b (9)	H ₂ = 9,121	0,010
Glicose livre	0,26 ± 0,07 ^a (5)	0,47 ± 0,18 ^{ab} (9)	0,63 ± 0,20 ^b (9)	F _{2,19} = 7,639	0,003
Fígado					
Glicogênio	74,6 ± 24 ^a (6)	108,6 ± 22 ^b (9)	99,2 ± 27 ^{ab} (9)	F _{2,19} = 3,537	0,047
Glicose livre	1,27 ± 0,3 (6)	1,33 ± 0,3 (9)	1,12 ± 0,3 (9)	F _{2,19} = 1,161	0,332

Os valores representam a média e o desvio padrão, com o N amostral entre parênteses, de grupos de animais expostos à 23 °C (T23) e à 30 °C em regime constante (T30) ou cíclico (T25-30), durante 20 dias. O valor de df (graus de liberdade), H e P do teste de Kruskal Wallis foi aplicado apenas para a análise de concentração de glicogênio no gastrocnêmio. O valor df, F e P foram obtidos no teste de ANOVA para as demais análises.

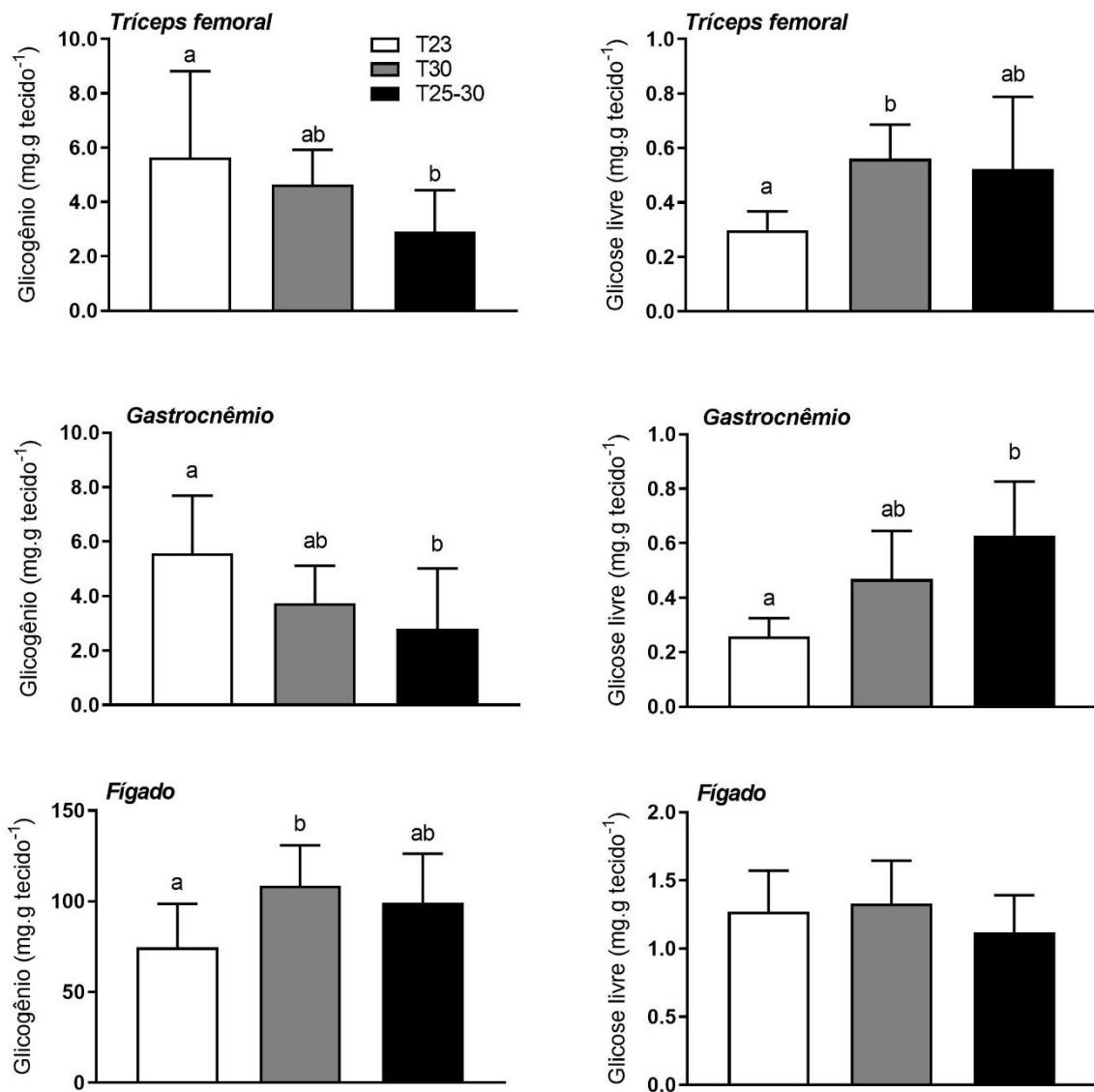


Figura 12 - Concentração de glicôgeno e glicose livre ($\text{mg} \cdot \text{g tecido}^{-1}$) nos músculos tríceps femoral e gastrocnêmio e no fígado de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos. As colunas e as barras representam a média e o desvio padrão de grupos de animais expostos à 23 °C (T23; n= 6), durante 7 dias, e expostos a 30 °C em regime constante (T30; n= 9) ou cíclico (T25-30; n= 9), durante 20 dias. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os grupos conforme o teste de Dunn ou Tukey ($P < 0,05$).

3.3. Efeitos dos regimes térmicos na atividade enzimática máxima (Vmax)

Os efeitos de diferentes regimes térmicos na atividade enzimática no músculo esquelético e cardíaco estão ilustrados nas **Figuras 13** e **14**. Primeiramente, nota-se que os valores de Vmax são maiores nos ensaios à 30 °C do que nos ensaios à 23 °C, evidenciando um efeito termodinâmico ou efeito Q10 preponderante sobre as taxas de reação de todas as enzimas analisadas. De um modo geral, os valores de Q10 indicam que as taxas aumentam 1,5 a 2,5 vezes na faixa de temperatura analisada (23 à 30 °C) e a maior sensibilidade foi observada na LDH do músculo esquelético (**Tabela 5**). A Anova ‘two-way’ indicou que o efeito é independente do tipo de tratamento térmico das rãs e, portanto, não há um efeito de interação destes dois fatores (**Tabela 6**).

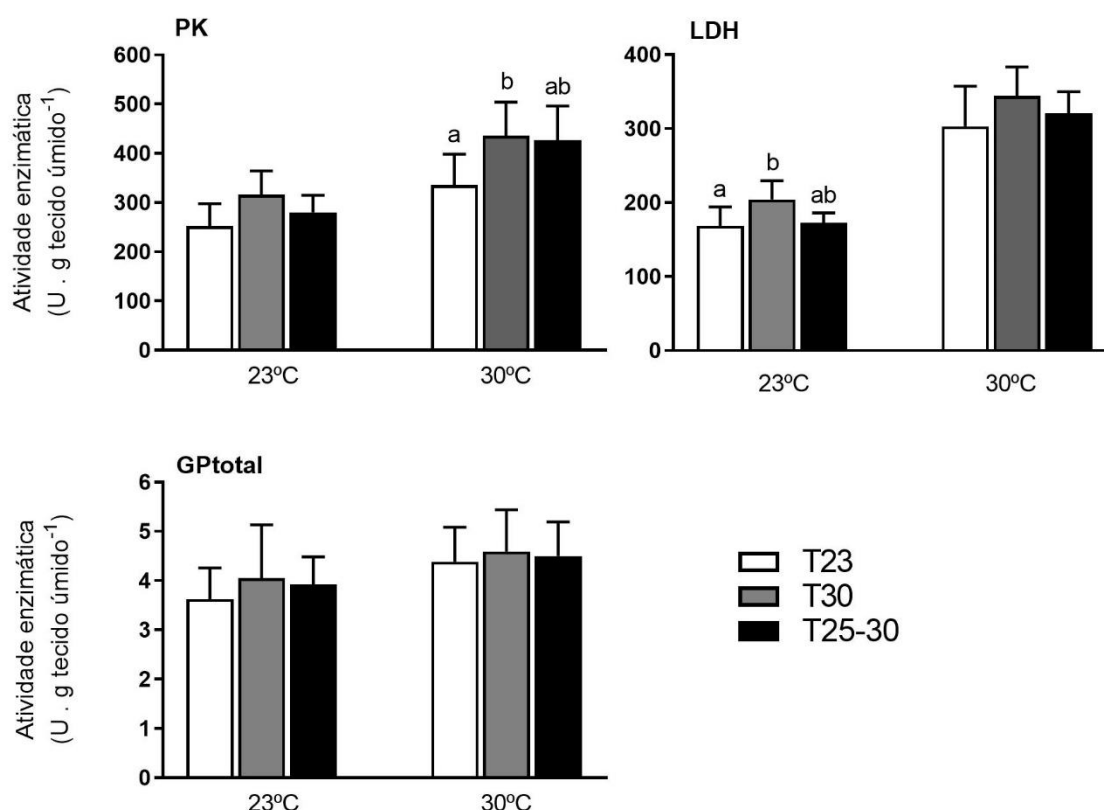


Figura 13 - Atividade máxima (Vmax) de enzimas no músculo esquelético (tríceps femoral) de rãs *L. catenellus* submetidas a diferentes regimes térmicos. A Vmax foi medida à 23 °C e à 30 °C e as colunas e as barras representam a média e o desvio padrão de grupos de animais expostos à 23 °C (T23; n= 6), durante 7 dias, e expostos a 30 °C em regime constante (T30; n= 7) ou cíclico (T25-30; n= 7), durante 20 dias. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os grupos conforme o teste de Dunn ou Tukey (P<0,05).

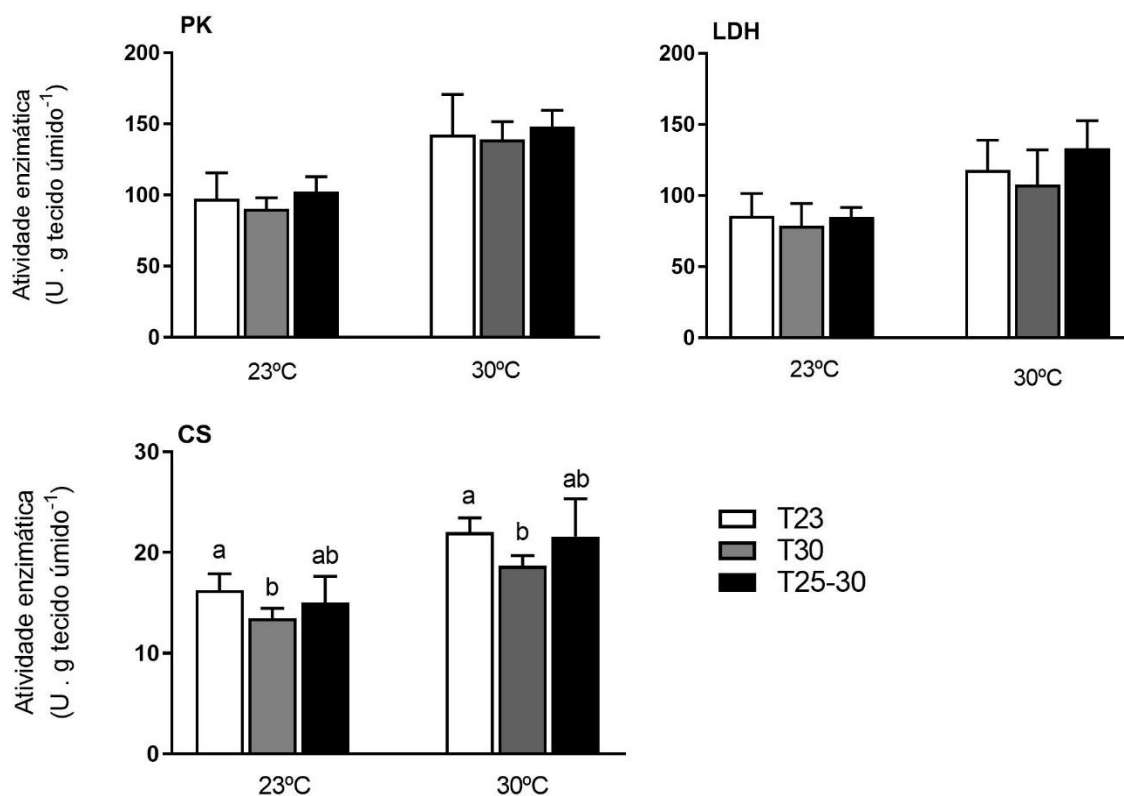


Figura 14 - Atividade máxima (Vmax) de enzimas no ventrículo cardíaco de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes tratamentos térmicos. A Vmax foi medida à 23 °C e à 30 °C e as colunas e as barras representam a média e o desvio padrão de grupos de animais expostos à 23 °C (T23; n= 6), durante 7 dias, e expostos a 30 °C em regime constante (T30; n= 7) ou cíclico (T25-30; n= 7), durante 20 dias. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os grupos conforme o teste de Dunn ou Tukey (P<0,05).

Tabela 5 - Efeito termodinâmico (Q10) nas taxas de reação de enzimas do músculo esquelético (tríceps femoral) e cardíaco de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos.

	Regime térmico		
	T23	T30	T25-30
Tríceps femoral			
PK	1,5 ± 0,3 (6)	1,6 ± 0,3 (6)	1,9 ± 0,4 (7)
LDH	2,3 ± 0,4 (6)	2,1 ± 0,1 (6)	2,5 ± 0,4 (6)
GP _{total}	1,8 ± 0,3 (6)	1,7 ± 0,3 (7)	1,7 ± 0,2 (7)
Ventrículo cardíaco			
PK	1,7 ± 0,1 (6)	1,9 ± 0,2 (7)	1,7 ± 0,2 (7)
LDH	1,6 ± 0,4 (6)	1,6 ± 0,4 (7)	1,9 ± 0,4 (7)
CS	1,6 ± 0,2 (6)	1,6 ± 0,1 (7)	1,7 ± 0,2 (7)

Os valores representam a média e o desvio padrão, com o N amostral entre parênteses, de grupos de animais expostos à 23 °C (T23), durante 7 dias, e expostos a 30 °C em regime constante (T30) ou cíclico (T25-30), durante 20 dias

Adicionalmente, no músculo esquelético não há variação na atividade da fração total da GP em função do regime térmico, mas há diferenças significativas na atividade de enzimas glicolíticas. Especificamente, no tríceps femoral a V_{max} da PK e da LDH é maior no grupo T30 em relação ao grupo T23 e a diferença é significativa nos ensaios à 30 °C para a PK ($P = 0,05$) e nos ensaios à 23 °C para a LDH ($P = 0,03$). Em contraste, no coração não foram detectadas diferenças na V_{max} da PK e da LDH entre os grupos experimentais, porém, destaca-se a menor atividade da CS no grupo T30 em relação ao grupo T23, tanto nos ensaios à 23 °C ($P = 0,04$) quanto à 30 °C ($P = 0,03$).

No fígado, os dados também revelam diferenças importantes na atividade enzimática medida à 23 °C (**Fig. 15**). Assim como nos músculos, a V_{max} da fração total da GP não difere entre os grupos experimentais, porém, a atividade da fração ativa da GP é menor em temperaturas elevadas. Este efeito é significativo para o grupo T30 em relação ao grupo T23 ($P = 0,04$; **Anexo 1**) e há uma tendência similar no grupo T25-30, porém não alcançou significância estatística, possivelmente devido à variabilidade dos dados ($P = 0,06$). Outros efeitos neste tecido incluem a V_{max} da PK menor no grupo T30 em relação ao T23 ($p = 0,02$) e a V_{max} da CS menor nos grupos T30 e T25-30 em relação à T23 ($P = 0,017$ e $0,008$, respectivamente).

De um modo geral, a razão PK:LDH é alta no músculo esquelético e cardíaco, maior do que 1,0, e no fígado os valores são mais baixos, em torno de 0,5. Além disso, no tríceps femoral e no ventrículo cardíaco a razão PK:LDH não difere entre os regimes térmicos. Em contraste, no fígado a razão PK:LDH é menor nos grupos T30 e T25-30 em relação ao grupo T23 ($P = 0,001$ e $P = 0,02$, respectivamente), em grande parte devido à menor V_{max} da PK. Adicionalmente, no fígado a razão LDH:CS é maior em T30 e T25-30 em relação à T23 ($P = 0,02$ e $P = 0,01$, respectivamente), devido à menor atividade da CS. Destaca-se, ainda, a ausência de variação da razão HOAD:CS e PK:CS no fígado; portanto, apesar das diferenças na atividade absoluta da PK e da CS, a contribuição relativa de lipídios e carboidratos para a produção aeróbia de energia no tecido hepático é semelhante nos três regimes.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA 'two way') dos dados de atividade máxima (Vmax) de enzimas no músculo esquelético e cardíaco de rãs *L. catesbeianus*, em função do regime térmico (Fator 1) e da temperatura de ensaio das enzimas (Fator 2).

Fonte de variação		DF	SQ	QM	F	P
Tríceps femoral						
PK	Fator 1	2	44008	22004	6,96	0,003
	Fator 2	1	128,24	128,24	40,58	<0,001
	Interação	2	6707	3354	1,06	0,358
	Resíduo	32	101131	3160		
LDH	Fator 1	2	9381	4691	4,12	0,026
	Fator 2	1	178560	178560	156,9	<0,001
	Interação	2	295,2	147,6	0,13	0,879
	Resíduo	30	34149	1138		
GP	Fator 1	2	0,67	0,33	0,55	0,58
	Fator 2	1	3,92	3,92	6,50	0,015
	Interação	2	0,08	0,04	0,07	0,933
	Resíduo	34	20,48	0,60		
Ventrículo cardíaco						
PK	Fator 1	2	780,6	390,3	1,58	0,22
	Fator 2	1	21667	21667	87,83	<0,001
	Interação	2	25,98	12,99	0,05	0,949
	Resíduo	34	8388	246,7		
LDH	Fator 1	2	1743	871,7	2,67	0,083
	Fator 2	1	13211	13211	40,53	<0,001
	Interação	2	724,5	362,3	1,11	0,341
	Resíduo	34	11082	325,9		
CS	Fator 1	2	66,63	33,31	7,04	0,003
	Fator 2	1	340,2	340,2	71,86	<0,001
	Interação	2	3,248	1,62	0,34	0,712
	Resíduo	34	160,9	4,73		

DF - graus de liberdade; SQ - soma dos quadrados; QM - quadrado médio

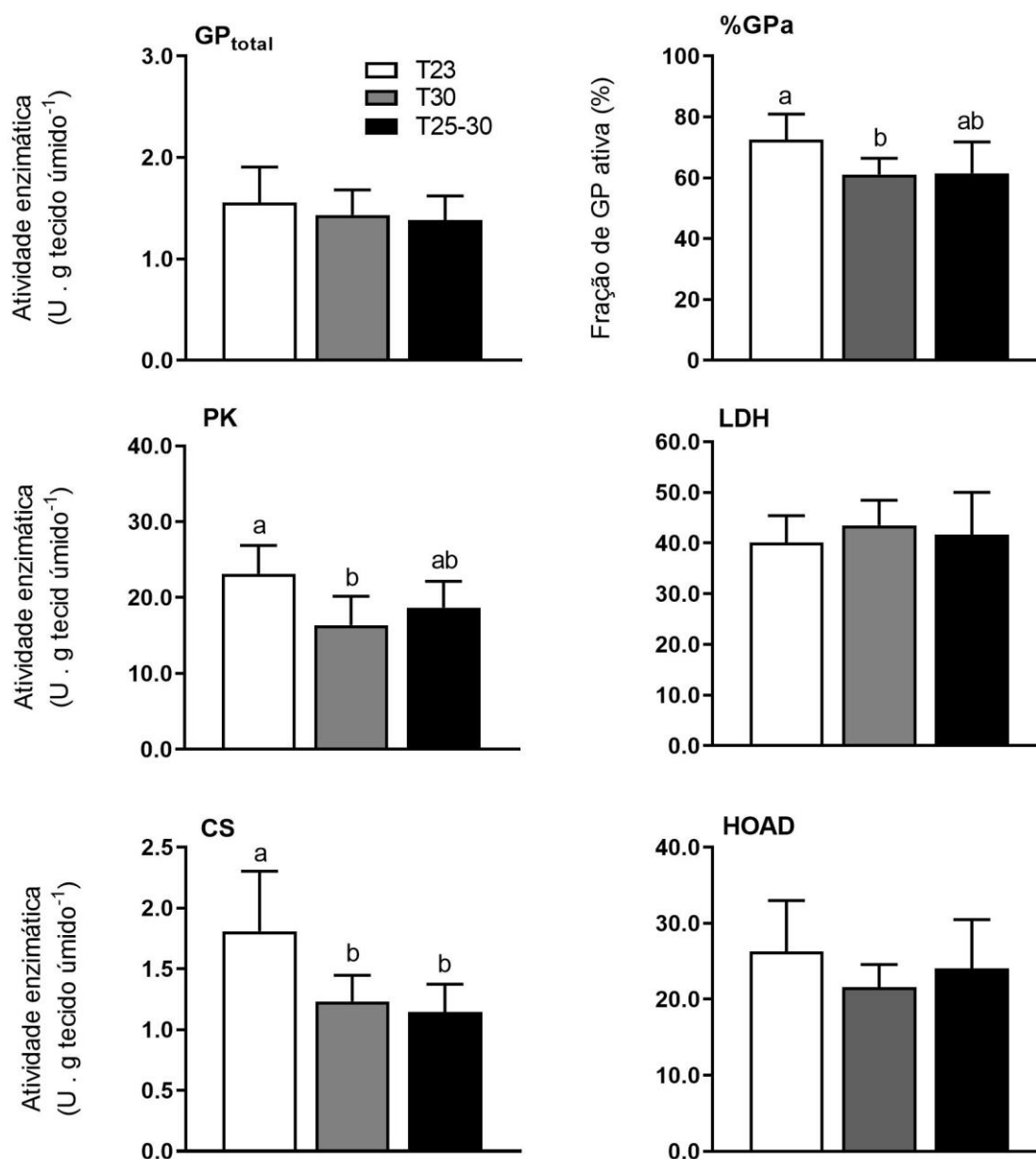


Figura 15 - Atividade máxima (V_{max}) de enzimas no fígado de rãs *L. catesbeianus* submetidas a diferentes regimes térmicos. A V_{max} foi medida à 23 °C e as colunas e as barras representam a média e o desvio padrão de grupos de animais expostos à 23 °C (T23; n= 6) e expostos a altas temperaturas em regime constante (T30; n= 7) ou cíclico (T25-30; n= 7), durante 20 dias. Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os grupos conforme o teste de Dunn ou Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 7 - Razão entre as atividades máximas de enzimas (V_{max}) medidas à 23 °C no músculo esquelético e cardíaco e no fígado de rãs *L. catesbeianus* expostas a diferentes regimes térmicos.

	Regime térmico			F	P
	T23	T30	T25-30		
Tríceps femoral					
PK:LDH	1,50 ± 0,21 (6)	1,56 ± 0,20 (6)	1,50 ± 0,20 (6)	$F_{2,15} = 0,416$	0,66
Ventrículo cardíaco					
PK:LDH	1,15 ± 0,16 (6)	1,18 ± 0,22 (7)	1,21 ± 0,11 (7)	$F_{2,17} = 0,189$	0,82
LDH:CS	5,27 ± 0,84 (6)	5,88 ± 1,32 (7)	5,75 ± 0,76 (7)	$F_{2,17} = 0,688$	0,53
PK:CS	6,04 ± 1,34 (6)	6,71 ± 0,48 (7)	6,52 ± 0,53 (6)	$F_{2,16} = 1,038$	0,38
Fígado					
PK:LDH	0,59 ± 0,12 (6) ^a	0,38 ± 0,06 (6) ^b	0,45 ± 0,05 (7) ^b	$F_{2,16} = 10,56$	<0,01
LDH:CS	23,5 ± 6,64 (5) ^a	35,9 ± 4,60 (7) ^b	37,2 ± 9,53 (7) ^b	$F_{2,16} = 7,027$	<0,01
PK:CS	13,48 ± 3,74 (6)	13,66 ± 2,04 (6)	17,16 ± 5,15 (6)	$F_{2,15} = 1,739$	0,21
HOAD:CS	15,08 ± 4,19 (5)	18,19 ± 4,81 (7)	19,40 ± 2,55 (7)	$F_{2,16} = 1,847$	0,19

Os valores representam a média e o desvio padrão. P refere-se aos testes de ANOVA entre os diferentes tratamentos térmicos. Letras em sobrescrito diferentes indicam grupos significativamente diferentes de acordo com os testes de Tukey ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1. Temperatura elevada em regime constante versus cíclico

Uma hipótese central do presente estudo é que os efeitos da exposição a temperaturas elevadas em regime cíclico (**T25-30**) são mais severos do que em regime constante (**T30**). Entretanto, os resultados indicam que os efeitos foram semelhantes nos grupos **T30** e **T25-30** e ambos apresentaram um mesmo conjunto de alterações em relação ao grupo **T23**: (1) atrofia do intestino médio e dos rins, sugerindo ajustes no metabolismo proteico destes órgãos, (2) ajustes no metabolismo de carboidratos do músculo esquelético e do fígado e (3) inibição do metabolismo aeróbio mitocondrial no coração e no fígado. Embora as diferenças estatísticas nem sempre coincidam nos dois regimes, é provável que o estresse causado por temperaturas máximas em torno de 30 °C no regime cíclico tenha ativado respostas regulatórias similares às observadas no regime constante. Esta interpretação é reforçada pelo fato de que a temperatura da água no ambiente onde as rãs foram cultivadas é mais amena, com média diária de 21,6 °C e média máxima de 23,2 °C no verão (Figura 1), e as flutuações diárias ocorrem lentamente, cerca de 2 °C a cada 12 horas. Adicionalmente, a corticosterona é considerada um importante biomarcador da resposta ao estresse em anfíbios (NARAYAN et al., 2019) e as concentrações plasmáticas deste hormônio são cerca de 10 a 13 vezes maiores nos grupos **T30** e **T25-30** em relação ao grupo mantido a 24 °C, sugerindo um grau similar de estresse térmico nos dois regimes (B. F. FERNANDES, dados não publicados).

A semelhança entre os efeitos da alta temperatura nos grupos **T30** e **T25-30** pode ser uma consequência da diferença na velocidade de aquecimento e resfriamento da água no sistema experimental. No regime cíclico, o aquecimento da água ocorreu relativamente rápido no período de 06 a 12 h, até atingir a temperatura máxima de 30 °C permanecendo estável até às 18 h e o resfriamento da água ocorreu mais lentamente ao longo do período de 18 a 06 h, quando uma nova fase de aquecimento iniciava (Figura 6; Tabela 1). Além disso, a temperatura mínima média da água no regime cíclico foi cerca de 2 °C maior do que a do grupo **T23**. Desse modo, as rãs do grupo **T25-30** foram diariamente expostas a temperaturas próximas de 30 °C por um período de cerca de 10 horas e próximas de 25 °C por um período

de apenas 5 horas, o que possivelmente contribuiu para a semelhança entre os efeitos da temperatura elevada nos dois regimes.

Outra característica importante do sistema experimental é que a temperatura corporal interna das rãs expostas ao ar na plataforma provavelmente era cerca de 2 °C menor do que a da água, conforme indicam as medidas com o modelo em ágar (Figura 8). Curiosamente, as rãs do grupo **T30** exibiram um tempo maior de emersão e exposição ao ar, cerca de 60% do ciclo diário, o dobro do tempo de um grupo que permaneceu à 24 °C (B. F. FERNANDES, dados não publicados). Este comportamento pode ser visto como uma resposta que atenuaria o estresse térmico, embora as concentrações plasmáticas de corticosterona tenham se mantido elevados neste grupo. Além disso, este comportamento pode ser uma resposta a outros efeitos causados pela contínua imersão em água à 30 °C no regime constante, como a menor disponibilidade de oxigênio para trocas gasosas cutâneas na água. O ambiente aquático aquecido apresenta menor solubilidade de oxigênio (BLAUSTEIN et al., 2010) e, dada a importância da respiração cutânea nos anfíbios, o consumo reduzido do oxigênio dissolvido na água poderia afetar negativamente a resposta metabólica do organismo ao aumento da temperatura ambiental (PÖRTNER; BOCK; MARK, 2017). Entretanto, esta interpretação não é conclusiva uma vez que a contínua aeração da água pela circulação no sistema possivelmente atenuou o efeito de hipóxia aquática em altas temperaturas. Além disso, há evidências de que os anfíbios aumentam a contribuição da respiração pulmonar quando há redução da disponibilidade de oxigênio na água em temperaturas mais altas (MCWHINNIE; SCKRABULIS; RAFFEL, 2021).

4.2. Alimentação, alterações da massa dos órgãos e do conteúdo de substratos em temperatura elevada

A ingestão voluntária de alimento não se alterou nas rãs expostas aos diferentes regimes térmicos por 20 dias. Esse resultado contrariou a expectativa de aumento da ingestão alimentar nos grupos **T30** e **T25-30**, esperado devido aos efeitos cinéticos da temperatura sobre as taxas de reações químicas nos organismos (ANGILLETTA, 2009). Quando a temperatura ambiental se aproxima do ótimo do animal, o aumento da demanda energética é em geral compensado por um aumento da quantidade de alimento ingerido; por outro lado, a elevação da temperatura até um

valor próximo do limite crítico pode causar diminuição da ingestão de alimento e redução do escopo aeróbico, com prejuízos ao desempenho geral do animal (VOLKOFF; RØNNESTAD, 2020). Sendo assim, a ausência de aumento da ingestão parece indicar que a temperatura nos grupos **T30** e **T25-30** se aproximou do limite crítico para as rãs estudadas. Adicionalmente, outros fatores podem ter favorecido a alimentação durante o período analisado, por exemplo, o espaço reduzido nos baldes facilita a visualização e o acesso ao alimento. Esta hipótese é reforçada pelas altas taxas de ingestão de barata nos três regimes térmicos, cerca de 90% do total de vezes em que as baratas foram ofertadas. Os ranídeos utilizam a estratégia do tipo 'senta e espera' para captura de alimento e o movimento das baratas provavelmente atuou como estímulo, além da maior facilidade de captura no espaço reduzido dos baldes (BURY; WHELAN, 1984; HADFIELD; CLAYTON; BARNETT, 2006). Além destes fatores, a possibilidade de alternar entre diferentes microambientes no interior dos baldes e a ausência de competidores e de predadores naturais também podem ter contribuído para manutenção da alimentação nas rãs em temperatura elevada.

A massa corpórea das rãs não se alterou nos três regimes térmicos. Entretanto, a massa relativa do intestino médio é menor nos grupos **T30** e **T25-30**. É provável que a atrofia do intestino tenha contribuído para a ausência de aumento da ingestão de alimento, discutida acima, devido à menor capacidade do órgão de processar o alimento ingerido. Este efeito, portanto, é um indicativo de que a exposição à 30 °C por períodos maiores de tempo, seja em regime constante ou cíclico, poderia causar prejuízos ao estado nutricional das rãs. Evidências de redução da massa intestinal durante exposição crônica a temperaturas elevadas também foram encontradas na rã *Lithobates pipiens* (CURTIS; BIDART, 2021) e em girinos da rã chilena *Caudiverbera caudiverbera* (CASTAÑEDA et al., 2006). A flexibilidade do intestino dos vertebrados tem sido sugerida como um dos ajustes fisiológicos mais importantes frente às mudanças nas condições ambientais internas e externas (PIERSMA; LINDSTRÖM, 1997). Em outros contextos de investigação, como o jejum sazonal e a restrição alimentar, as evidências indicam que a atrofia intestinal resulta de mecanismos como apoptose e redução da proliferação celular, com perda de células na extremidade apical das vilosidades, assim como inibição das taxas de síntese proteica no tecido (BURRIN et al., 1991; DUNEL-ERB et al., 2001; GAO et al., 2009; HABOLD et al., 2004; KARASOV et al., 2004; KONARZEWSKI; STARCK, 2000; STARCK, 2003; XU et al., 2018; ZALDÚA; NAYA, 2014). Na rã *Cyclorana alboguttata*, por exemplo, o jejum

na estivação causou redução da altura e da densidade das microvilosidades intestinais, possivelmente devido à inibição da taxa de proliferação ou de migração celular, ou ainda pela rápida redução do conteúdo lipídico dos enterócitos (CRAMP; FRANKLIN, 2005; CRAMP; FRANKLIN; MEYER, 2005). Um mecanismo similar de transferência de gotículas lipídicas dos enterócitos para os hepatócitos do fígado, acompanhada de redução do fluxo sanguíneo na mucosa intestinal, foi proposto para explicar a atrofia intestinal nos répteis que se comportam como predadores esporádicos (STARCK, 2003; STARCK; BEESE, 2001, 2002; STARCK; CRUZ-NETO; ABE, 2007). Nestes répteis destaca-se a velocidade com que ocorre o aumento da massa intestinal após o jejum, cerca de 50-100% em 2-3 dias, proporcionado por um mecanismo de incorporação de lipídios em vesículas e hipertrofia dos enterócitos. Na rã touro, a atrofia intestinal ocorreu em resposta à elevação da temperatura, sem interrupção da alimentação, e os mecanismos responsáveis não são conhecidos. Porém, este efeito pode estar associado a um aumento da concentração plasmática de corticosterona nas rãs (B. F. FERNANDES, dados não publicados), o qual possivelmente teria o potencial de inibir a síntese e estimular o catabolismo proteico na mucosa intestinal (BURRIN et al., 1991; ZALDÚA; NAYA, 2014). O intestino apresenta uma elevada taxa metabólica específica (STOREY, 2004) e a diminuição da massa intestinal teria o potencial de contribuir para uma redução do gasto energético. Além disso, a atrofia aumentaria a disponibilidade de aminoácidos no sangue, os quais poderiam ser usados como precursores na síntese de proteínas e carboidratos em outros tecidos do animal (KRAUS-FRIEDMAN, 1988).

A massa relativa dos rins também é menor nas rãs expostas aos regimes **T30** e **T25-30**. Os efeitos térmicos na função renal dos vertebrados foram intensamente estudados em associação ao papel deste órgão na conservação de água (EVANS, 2008). Mais recentemente, o conceito de termo-hidro-regulação foi proposto para expressar a ideia de que o desempenho dos vertebrados terrestres frente ao aquecimento global pode ser alterado ou prejudicado pela desidratação (ROZEN-RECHELS et al., 2019). Entretanto, no presente estudo as condições eram favoráveis à manutenção do balanço hídrico, uma vez que a umidade relativa do ar no interior dos baldes provavelmente era elevada e havia uma lâmina de água sobre a plataforma que permitia a absorção de água através da pele nos períodos de emersão (TOLEDO; JARED, 1993; UCHIYAMA; KONNO, 2006). A plasticidade dos rins em anfíbios também é evidenciada no jejum durante a estivação. Por exemplo, na rã

Cyclorana platycephala observou-se uma redução de 44% da massa renal ao longo de sete meses de estivação, quando as células renais teriam diminuído de tamanho porém a sua funcionalidade seria mantida, permitindo a conservação de água na estação seca (KAYES; CRAMP; FRANKLIN, 2009). Um estudo comparando anfíbios estivantes e não-estivantes verificou uma maior plasticidade dos rins associada à ação dinâmica específica na retomada da alimentação, quando ocorre um aumento da massa do órgão nas espécies mais resistentes ao jejum (SECOR, 2005). Em geral, as evidências sugerem que não há um padrão único de regulação da massa renal em resposta ao jejum em anfíbios e répteis (MERKLE; HANKE, 1988; NAYA et al., 2010; NAYA; VELOSO; BOZINOVIC, 2008; TRACY; DIAMOND, 2005). Na rã touro, o mecanismo ativado pela temperatura alta que teria levado à redução da massa renal é desconhecido, contudo, é possível que envolva um efeito modulador dos processos de síntese e degradação proteica também no tecido renal.

Em contraste com o intestino e os rins, a ausência de diferenças da massa relativa do ventrículo cardíaco das rãs sugere que um provável efeito do estresse térmico sobre as taxas de síntese e degradação de proteínas foi seletivo e não ocorreu no coração. Diversos estudos com comparações intra e interespecíficas indicam que a massa do ventrículo cardíaco é um dos fatores relacionados com a capacidade aeróbica e a tolerância térmica (ANTTILA et al., 2013; BENNETT; HUEY; JOHN-ALDER, 1984; HILLMAN, 1976; PÖRTNER; BOCK; MARK, 2017). Por exemplo, no salmão do Atlântico *Salmo salar*, os indivíduos que possuem maior massa ventricular também apresentam maior tolerância a temperaturas elevadas, devido à capacidade do coração de gerar um volume sistólico maior e de atender ao aumento de demanda dos tecidos (ANTTILA et al., 2013). No entanto, a aclimatação térmica associada a mudanças metabólicas sazonais nem sempre é acompanhada de alteração da massa ventricular e o desempenho cardíaco por vezes é mantido durante períodos de menor atividade (NAYA; VELOSO; BOZINOVIC, 2008; SECOR, 2005; TRACY; DIAMOND, 2005). Na rã touro, a ausência de diferenças da massa ventricular seria uma evidência de que a capacidade funcional do coração encontra-se preservada, mas não aumentada, em condições de temperatura elevada.

A massa relativa do fígado e dos corpos gordurosos das rãs também não difere nos regimes térmicos. O fígado é um importante órgão de armazenamento de proteína solúvel e substratos e é um centro de conversão de substratos de alta energia, de modo que a sua massa pode se alterar com as mudanças no conteúdo de substratos

(WITHERS; HILLMAN, 2001). Peixes antárticos apresentaram cerca de 40% de redução da massa hepática após exposição a temperaturas elevadas por 60 dias, sugerindo que a quantidade de alimento ingerido não foi suficiente para atender ao aumento da demanda metabólica (WINDISCH et al., 2014). Nas carpas, a massa do fígado aumentou em torno de 15% juntamente com o acúmulo de glicogênio na fase que antecede a hipóxia de inverno (VORNANEN; STECYK; NILSSON, 2009). No presente estudo, o acúmulo de glicogênio no fígado das rãs do grupo **T30** não causou uma alteração detectável da massa do órgão, possivelmente porque o teor lipídico é ligeiramente menor neste grupo e contrabalançou parcialmente o aumento do teor de glicogênio (Tabelas 3 e 4). Os corpos gordurosos constituem a principal reserva lipídica dos anfíbios, além de pequenos depósitos na carcaça e em tecidos do corpo, especialmente músculos, fígado e órgãos reprodutivos, os quais são utilizados para atender às variações de demanda energética (BYRNE; WHITE, 1975; FITZPATRICK, 1976). Flutuações sazonais da massa dos corpos gordurosos refletem as alterações do seu conteúdo lipídico em épocas de reprodução, dormência, jejum prolongado e metamorfose, porém, em muitos casos os corpos gordurosos parecem ser preferencialmente reservados para a reprodução (BRADFORD, 1983; BRENNER, 1969; FITZPATRICK, 1976; MIZELL, 1965; SMITH, 1954, 1950). Na rã touro, o teor lipídico do músculo esquelético e do fígado também não se alterou com a exposição a temperaturas elevadas, sugerindo que os estoques lipídicos em geral não foram mobilizados durante o estresse térmico. Este resultado, em conjunto com o acúmulo de glicogênio no fígado, indica que a quantidade de alimento ingerido e de nutrientes absorvidos foi adequada ao metabolismo das rãs.

4.3. Reorganização do metabolismo de carboidratos em temperatura elevada

Os resultados indicam que a exposição a temperaturas elevadas desencadeou ajustes importantes no metabolismo de carboidratos das rãs. No músculo esquelético observou-se uma maior atividade das enzimas PK e LDH e uma menor concentração de glicogênio e maior de glicose livre, sugerindo ativação da glicogenólise e aumento do uso de glicose como fonte de energia no tecido. Em anfíbios e répteis, a ativação da glicogenólise e da glicólise resulta em maior liberação de energia para a contração muscular na atividade de alta intensidade e curta duração (BENNETT, 1978, 1982;

CUMMINGS, 1979; FOURNIER; GUDERLEY, 1993; GLEESON, 1982, 1991; GLEESON; DALESSIO, 1989; MOBERLY, 1968; NAVAS; GOMES; CARVALHO, 2008; PETERSEN; GLEESON, 2007; TAIGEN; EMERSON; POUGH, 1982). Na rã-touro, observações comportamentais indicam que a exposição à temperatura elevada não foi acompanhada de aumento da atividade locomotora no interior dos baldes (B. F. FERNANDES, dados não publicados). Assim, é possível que o aumento de temperatura tenha elevado o custo de manutenção do tecido muscular no repouso, sem alterar o padrão de inatividade característico das rãs. Um aumento da atividade de enzimas glicolíticas no músculo em resposta ao estresse térmico também foi observado em outros ectotermos (FEDER, 1983) e, de modo geral, os animais utilizam primeiramente o glicogênio muscular como fonte de energia e posteriormente o glicogênio hepático (LERMEN et al., 2004).

O aumento do catabolismo de glicogênio no músculo das rãs em exposição à temperatura elevada não está associado a um aumento da GP_{total}, indicando que o ajuste ocorreu por meio de um aumento da forma ativa de moléculas pré-existentes da enzima. Entretanto, a GP_a apresentou valores baixos e erráticos, possivelmente porque as rãs se encontravam em repouso (MOMMAERTS; VEGH; HOMSHER, 1975). A regulação da GP envolve diferentes estímulos e, no músculo esquelético, a epinefrina e a contração muscular desempenham um importante papel na ativação da enzima, desencadeando uma elevação da concentração de Ca²⁺ citoplasmático e de AMP que resultam no aumento da GP_a (AGIUS, 2015). O músculo esquelético de anuros se caracteriza por contrações rápidas e uma elevada capacidade anaeróbia (GERAGHTY; KAUFER, 2015; PUTNAM; BENNETT, 1983), entretanto, a razão PK:LDH em torno de 1,5 no músculo da rã touro em todos os regimes térmicos indica um potencial maior de formação de piruvato em relação ao potencial de redução de piruvato à lactato. Esta característica, embora incomum na maioria dos tipos musculares esqueléticos de anfíbios, foi observada em outros anuros (CARVALHO, 2004; MENDIOLA; MOLINA; DE COSTA, 1991). Porém, não há dados conclusivos a respeito do possível papel da atenuação do fluxo glicolítico no sentido da produção de lactato.

Em contraste, no fígado das rãs expostas a temperaturas altas observou-se uma menor atividade da GP_a e da PK juntamente com acúmulo de glicogênio, sem alteração do teor de glicose livre, sugerindo inibição da degradação de glicogênio e do uso de glicose como fonte de energia para o tecido. Os padrões distintos de

resposta no músculo e no fígado refletem os diferentes papéis desempenhados por estes órgãos, além de diferenças na regulação das etapas envolvidas no metabolismo de carboidratos. A inibição da glicogenólise no fígado está associada a menor atividade GP_a e ausência de alteração da GP_{total}, reforçando a ideia de que a regulação da glicogenólise na rã-touro ocorre por interconversão das formas ativa e inativa de moléculas pré-existentes da enzima (AGIUS, 2015). As evidências de aumento da proteólise no intestino e nos rins, juntamente com o aumento da glicogenólise no músculo esquelético, sugerem um aumento da disponibilidade de aminoácidos e lactato na corrente sanguínea, que teriam sido usados como precursores na gliconeogênese hepática. Os altos níveis de corticosterona também podem ter atuado na ativação desta via (HANKE; NEUMANN, 1972; LANGE; HANKE, 1988) e a glicose resultante provavelmente foi usada na síntese de glicogênio. A menor atividade da PK sugere inibição da glicólise hepática e pode ser consequência do acúmulo de alanina no tecido, gerado pela degradação das proteínas. A alanina sofre transaminação originando piruvato, que é transformado em oxalacetato e este em fosfoenolpiruvato, que segue para a via gliconeogênica e consequente formação de glicose. Assim, a inibição da PK inibe a reconversão de fosfoenolpiruvato em piruvato (MARZZOCO; TORRES, 2020). Em peixes e anfíbios, postula-se que o aumento do estoque de glicogênio hepático confere uma maior resistência à hipóxia e também uma maior resistência ao calor, uma vez que os carboidratos podem ser metabolizados em condições de hipoxemia induzida pelo calor (HANKE; NEUMANN, 1972; MOON; JOHNSTON, 1980; SCAPIN; DI GIUSEPPE, 1994; WINDISCH et al., 2011, 2014; YANG; CAO; FU, 2015). Na truta, a exposição à temperatura alta em regime cíclico durante 24 h resultou em diminuição do glicogênio hepático, porém o estoque foi restabelecido após 3 dias de exposição (CALLAGHAN et al., 2016). Estes autores propuseram que, com o prolongamento do tempo de exposição e a repetição dos ciclos, os ajustes metabólicos na truta tenderiam a um acúmulo de substratos no fígado em preparação para condições térmicas mais severas e mais duradouras. O acúmulo de glicogênio no fígado da rã-touro após 20 dias de exposição a altas temperaturas reforça esta interpretação.

No ventrículo cardíaco, as atividades PK e LDH são similares entre os regimes térmicos, sugerindo que o tecido manteve a capacidade de utilização de glicose e lactato em condições de temperaturas elevadas. A atividade da LDH é menor no coração da rã touro em comparação a outros ectotermos e endotermos estudados,

indicando um potencial relativamente menor de reconversão de lactato da corrente sanguínea em piruvato e de utilização de lactato na produção aeróbia de energia (DRIEDZIC; GESSER, 1994; GLEESON, 1991, 1996). Adicionalmente, a razão PK:LDH do tecido é relativamente alta e similar nos regimes térmicos (média= 1,2), indicando um potencial maior de formação de piruvato a partir de glicose do que de oxidação do lactato sanguíneo. Valores maiores do que 1,0 para a razão PK:LDH no coração são relativamente incomuns e enfatizam uma preferência do tecido por carboidrato na produção aeróbia de energia, possivelmente devido ao maior rendimento de energia por mol de O₂ com carboidrato. Alguns exemplos incluem mamíferos de altitudes elevadas e peixes amazônicos, ambos altamente tolerantes à hipóxia (CHIPPARI-GOMES et al., 2005; HOCHACHKA, 1992; HOCHACHKA et al., 1983) e o beija-flor, cujo tecido cardíaco apresenta uma excepcional capacidade aeróbia (SUAREZ; BROWN; HOCHACHKA, 1986).

Não há evidências de alteração da sensibilidade térmica (Q₁₀) das enzimas GP_{total}, PK e LDH nos tecidos, na faixa de temperatura analisada. Portanto, as diferenças de atividade enzimática entre os regimes térmicos provavelmente refletem expressão gênica diferencial e mudanças na concentração da enzima. É possível que o tempo de exposição e a temperatura máxima nos regimes térmicos aos quais as rãs foram expostas não tenham sido suficientes para induzir modificações na estrutura tridimensional das enzimas (STOREY, 2004).

4.4. Redução da capacidade aeróbia em temperatura elevada

Os resultados mostram uma menor atividade CS no ventrículo cardíaco no grupo **T30**, indicando uma diminuição do potencial de fosforilação oxidativa no tecido da rã touro expostas a temperaturas elevadas. O mesmo efeito foi observado no coração do peixe *Perca fluviatilis*, exposto a temperaturas superiores a 30°C (EKSTRÖM et al., 2017). Os efeitos térmicos no coração são determinantes importantes da tolerância térmica dos animais, devido ao importante papel que este órgão desempenha em fornecer oxigênio e nutrientes aos tecidos (FARRELL, 2002; FARRELL et al., 2009; KEEN; GAMPERL, 2012; WANG; OVERGAARD, 2007). O coração é o tecido que apresenta a mais alta capacidade aeróbia nos vertebrados (MOYES; HOOD, 2003) e, em muitos ectotermos, a respiração mitocondrial cardíaca diminui quando a temperatura ambiental se aproxima do limite crítico superior,

comprometendo o desempenho do órgão e a sobrevivência do animal (HILTON; CLEMENTS; HICKEY, 2010; IFTIKAR; HICKEY, 2013; PÖRTNER; BOCK; MARK, 2017). Essa menor atividade mitocondrial em altas temperaturas é atribuída a diversos fatores, como a redução da eficiência de fosforilação oxidativa devido ao aumento do vazamento de prótons na membrana mitocondrial, a incapacidade de aumentar a atividade dos complexos respiratórios e a formação de espécies reativas de oxigênio e subprodutos do metabolismo anaeróbio (CHUNG; SCHULTE, 2015; FREDERICH; PÖRTNER, 2000; HILTON; CLEMENTS; HICKEY, 2010; IFTIKAR; HICKEY, 2013; MICHAELSEN; FAGO; BUNDGAASRD, 2021; SOMMER; KLEIN; PÖRTNER, 1997; STROBEL et al., 2013). Assim, a menor atividade CS no coração das rãs do grupo **T30** indica um possível gargalo para as etapas posteriores do processo de oxidação de substratos no ciclo de Krebs em temperaturas mais altas. Em contraste, diferenças interindividuais de capacidade aeróbica máxima na rã *Rana catesbeiana* (= *Lithobates catesbeianus*) estão relacionadas com a massa ventricular e a concentração de hemoglobina (WALSBERG; LEA; HILLMAN, 1986). Essas características individuais possivelmente interagem com os efeitos térmicos e modulam o seu impacto na função cardíaca das rãs.

Apesar da menor atividade CS cardíaca no regime **T30**, a razão entre as enzimas PK:CS e LDH:CS é igualmente elevada em **T23**, **T30** e **T25-30** (média dos regimes= 6,4 e 5,6, respectivamente). Este resultado indica que o tecido cardíaco das rãs em exposição a temperaturas altas conserva um elevado potencial de utilização de piruvato e lactato na oxidação mitocondrial. Uma razão LDH:CS elevada no tecido cardíaco também foi observada em *Rana pipiens* (aproximadamente 11,5), mas não constitui um padrão entre os anuros conforme indicam os valores mais baixos (aproximadamente 2,7 no verão) reportados para *Hypsiboas prasinus* (DRIEDZIC et al., 1987; KISS et al., 2009). Possivelmente esta diferença se relaciona ao hábito de vida de cada espécie.

A atividade CS no fígado é menor nas rãs expostas a temperaturas elevadas, tanto no regime constante quanto no cíclico, indicando uma inibição da capacidade oxidativa do tecido. Uma redução da atividade CS no fígado também foi observada na truta (*Oncorhynchus mykiss*) exposta a temperaturas elevadas e abaixo do limite crítico, em regime cíclico, durante três dias (CALLAGHAN et al., 2016). A redução da capacidade aeróbia do fígado pode influenciar diretamente a taxa de síntese de proteínas no órgão. O custo energético da síntese proteica corresponde a 12% do

consumo de O₂ nos hepatócitos de sapos (FUERY; WITHERS; GUPPY, 1998) e 36% nos hepatócitos de tartarugas (LAND; BUCK; HOCHACHKA, 1993). Um exemplo que interconecta essas evidências é a observação de que a taxa de síntese proteica diminui no fígado de peixes sapo expostos a temperaturas elevadas (HASCHEMEYER; MATHEWS, 1982). Além deste efeito, o estresse térmico causou alterações morfológicas deletérias nos hepatócitos do peixe *Megalobrama amblycephala* e da rã *Quasipa spinosa*, como perda de matriz e de cristas mitocondriais e danos nas membranas externas e internas da organela, as quais resultam em maior produção de ROS, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (LIU et al., 2016, 2018).

A razão LDH:CS é alta no fígado e aumenta com a inibição da CS em temperaturas elevadas, indicando uma redução do metabolismo aeróbio e a manutenção de um alto potencial de conversão de lactato a piruvato. Esta característica dá suporte à ideia de um importante papel do tecido na gliconeogênese a partir de lactato sanguíneo, favorecendo o acúmulo de glicogênio no fígado das rãs expostas a temperaturas elevadas. A alta razão HOAD:CS nos hepatócitos sugere que a atividade HOAD produz acetil-CoA em excesso com respeito à capacidade de oxidação deste composto nas mitocôndrias e que, portanto, o fígado pode ser um importante sítio cetogênico nas rãs (NELSON; COX, 2013).

5. CONCLUSÕES

O presente estudo revelou efeitos semelhantes da exposição de rãs touro a temperatura elevadas nos regimes constante e cíclico. Este resultado possivelmente se deve ao estresse causado por temperaturas máximas em torno de 30 °C nos dois regimes, o qual teria ativado respostas regulatórias persistentes no regime cíclico e similares às observadas no regime constante, e também às altas taxas de aquecimento e baixas de resfriamento da água no sistema experimental. Assim, o sistema de circulação de água se mostrou adequado ao estudo proposto e ajustes metodológicos poderão contribuir para expandir a investigação de eventuais diferenças entre os dois regimes. Dentre os efeitos observados destaca-se a manutenção da ingestão de alimento nas rãs em condições de temperaturas altas, juntamente com evidências de atrofia do intestino médio e dos rins. A redução da massa dos órgãos em condições que não envolveram jejum sugere a importância de ajustes seletivos do metabolismo proteico e do custo energético de manutenção destes órgãos. A ausência de alteração da massa dos corpos gordurosos e do teor lipídico do músculo esquelético e do fígado, por sua vez, indica que a compensação metabólica à elevação da temperatura não envolveu mobilização dos estoques lipídicos nas rãs e teria sido feita, em grande parte, às custas da alimentação. No músculo esquelético, porém, o menor teor de glicogênio e a maior atividade de enzimas glicolíticas evidenciam um aumento do uso de glicose como fonte de energia, possivelmente associado a um aumento do custo de manutenção do tecido no repouso.

Em contraste, o acúmulo de glicogênio no fígado das rãs expostas a altas temperaturas por 20 dias, junto às evidências de inibição da glicogenólise e da glicólise no tecido, sugerem um importante papel dos carboidratos na tolerância a altas temperaturas e uma potencial redução da capacidade aeróbia nas rãs. A menor atividade CS no ventrículo cardíaco e no fígado das rãs em altas temperaturas dá suporte a essa ideia uma vez que constitui um forte indício de diminuição do potencial de fosforilação oxidativa nestes tecidos, com prejuízos para importantes funções e processos tais como o fornecimento de oxigênio e nutrientes aos tecidos e o metabolismo lipídico e proteico. Por fim, o comportamento de algumas enzimas analisadas nas temperaturas de 23 e 30 °C sugere que as diferenças de atividade

entre os regimes térmicos não envolvem alteração de sensibilidade térmica (Q10) e possivelmente refletem expressão gênica diferencial das enzimas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 46, p. 34–45, 2015.

ANGILLETTA, M. J. **Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis**. [s.l.] Oxford University Press Inc., 2009.

ANTTILA, K. et al. Variation in temperature tolerance among families of atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 7, p. 1183–1190, 2013.

ARRIGHI, J. M. et al. Daily temperature fluctuations unpredictably influence developmental rate and morphology at a critical early larval stage in a frog. **BMC Ecology**, v. 13, n. 18, p. 11, 2013.

BARTHELD, J. L.; ARTACHO, P.; BACIGALUPE, L. Thermal performance curves under daily thermal fluctuation: A study in helmeted water toad tadpoles. **Journal of Thermal Biology**, v. 70, n. August, p. 80–85, 2017.

BENNETT, A. F. Activity metabolism of the lower vertebrates. **Annual review of physiology**, v. 40, p. 447–469, 1978.

BENNETT, A. F. The Energetics of Reptilian Activity. **Biology of the Reptilia**, p. 155–199, 1982.

BENNETT, A. F.; HUEY, R. B.; JOHN-ALDER, H. Physiological correlates of natural activity and locomotor capacity in two species of lacertid lizards. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 154, n. 2, p. 113–118, 1984.

BLAUSTEIN, A. R. et al. Direct and Indirect Effects of Climate Change on Amphibian Populations. **Diversity**, n. 2, p. 281–313, 2010.

BLAUSTEIN, A. R. et al. Ecophysiology meets conservation: Understanding the role of disease in amphibian population declines. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1596, p. 1688–1707, 2012.

BOZINOVIC, F. et al. The mean and variance of environmental temperature interact to determine physiological tolerance and fitness. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 84, n. 6, p. 543–552, 2011.

BOZINOVIC, F. Physiological correlates of geographic range in animals. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, n. May 2014, 2011.

BOZINOVIC, F. et al. Acclimation to daily thermal variability drives the metabolic performance curve. **Evolutionary Ecology Research**, v. 15, n. 5, p. 579–587, 2013.

BRADFORD, D. F. Winterkill, oxygen relations, and energy metabolism of a submerged dormant amphibian, *Rana muscosa*. **Ecology**, v. 64, n. 5, p. 1171–1183, 1983.

BRENNER, F. J. The Role of Temperature and Fat Deposition in Hibernation and Reproduction in Two Species of Frogs. **Herpetologica**, v. 25, n. 2, p. 105–113, 1969.

BURRIN, D. G. et al. Stage of development and fasting affect protein synthetic activity in the

- gastrointestinal tissues of suckling rats. **Journal of Nutrition**, v. 121, n. 7, p. 1099–1108, 1991.
- BURY, R. B.; WHELAN, J. A. **Ecology and Management of the Bullfrog**. Washington: Resource Publication 155, 1984.
- 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, 1975.
- CALLAGHAN, N. I. et al. Metabolic adjustments to short-term diurnal temperature fluctuation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 89, n. 6, p. 498–510, 2016.
- CAREY, C. Effect of constant and fluctuating temperatures on resting and active oxygen consumption of toads, *Bufo boreas*. **Oecologia**, v. 39, n. 2, p. 201–212, 1979.
- CARVALHO, J. E. **Correlações Entre as Capacidades Metabólicas Energéticas, o Ambiente Térmico e a Atividade em Anfíbios Anuros do Gênero Scinax (Anura / Hylidae)**. [s.l: s.n.].
- CASTAÑEDA, L. E. et al. Digestive plasticity in tadpoles of the Chilean giant frog (*Caudiverbera caudiverbera*): Factorial effects of diet and temperature. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 5, p. 919–926, set. 2006.
- CASTRO, C. S. et al. Archivos de Zootecnia Feeding rates for bullfrogs with automated feed management and high feeding. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, n. 253, p. 126–130, 2017.
- CHIPPARI-GOMES, A. R. et al. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 141, n. 3, p. 347–355, 2005.
- CHUNG, D. J.; SCHULTE, P. M. Mechanisms and costs of mitochondrial thermal acclimation in a eurythermal killifish (*Fundulus heteroclitus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 11, p. 1621–1631, 2015.
- CRAMP, R. L.; FRANKLIN, C. E. Arousal and re-feeding rapidly restores digestive tract morphology following aestivation in green-striped burrowing frogs. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 142, n. 4, p. 451–460, 2005.
- CRAMP, R. L.; FRANKLIN, C. E.; MEYER, E. A. The impact of prolonged fasting during aestivation on the structure of the small intestine in the green-striped burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*. **Acta Zoologica**, v. 86, n. 1, p. 13–24, 2005.
- CUMMINGS, J. W. Physiological and biochemical adaptations to training in *Rana pipiens*. **Journal of Comparative Physiology** □ **B**, v. 134, n. 4, p. 345–350, 1979.
- CUNHA, E. R.; DELARIVA, R. L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802): uma revisão. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia (Campo Mourão)**, v. 4, n. 2, p. 34–46, 2009.
- CURTIS, A. N.; BIDART, M. G. Increased Temperature Influenced Growth and Development of *Lithobates pipiens* Tadpoles Exposed to Leachates of the Invasive Plant European Buckthorn (*Rhamnus cathartica*) and a Triclopyr Herbicide. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 2547–2558, 2021.

DE ANDRADE, D. V.; BEVIER, C. R.; DE CARVALHO, J. E. **Amphibian and Reptile Adaptations to the Environment: Interplay Between Physiology and Behavior**. [s.l.: s.n.].

DENNY, M. The fallacy of the average : on the ubiquity , utility and continuing novelty of Jensen ' s inequality. p. 139–146, 2017.

DENVER, R. J. Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1163, p. 1–16, 2009.

DIFFENBAUGH, N. S.; FIELD, C. B. Changes in ecologically critical terrestrial climate conditions. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 486–492, 2013.

DILLON, M. E.; WANG, G.; HUEY, R. B. Global metabolic impacts of recent climate warming. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 704–706, 2010.

DONG, Y. et al. Effects of diel temperature fluctuations on growth, oxygen consumption and proximate body composition in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. **Aquaculture**, v. 255, n. 1–4, p. 514–521, 2006.

DRIEDZIC, W. R. et al. Matching of vertebrate cardiac energy demand to energy metabolism. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 252, n. 5 (21/5), 1987.

DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: Hypoxia, acidosis, and low temperature. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 221–258, 1994.

DU, W. G.; FENG, J. H. Phenotypic effects of thermal mean and fluctuations on embryonic development and hatchling traits in a lacertid lizard, *Takydromus septentrionalis*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 309, n. 3, p. 138–146, 2008.

DUARTE, H. et al. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. **Global Change Biology**, v. 18, n. 2, p. 412–421, 2012.

DUNEL-ERB, S. et al. Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 129, n. 4, p. 933–947, 2001.

EKSTRÖM, A. et al. Thermal sensitivity and phenotypic plasticity of cardiac mitochondrial metabolism in European perch, *Perca fluviatilis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 3, p. 386–396, 2017.

EVANS, D. . **and Ionic**. [s.l.: s.n.].

FARRELL, A. P. Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: Insights into cardiovascular design limitations in fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 797–810, 2002.

FARRELL, A. P. et al. Fish cardiorespiratory physiology in an era of climate change. **Canadian Journal of Zoology**, v. 87, n. 10, p. 835–851, 2009.

FEDER, M. E. Metabolic and Biochemical Correlates of Thermal Acclimation in the Rough-Skinned Newt *Taricha granulosa*. **Physiological Zoology**, v. 56, n. 4, p. 513–521, 1983.

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; NETO, J. S. P. Introdução à Ranicultura. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, v. 33, p. 15, 2002.

FITZPATRICK, L. C. Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians. **Integrative and Comparative Biology**, v. 16, n. 4, p. 725–732, 1976.

FOURNIER, P. A.; GUDERLEY, H. Muscle: The predominant glucose-producing organ in the leopard frog during exercise. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 2 33-2, p. 239–243, 1993.

FREDERICH, M.; PÖRTNER, H. O. Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 5 48-5, p. 1531–1538, 2000.

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 - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 119, n. 2, p. 459–467, 1998.

GANGLOFF, E. J.; TELEMCO, R. S. High temperature, oxygen, and performance: Insights from reptiles and amphibians. **Integrative and Comparative Biology**, v. 58, n. 1, p. 9–24, 2018.

GAO, F. et al. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 4, p. 714–722, 2009.

GERAGHTY, A. C.; KAUFER, D. Glucocorticoid Signaling. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 872, p. 253–78, 2015.

GLEESON, T. T. Lactate and glycogen metabolism during and after exercise in the lizard *Sceloporus occidentalis*. **Journal of Comparative Physiology ■ B**, v. 147, n. 1, p. 79–84, 1982.

GLEESON, T. T. Patterns of Metabolic Recovery from Exercise in Amphibians and Reptiles. **Journal of Experimental Biology**, v. 160, n. 1, p. 187–207, 1991.

GLEESON, T. T. Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. **Annual Review of Physiology**, v. 58, p. 565–581, 1996.

GLEESON, T. T.; DALESSIO, P. M. Lactate and Glycogen Metabolism in the Lizard *Dipsosaurus Dorsalis* following Exhaustive Exercise. **Journal of Experimental Biology**, v. 144, n. 1, p. 377–393, 1989.

GUNDERSON, A. R.; STILLMAN, J. H. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1808, 2015.

HABOLD, C. et al. Effects of fasting and refeeding on jejunal morphology and cellular activity in rats in relation to depletion of body stores. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 6, p. 531–539, 2004.

HADFIELD, C. A.; CLAYTON, L. A.; BARNETT, S. L. Nutritional Support of Amphibians. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 15, n. 4, p. 255–263, 2006.

HANKE, W.; NEUMANN, U. Carbohydrate metabolism in Amphibia. **General and**

Comparative Endocrinology, v. 3, n. SUPPL., p. 198–208, 1 jan. 1972.

HASCHEMEYER, E. V.; MATHEWS, R. W. Effects of Temperature Extremes on Protein Synthesis in Liver of Toadfish , *Opsanus tau* , in vivo. **Biological Bulletin**, v. 162, n. 1, p. 18–27, 1982.

HERMAN, C. A. Comparative effects of epinephrine and norepinephrine on plasma glucose and hematocrit levels in the American bullfrog (*Rana catesbeiana*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 32, n. 3, p. 321–329, 1977.

HILLMAN, S. S. Cardiovascular correlates of maximal oxygen consumption rates in anuran amphibians. **Journal of Comparative Physiology ■ B**, v. 109, n. 2, p. 199–207, 1976.

HILTON, Z.; CLEMENTS, K. D.; HICKEY, A. J. R. Temperature sensitivity of cardiac mitochondria in intertidal and subtidal triplefin fishes. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 180, n. 7, p. 979–990, 2010.

HOCHACHKA, P.; SOMERO, G. **Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution**. [s.l: s.n.].

HOCHACHKA, P. W. et al. Metabolic meaning of elevated levels of oxidative enzymes in high altitude adapted animals: An interpretive hypothesis. **Respiration Physiology**, v. 52, n. 3, p. 303–313, 1983.

HOCHACHKA, P. W. Muscle enzymatic composition and metabolic regulation in high altitude adapted natives. **International Journal of Sports Medicine**, v. 13, n. SUPPL. 1, p. 89–91, 1992.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation**. [s.l: s.n.].

HUEY, R. B. et al. Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1664, p. 1939–1948, 2009.

HUEY, R. B. et al. Predicting organismal vulnerability to climate warming: Roles of behaviour, physiology and adaptation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1596, p. 1665–1679, 2012.

IFTIKAR, F. I.; HICKEY, A. J. R. Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

JOHNSTON, I. A.; TEMPLE, G. K. Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 15, p. 2305–2322, 2002.

KAEFER, Í. L.; BOELTER, R. A.; CECHIN, S. Z. Reproductive biology of the invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in southern Brazil. **Annales Zoologici Fennici**, v. 44, n. 6, p. 435–444, 2007.

KARASOV, W. H. et al. Anatomical and histological changes in the alimentary tract of migrating blackcaps (*Sylvia atricapilla*): A comparison among fed, fasted, food-restricted, and refed birds. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, n. 1, p. 149–160, 2004.

KAYES, S. M.; CRAMP, R. L.; FRANKLIN, C. E. Metabolic depression during aestivation in *Cyclorana alboguttata*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 154, n. 4, p. 557–563, 2009.

KEEN, A. N.; GAMPERL, A. K. Blood oxygenation and cardiorespiratory function in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenged with an acute temperature increase and zatebradine-induced bradycardia. **Journal of Thermal Biology**, v. 37, n. 3, p. 201–210, 2012.

KERN, P.; CRAMP, R. L.; FRANKLIN, C. E. Physiological responses of ectotherms to daily temperature variation. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 19, p. 3068–3076, 2015.

KINGSOLVER, J. G.; RAGLAND, G. J.; DIAMOND, S. E. Evolution in a constant environment: thermal fluctuations and thermal sensitivity of laboratory and field populations of *Manduca sexta*. **Evolution**, v. 63, n. 2, p. 537–541, 2009.

KISS, A. C. I. et al. Seasonal metabolic changes in a year-round reproductively active subtropical tree-frog (*Hypsiboas prasinus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 152, n. 2, p. 182–188, 2009.

KONARZEWSKI, M.; STARCK, J. M. Effects of food shortage and oversupply on energy utilization, histology, and function of the gut in nestling song thrushes (*Turdus philomelos*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 4, p. 416–427, 2000.

KRAUS-FRIEDMAN, N. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 755–783, 1988.

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n. 1, p. 225–257, 2005.

LAND, S. C.; BUCK, L. T.; HOCHACHKA, P. W. Response of protein synthesis to anoxia and recovery in anoxia-tolerant hepatocytes. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 265, n. 1 34-1, p. 41–48, 1993.

LANGE, B. B.; HANKE, W. Corticosteroid Receptors in Liver Cytosol of the Clawed Toad , *Xenopus laevis* : Daily and Seasonal Variations. **General and Comparative endocrinology**, v. 152, n. 71, p. 141–152, 1988.

LERMEN, C. L. et al. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 239, n. 1–4, p. 497–507, 2004.

LIMA, S. L.; CASALI, A. P.; AGOSTINHO, C. A. Desempenho zootécnico e percentual de consumo de alimento de rã-touro (*Rana catesbeiana*) na fase de recria (pós-metamorfose) do sistema anfigranja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 505–511, 2003.

LIU, B. et al. Fish & Shellfish Immunology The effect of hyperthermia on liver histology , oxidative stress and disease resistance of the Wuchang bream , *Megalobrama amblycephala*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 52, p. 317–324, 2016.

LIU, Z. P. et al. Effects of both cold and heat stress on the liver of the giant spiny frog (*Quasipaa spinosa*): Stress response and histological changes. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 21, 2018.

MCWHINNIE, R. B.; SCKRABULIS, J. P.; RAFFEL, T. R. Temperature and mass scaling affect cutaneous and pulmonary respiratory performance in a diving frog. **Integrative Zoology**, v. 16, n. 5, p. 712–728, 2021.

MENDIOLA, P.; MOLINA, R.; DE COSTA, J. Comparative study in glycolytic capacity in anuran amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, v. 98, n. 2–3, p. 209–213, 1991.

MERKLE, S.; HANKE, W. Long-term starvation in *Xenopus laevis* daudin-II. Effects on several organs. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 90, n. 3, p. 491–495, 1988.

MICHAELSEN, J.; FAGO, A.; BUNDGAASRD, A. High temperature impairs mitochondrial function in rainbow trout cardiac mitochondria. **The Company of Biologists**, v. 224, 2021.

MIZELL, S. Seasonal changes in energy reserves in the common frog, *Rana pipiens*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 66, n. 2, p. 251–258, 1965.

MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare**. [s.l: s.n.].

MOBERLY, W. R. The metabolic responses of the common iguana, *Iguana iguana*, to activity under restraint. **Comparative Biochemistry And Physiology**, v. 27, n. 1, p. 1–20, 1968.

MOMMAERTS, W. F. H. M.; VEGH, K.; HOMSHER, E. Activation of Phosphorylase in Frog Muscle as Determined by Contractile Activity. **The Journal of General Physiology**, v. 66, p. 657–669, 1975.

MOON, T. W.; JOHNSTON, I. A. Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 136, n. 1, p. 31–38, 1980.

MORASH, A. J. et al. The importance of incorporating natural thermal variation when evaluating physiological performance in wild species. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 14, 2018.

MOYES, C. D.; HOOD, D. A. Origins and Consequences of Mitochondrial Variation in Vertebrate Muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p. 177–201, 2003.

NARAYAN, E. J. et al. Non-invasive Methods for Measuring and Monitoring Stress Physiology in Imperiled Amphibians. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 1–10, 2019.

NARAYAN, E. J.; HERO, J. M. Repeated thermal stressor causes chronic elevation of baseline corticosterone and suppresses the physiological endocrine sensitivity to acute stressor in the cane toad (*Rhinella marina*). **Journal of Thermal Biology**, v. 41, n. 1, p. 72–76, 2014.

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 - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, n. 3, p. 344–362, 2008.

NAYA, D. E. et al. Seasonal flexibility in organ size in the Andean lizard *Liolaemus moradoensis*. **Journal of Morphology**, v. 271, n. 12, p. 1440–1445, 2010.

NAYA, D. E.; VELOSO, C.; BOZINOVIC, F. Physiological flexibility in the Andean lizard *Liolaemus bellii*: Seasonal changes in energy acquisition, storage and expenditure. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 178, n. 8, p. 1007–1015, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013.

ØRSTED, M.; JØRGENSEN, L. B.; OVERGAARD, J. Finding the right thermal limit: a framework to reconcile ecological, physiological and methodological aspects of CT_{max} in

ectotherms. **The Journal of Experimental Biology**, v. 225, p. 1–15, 2022.

OVERGAARD, J. et al. Aerobic scope and cardiovascular oxygen transport is not compromised at high temperatures in the toad *Rhinella marina*. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 20, p. 3519–3526, 2012.

PETERSEN, A. M.; GLEESON, T. T. Characterization of circannual patterns of metabolic recovery from activity in *Rana catesbeiana* at 15°C. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 10, p. 1786–1797, 2007.

PIERSMA, T.; LINDSTRÖM, Å. Rapid reversible changes in organ size as a component of adaptive behaviour. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 12, n. 4, p. 134–138, 1997.

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 739–761, 2002.

PÖRTNER, H. O. et al. Trade-offs in thermal adaptation: The need for a molecular to ecological integration. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 2, p. 295–313, 2006.

PÖRTNER, H. O.; BOCK, C.; MARK, F. C. Oxygen- & capacity-limited thermal tolerance: Bridging ecology & physiology. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 15, p. 2685–2696, 2017.

PÖRTNER, H. O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 95–97, 2007.

PUTNAM, R. W.; BENNETT, A. F. Histochemical, enzymatic, and contractile properties of skeletal muscles of three anuran amphibians. **American Physiological Society**, p. 558–567, 1983.

RAYNAL, R. S. et al. Impact of fluctuating developmental temperatures on phenotypic traits in reptiles: a meta-analysis. **Journal of Experimental Biology**, v. 225, 1 mar. 2022.

ROLLINS-SMITH, L. A. Amphibian immunity–stress, disease, and climate change. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 66, p. 111–119, 2017.

ROZEN-RECHELS, D. et al. When water interacts with temperature: Ecological and evolutionary implications of thermo-hydroregulation in terrestrial ectotherms. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 17, p. 10029–10043, 2019.

RUEL, J. J.; AYRES, M. P. Jensen ' s inequality predicts effects of environmental variation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 9, p. 361–366, 1999.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

SCAPIN, S.; DI GIUSEPPE, G. Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the frog *Rana esculenta*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 107, n. 2, p. 189–195, 1994.

SECOR, S. M. Physiological responses to feeding, fasting and estivation for anurans. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 13, p. 2595–2608, 2005.

- SEEBACHER, F.; FRANKLIN, C. E. Physiology of invasion: Cane toads are constrained by thermal effects on physiological mechanisms that support locomotor performance. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 9, p. 1437–1444, 2011.
- SEEBACHER, F.; WHITE, C. R.; FRANKLIN, C. E. Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. **Nature Climate Change**, v. 5, n. 1, p. 61–66, 2015.
- SMITH, B. C. L. The relation between seasonal hyper-glycaemia and thyroid activity in the Frog (*Rana temporaria*). **Journal of Endocrinology**, v. 10, p. 184–191, 1954.
- 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. 4, p. 412–429, 1950.
- SOMERO, G. N. The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 912–920, 2010.
- SOMMER, A.; KLEIN, B.; PÖRTNER, H. O. Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina*. **Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 167, n. 1, p. 25–35, 1997.
- SOPINKA, N. M. et al. Manipulating glucocorticoids in wild animals: Basic and applied perspectives. **Conservation Physiology**, v. 3, p. 1–16, 2015.
- STARCK, J. M. Shaping up: How vertebrates adjust their digestive system to changing environmental conditions. **Animal Biology**, v. 53, n. 3, p. 245–257, 2003.
- STARCK, J. M.; BEESE, K. Structural flexibility of the intestine of burmese python in response to feeding. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, n. 2, p. 325–335, 2001.
- STARCK, J. M.; BEESE, K. Structural flexibility of the small intestine and liver of garter snakes in response to feeding and fasting. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, n. 10, p. 1377–1388, 2002.
- STARCK, J. M.; CRUZ-NETO, A. P.; ABE, A. S. Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 12, p. 2033–2045, 2007.
- STILLMAN, J. H. Acclimation Capacity Underlies Susceptibility to Climate Change. **Science**, v. 301, p. 65, 2003.
- STOREY, K. B. Biochemical adaptation. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2004. p. 383–413.
- STROBEL, A. et al. Mitochondrial Acclimation Capacities to Ocean Warming and Acidification Are Limited in the Antarctic Nototheniid Fish, *Notothenia rossii* and *Lepidonotothen squamifrons*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–11, 2013.
- SUAREZ, R. K.; BROWN, G. S.; HOCHACHKA, P. W. Metabolic sources of energy for hummingbird flight. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 251, n. 3, p. R537–R542, 1986.
- SUNDAY, J. M.; BATES, A. E.; DULVY, N. K. Thermal tolerance and the global redistribution of animals. **Nature Climate Change**, v. 2, n. 9, p. 686–690, 2012.

- TAIGEN, T. L.; EMERSON, S. B.; POUGH, F. H. Ecological correlates of anuran exercise physiology. **Oecologia**, v. 52, p. 49–56, 1982.
- TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous Adaptations To Water Amphibians Balance. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 105A, n. 4, p. 593–608, 1993.
- TRACY, C. R.; DIAMOND, J. Regulation of gut function varies with life-history traits in chuckwallas (*Sauromalus obesus*: Iguanidae). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 78, n. 4, p. 469–481, 2005.
- UCHIYAMA, M.; KONNO, N. Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. **General and Comparative Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 54–61, 2006.
- VOLKOFF, H.; RØNNESTAD, I. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. **Temperature**, v. 7, n. 4, p. 307–320, 2020.
- VORNANEN, M.; STECYK, J. A. W.; NILSSON, G. E. Chapter 9 The Anoxia-Tolerant Crucian Carp (*Carassius Carassius* L.). **Fish Physiology**, v. 27, n. C, p. 397–441, 2009.
- WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. suppl. 1, p. 11466–11473, 2008.
- WALSBERG, G. E.; LEA, M. S.; HILLMAN, S. S. Individual variation in maximum aerobic capacity: Cardiovascular and enzymatic correlates in *Rana catesbeiana*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 239, p. 1–5, 1986.
- WANG, T.; OVERGAARD, J. The heartbreak of adapting to global warming. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 49–50, 2007.
- WILLIAMS, C. M. et al. Thermal variability increases the impact of autumnal warming and drives metabolic depression in an overwintering butterfly. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.
- WILSON, R. S.; FRANKLIN, C. E. Testing the beneficial acclimation hypothesis. **Ecology & Evolution**, v. 17, n. 2, p. 66–70, 2002.
- WINDISCH, H. S. et al. Thermal acclimation in antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 5, 2011.
- WINDISCH, H. S. et al. Stress response or beneficial temperature acclimation: Transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*). **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3469–3482, 2014.
- WINWOOD-SMITH, H. S. et al. Does greater thermal plasticity facilitate range expansion of an invasive terrestrial anuran into higher latitudes? **Conservation Physiology**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2015.
- 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.
- XU, K. et al. Cell loss by apoptosis is involved in the intestinal degeneration that occurs during aestivation in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 216, n. November 2017, p. 25–31, 2018.

YANG, Y.; CAO, Z. D.; FU, S. J. Variations in temperature acclimation effects on glycogen storage, hypoxia tolerance and swimming performance with seasonal acclimatization in juvenile Chinese crucian carp. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 185, p. 16–23, 2015.

ZALDÚA, N.; NAYA, D. E. Digestive flexibility during fasting in fish: A review. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 169, p. 7–14, 2014.

ANEXO

Anexo 1 - Velocidade enzimática máxima ($\mu\text{mol}\cdot\text{g tecido}^{-1}$) das enzimas PK, LDH, GP_{total} e fração ativa de (%GPa), CS e HOAD de músculo esquelético (tríceps femoral), músculo cardíaco (ventrículo cardíaco) e fígado de *L. catenbeianus* submetida a diferentes tratamentos térmicos em ensaio de 23 °C e 30 °C para os músculos ou apenas à 23 °C para o fígado.

		Regime térmico				
		T23	T30	T25-30	F ou H	P
Músculo esquelético (tríceps femoral)						
PK	23 °C	252 ± 46 (6)	317 ± 48 (6)	280 ± 35 (7)	$F_{2,16} = 3,449$	0,057
	30 °C	335 ± 63 ^a (6)	436 ± 68 ^b (6)	428 ± 69 ^{ab} (7)	$F_{2,16} = 4,239$	0,033
	Q ₁₀	1,5 ± 0,3 (6)	1,6 ± 0,3 (6)	1,9 ± 0,4 (7)	$F_{2,16} = 1,854$	0,189
LDH	23 °C	169 ± 26 ^a (6)	204 ± 25 ^b (6)	173 ± 14 ^{ab} (6)	$F_{2,15} = 4,697$	0,026
	30 °C	303 ± 54 (6)	344 ± 39 (6)	321 ± 29 (6)	$F_{2,15} = 1,419$	0,273
	Q ₁₀	2,3 ± 0,4 (6)	2,11 ± 0,1 (6)	2,5 ± 0,4 (6)	$F_{2,15} = 1,851$	0,192
GP_{total}	23 °C	3,6 ± 0,6 (6)	4,1 ± 1,1 (7)	3,9 ± 0,6 (7)	$F_{2,17} = 0,474$	0,630
	30 °C	4,4 ± 0,7 (6)	4,6 ± 0,8 (7)	4,5 ± 0,7 (7)	$F_{2,17} = 0,126$	0,882
	Q ₁₀	1,8 ± 0,3 (6)	1,7 ± 0,3 (7)	1,7 ± 0,2 (7)	$F_{2,17} = 0,362$	0,701
Ventrículo cardíaco						
PK	23 °C	97,3 ± 18,3 (6)	90,2 ± 7,8 (7)	102,3 ± 10,6 (7)	$F_{2,17} = 1,599$	0,231
	30 °C	142,4 ± 28,2 (6)	139,1 ± 12,4 (7)	148,2 ± 11,3 (7)	$F_{2,17} = 0,443$	0,649
	Q ₁₀	1,72 ± 0,12 (6)	1,87 ± 0,20 (7)	1,72 ± 0,23 (7)	$F_{2,17} = 1,330$	0,293
LDH	23 °C	86,6 ± 15,8 (6)	78,7 ± 15,7 (7)	84,9 ± 6,6 (7)	$F_{2,17} = 0,547$	0,588
	30 °C	117,9 ± 21 (6)	107,6 ± 24,5 (7)	133,0 ± 19,5 (7)	$F_{2,17} = 2,391$	0,122
	Q ₁₀	1,6 ± 0,37 (6)	1,6 ± 0,42 (7)	1,9 ± 0,40 (7)	$F_{2,17} = 1,390$	0,276
CS	23 °C	16,3 ± 1,6 ^a (6)	13,5 ± 1,0 ^b (7)	15,0 ± 2,6 ^{ab} (7)	$H_2 = 6,821$	0,026
	30 °C	22,0 ± 1,4 ^a (6)	18,7 ± 1,0 ^b (7)	22,0 ± 3,7 ^{ab} (7)	$H_2 = 7,555$	0,016
	Q ₁₀	1,56 ± 0,21 (6)	1,61 ± 0,14 (7)	1,69 ± 0,16 (7)	$F_{2,17} = 0,934$	0,402

(continua)

Anexo 1 - Velocidade enzimática máxima ($\mu\text{mol}\cdot\text{g tecido}^{-1}$) das enzimas PK, LDH, GP_{total} e fração ativa de (%GPa), CS e HOAD de músculo esquelético (tríceps femoral), músculo cardíaco (ventrículo cardíaco) e fígado de *L. catesbeianus* submetida a diferentes tratamentos térmicos em ensaio de 23 °C e 30 °C para os músculos ou apenas à 23 °C para o fígado.

(conclusão)

		Regime térmico			F ou H	P
		T23	T30	T25-30		
Fígado						
PK	23 °C	23,2 ± 3,7 ^a (6)	16,4 ± 3,8 ^b (6)	18,7 ± 3,5 ^{ab} (7)	$F_{2,16} = 5,310$	0,017
LDH	23 °C	40,1 ± 5,3 (6)	43,5 ± 5,0 (7)	41,6 ± 8,4 (7)	$F_{2,17} = 0,459$	0,640
CS	23 °C	1,8 ± 0,5 (5) ^a	1,2 ± 0,2 (7) ^b	1,14 ± 0,2 (6) ^b	$F_{2,16} = 7,247$	0,004
HOAD	23 °C	26,3 ± 6,7 (6)	21,6 ± 2,9 (7)	24,1 ± 6,4 (7)	$H_2 = 1,735$	0,437
GP_{total}	23 °C	1,6 ± 0,4 (6)	1,4 ± 0,3 (7)	1,4 ± 0,2 (7)	$F_{2,17} = 0,646$	0,537
%GPa	23 °C	73 ± 8 ^a (6)	61 ± 5 ^b (7)	62 ± 10 ^{ab} (7)	$F_{2,17} = 4,265$	0,031

Os valores representam a média e o desvio padrão. P refere-se aos testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis entre os diferentes tratamentos térmicos. ^a e ^b representam grupos significativamente diferentes ($P < 0,05$).