

Interferência sazonal no metabolismo da *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 (Anura, Ranidae)

Carlos Alberto da Silva¹
Wilton M.S.Nunes²
Clarissa Sanches da Silva³

SEASONAL INTERFERENCE IN *Rana catesbeiana* SHAW, 1802 (ANURA, RANIDAE) METABOLISM

ABSTRACT: There are a few experimental data concerning the seasonal variations of metabolism in Amphibian. Less attention was given to natural environmental conditions and aspects of metabolism of *Rana catesbeiana* Shaw, 1802 (Anura, Ranidae). The propose of this study was evaluated interference the metabolism of *R. catesbeiana* in different seasons. Liver and muscle showed a big glycogen reserves in summer and autumn and a little in winter and spring. We observed that plasmatic insulin concentration is bigger in summer and spring and decrease in autumn and winter. When compared with the other season plasmatic glycaemia only differ in spring. The analysis of plasmatic lipids showed a big F.F.A concentration in winter and spring and a hard decrease in summer, now, plasmatic concentration of triglycerides showed an inverse standard. In an attempt to contribute to understanding the metabolism of amphibian we suggest that a rhythmic fluctuations in seasons directly influence in metabolic standard of *R. catesbeiana*.

Key words: *Rana catesbeiana*, cronobiology, metabolism.

¹ Faculdade de Ciências Matemáticas e da Natureza
Universidade Metodista de Piracicaba, cvsilva@bestway.com.br

² Departamento de Fisiologia e Biofísica -I.B.- UNICAMP,
wmsnunes@terra.com.br

³ Acadêmica de Biologia da Universidade Metodista de Piracicaba

INTRODUÇÃO

Os organismos harmonizam suas funções vitais com o ambiente, ajustando-as constantemente de acordo com diferentes parâmetros cronobiológicos e ambientais, como alternâncias no ciclo de luz, variações de estações do ano, variações na temperatura ambiente e na pressão atmosférica (MARQUES & MENNA-BARRETO, 1997).

Nos diferentes nichos ecológicos os organismos constantemente se adaptam às variações da disponibilidade de substratos energéticos. SCAPIN & DI GIUSEPPE (1994) verificaram que *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758) apresentava variações sazonais na glicemia e na mobilização dos depósitos de tecido adiposo, sugerindo que a temperatura ambiente influenciava na regulação das vias metabólicas.

FARRAR & FRYE (1977) demonstraram que os anfíbios possuem reservas de substratos energéticos maiores que as observadas nos mamíferos e constataram nítidas modificações bioquímicas e morfológicas do parênquima hepático nas diferentes estações do ano. Neste sentido, tem sido consenso que a mobilização dos substratos energéticos tem relações com as variações de cada estação (FENOGLIO *et al.*, 1992).

O controle da glicemia nos anuros, assim como nos mamíferos, tem a participação do sistema endócrino (PACKARD & RANDAL, 1976). Estudos "*in vitro*" do metabolismo de carboidratos em hepatócitos isolados de rã revelaram que estes são sensíveis à insulina e aos hormônios glicogenolíticos, semelhante ao observado nos hepatócitos de mamíferos. Neste sentido, observa-se aumento nas reservas hepáticas de glicogênio concomitante à elevação da insulinemia e depleção desta na presença dos hormônios glicogenolíticos (JANSSENS *et al.*, 1983; JANSSEN & GRIGG, 1987; JANSSEN & MAHER, 1986). Concomitante à variação na concentração plasmática dos principais hormônios, também já se observaram variações sazonais nas concentrações plasmáticas de aminoácidos, proteínas e triacilgliceróis (SCHLAGHECKE & BLUM, 1978 a; b).

SCHALAGHECKE & BLUM (1981) estudaram o metabolismo da *Rana esculenta* (Linnaeus, 1758) e verificaram elevadas concentrações plasmáticas de insulina no verão

concomitante com a maturação final das gônadas, as quais atingiram 30% do peso do animal, sugerindo que a insulina é um hormônio importante para esta maturação.

Recentes estudos avaliaram a sazonalidade da atividade das enzimas glicogênio fosforilase e glicogênio sintetase, no fígado da rã verde (*R. esculenta*) e constataram que a fosforilase é mais ativa durante o inverno enquanto a sintetase é mais ativa no verão, sugerindo a influência sazonal na atividade destas enzimas. Apesar da pouca informação a respeito das enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio em anfíbios, assume-se que ocorre de maneira similar aos outros vertebrados e que por sua vez possa ter influência da sazonalidade (SCAPIN & GIUSEPPE, 1993, 1994).

De forma geral, é consenso que os peilotérmicos apresentam alterações metabólicas em função de fatores que caracterizam as estações climáticas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros fisiológicos da *R. catesbeiana* (Rã-Touro) nas diferentes estações do ano, destacando-se os seguintes itens: a) reservatórios de glicogênio do fígado, músculo gastrocnêmio, átrio e ventrículo; b) concentrações plasmáticas de glicose, ácidos graxos livres, triacilgliceróis e insulina.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 32 rãs touro adultas, de ambos os sexos, pesando de 150 a 180g, divididas em quatro grupos experimentais com oito rãs cada. Os experimentos foram realizados sempre na última quinzena de cada estação do ano (primavera, verão, outono e inverno).

Coleta de material e técnicas de análise

As rãs foram decapitadas e o sangue foi coletado com auxílio de tubos heparinizados, sendo prontamente centrifugado e o plasma reservado para avaliação da concentração de ácidos graxos livres, triacilgliceróis, glicose e insulina.

O glicogênio hepático e muscular foi avaliado segundo o método proposto por SIU LO & TAYLOR (1970) e os valores estão expressos em mg/100 mg de tecido úmido.

Para determinar a concentração plasmática de ácidos graxos livres foi utilizada a técnica proposta por REGOUW *et al.* (1971), e para a determinação da concentração glicose e triacilgliceróis, foram utilizados métodos colorimétricos, conforme kit comercial (Celm-Reactoclin). A insulina plasmática foi avaliada segundo a proposta de MALAISSE *et al.* (1970), porque apresenta sensibilidade apropriada para avaliação de quantidades de insulina da ordem de ng/mL.

Análise estatística

Utilizou-se Análise de Variância seguido de teste de Tukey para comparação das médias, sendo fixado como nível crítico $p < 0,05$.

RESULTADOS

As reservas de glicogênio da *R. catesbeiana* foram avaliadas nas diferentes estações do ano, no intuito de verificar se há relações entre as condições ambientais e os padrões metabólicos. A Figura 1 mostra que as concentrações hepáticas de glicogênio foram elevadas em 98.6% ($p < 0,05$) na transição primavera - verão não se modificando com a chegada do outono. Por outro lado, com a chegada do inverno as reservas hepáticas de glicogênio foram depletadas em 73.2% ($p < 0,05$).

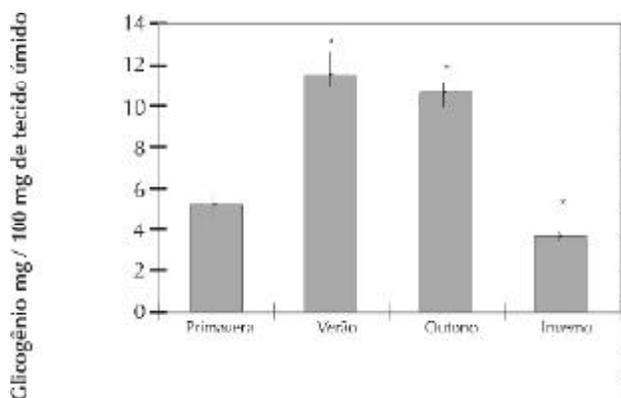


Figura 1. Concentração hepática de glicogênio (mg/100mg) da rã-touro nas diferentes estações climáticas. As colunas representam as médias \pm epm, n=8. * $p < 0,05$

Quanto ao tecido muscular (Figura 2) destacamos que houve acúmulo de glicogênio na primavera e verão, havendo acréscimo de 852.9% no gastrocnêmio; em relação às outras duas estações, 154.3% no átrio e 322.5% no ventrículo ($p < 0,05$). Cabe ressaltar que de maneira contrária ao observado no fígado, no outono as reservas musculares de glicogênio apresentaram uma elevação adicional atingindo 28% no gastrocnêmio, 124% no átrio e 118% no ventrículo ($p < 0,05$). Um fato merecedor de destaque é a chegada do inverno que induziu uma significativa depleção das reservas musculares atingindo 94% no gastrocnêmio, 96% no átrio e 92% no ventrículo ($p < 0,05$).

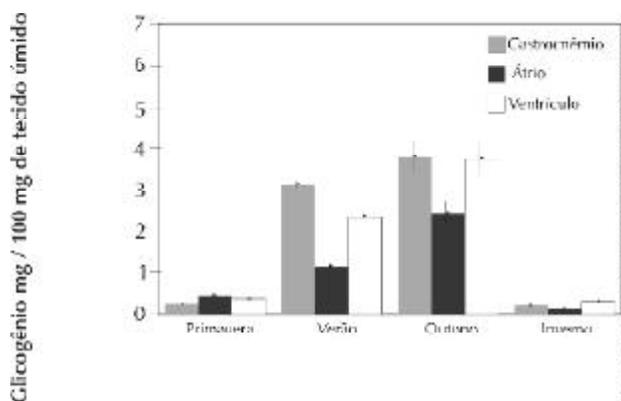


Figura 2. Concentração muscular de glicogênio (mg/100mg de tecido úmido) da rã-touro nas diferentes estações climáticas. As colunas representam as médias \pm epm, n=8.

Dentro do perfil endócrino, pode-se observar na Figura 3 que a concentração plasmática de insulina foi significativamente elevada (1042%) com a chegada da primavera. Esta concentração foi elevada adicionalmente em 18% com a chegada do verão. Por outro lado, no outono e inverno, a insulinemia foi reduzida em 53.3%, e 99.8%, respectivamente. Quanto a glicemia, pode-se observar que na primavera os valores foram significativamente maiores do que nas outras estações sugerindo crioproteção durante o período de inverno (Figura 4).

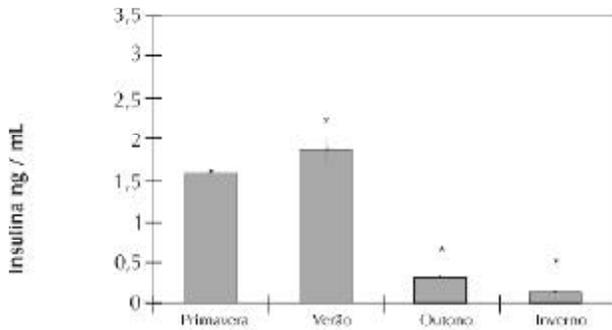


Figura 3. Variação sazonal da concentração plasmática de Insulina (ng/mL) da Rã- touro, n = 8. (*) $p < 0,05$ quando comparado a primavera.

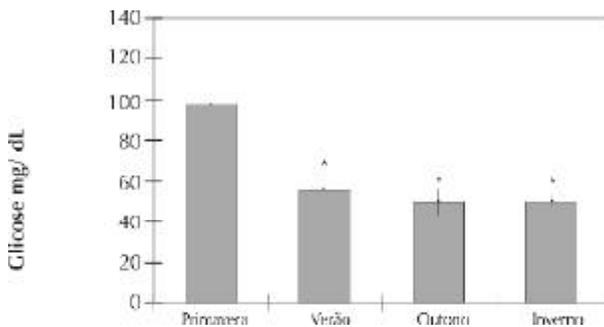


Figura 4. Variação sazonal da concentração plasmática de glicose (mg/dL) da rã – touro, n = 8. (*) $p < 0,05$ quando comparado a primavera.

Com relação a concentração sérica de ácidos graxos livres (Figura 5), pode-se observar que estas foram elevadas na transição verão - outono, atingindo 161% no outono e 325% no inverno ($p < 0.05$), seguindo-se uma redução com a chegada da primavera (51%, $p < 0.05$).

Com relação ao perfil lipídico desenvolvido sazonalmente pode-se verificar na Figura 6 que a concentração plasmática de triacilgliceróis foi significativamente reduzidas em 40% na transição verão – outono e 63% na transição outono – inverno ($p < 0.05$). A concentração plasmática deste substrato foi substancialmente elevada com a chegada da primavera, atingindo valores 78.4% maiores do que nas outras estações.

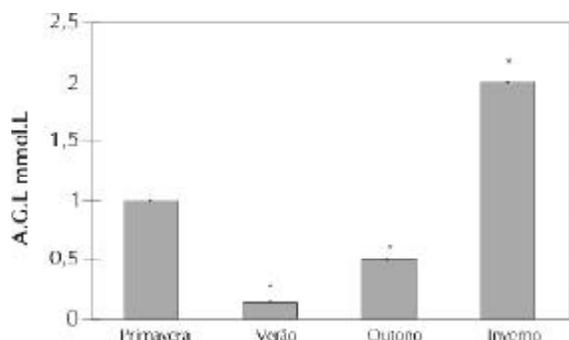


Figura 5. Variação sazonal da concentração plasmática de Ácido Graxo Livre (A.G.L.; mmol/L) de rã – touro, n = 8. * $p < 0,05$ quando comparado a primavera.

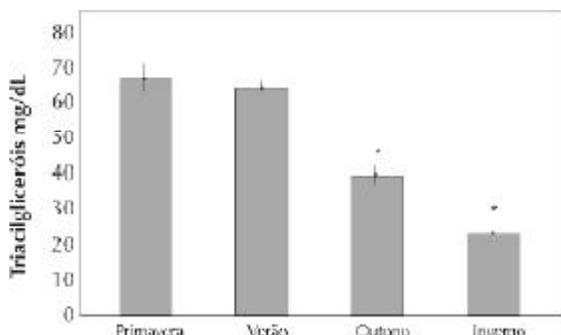


Figura 6. Variação sazonal da concentração plasmática de triacilgliceróis (mg.dL) de rã – touro, n = 8. * $p < 0,05$ quando comparado a primavera.

Informações adicionais relativas às condições ambientais registradas nas diferentes estações do ano estão apresentadas na Tabela 1 onde pode-se observar pequenas variações, como tipicamente observado em países tropicais.

Tabela 1. Índices meteorológicos nas diferentes estações do ano. Valores expressos como média \pm epm, n=2.

Estações	Insolação (H/DIA)	Umidade relativa (%)	Vento médio (Km/h)	Temperatura média (°C)	Dias de chuva
Verão	5.87 \pm 0.6	83.2 \pm 3.0	7.64 \pm 0.7	30.2 \pm 0.5	17 \pm 1
outono	6.52 \pm 0.6	83.0 \pm 0.9	6.62 \pm 0.4	23.2 \pm 0.7 *	9 \pm 2 *
inverno	7.56 \pm 0.5	75.0 \pm 3.5	7.70 \pm 0.3	20.0 \pm 0.8 *	3 \pm 1 *
primavera	7.07 \pm 0.5	73.2 \pm 1.4	9.91 \pm 0.3 *	26.3 \pm 0.6 *	10 \pm 1 *

* P <0,05 se comparado ao verão

DISCUSSÃO

Ao longo dos processos evolutivos, os organismos que melhor se adaptaram foram aqueles que, de diferentes maneiras, conseguiram acompanhar a estrutura rítmica do ambiente (BYRNE & WHITE, 1975; FENOGLIO *et al.*, 1992).

A avaliação das reservas de glicogênio da rã touro (*R. catesbeiana*) realizada na primavera mostrou que as reservas hepáticas e musculares de glicogênio foram elevadas, se comparadas às reservas observadas no inverno (Figuras 1 e 2). Estudos realizados em países que apresentam estações climáticas bem definidas sugeriram que concomitante as mudanças nos padrões climáticos os anuros manifestam respostas adaptativas comportamentais e neuroendócrinas (FENOGLIO *et al.*, 1992). Neste sentido, nossos resultados apontam para a manutenção das respostas metabólicas características de cada estação mesmo frente a pequenas variações climáticas.

No intuito de avaliar se a concentração plasmática de insulina também é influenciada pela flutuação sazonal, avaliamos a insulinemia nas diferentes estações do ano e observamos que na primavera e no verão a secreção de insulina foi elevada possivelmente devido ao aumento na ingestão alimentar (Figura 3). Cabe salientar, que as elevadas concentrações

séricas de insulina, permitem a ativação da glicoquinase hepática e muscular, favorecendo que a síntese de glicogênio nestes tecidos ocorra em maior intensidade nas estações com temperatura elevada (HANKE & NEUMANN, 1972). Este fato caracteriza uma fase de acúmulo de substratos metabólicos concomitante a elevação na temperatura ambiente. Cabe ressaltar, que há um efeito ligado a crioproteção decorrente da manutenção de uma glicemia não diferenciada durante os meses de outono inverno como mostra a figura 3.

Estudos de tolerância ao frio realizados com *R. catesbeiana* demonstraram que a concentração plasmática de lipídios também varia de acordo com a variação na temperatura ambiente (STEINER *et al.*, 2000). Neste sentido, nosso estudo mostra que no verão há redução na concentração plasmática de A.G.L. concomitante a elevação na concentração plasmática de triacilgliceróis apontando para a ativação de respostas endócrinas que atuam auxiliando o organismo na formação de reservas energéticas que permitam suportar o intempérie do inverno (Figuras 5 e 6) (BYRNE & WHITE, 1975). Frente a variação na concentração plasmática de lipídios tem sido sugerido que estes sejam utilizados pelos músculos como fonte de energia formando um sistema poupador de glicose que a direciona preferencialmente para manutenção da homeostasia do sistema nervoso como sugerido por diferentes autores de países cujas estações são bem definidas (PASONEN & KOSKELA, 1974; KING *et al.*, 1995; SCAPIN, 1982).

Na década de 70, foi observado que nos meses quentes os anuros apresentam elevação tanto nas reservas de glicogênio quanto no tecido adiposo, preparando o organismo do animal para suportar o período de hibernação que ocorre durante o inverno (PENHOS & RAMEY, 1973). Já no inverno o metabolismo é reduzido, enquanto a concentração plasmática dos hormônios glicogenolíticos e lipolíticos torna-se elevada, iniciando a depleção dos reservatórios de substratos energéticos visando dar o suporte nutricional imprescindível durante a hibernação.

No outono não observamos diferença nas concentrações hepáticas e musculares de glicogênio quando comparado ao verão (Figuras 1 e 2). Neste sentido, acreditamos que as elevadas reservas musculares de glicogênio tenham relação

com a utilização de outros substratos como fonte energética (SCHLAGHECKE & BLUM, 1978a,b; 1981).

Na Tabela 1, pode-se observar a queda na temperatura ambiente nos meses que precedem o inverno e em decorrência desta variação climática deflagraram-se mudanças no "status" metabólico caracterizadas pela redução na concentrações plasmáticas de insulina e triacilgliceróis ao mesmo tempo que a concentração plasmática de ácidos graxos livres foi elevada. Neste aspecto, nosso estudo corrobora com a hipótese dos ajustes sazonais proposta por JANSSEN *et al.*, 1983.

CONCLUSÃO

Nosso trabalho mostra que o metabolismo da rã-touro foi influenciado pelas variações sazonais e mostra que, apesar da *R. catesbeiana* ser uma espécie tropicalizada, apresenta significativos ajustes metabólicos frente às pequenas variações geoclimáticas. Tais alterações, são expressas pelas modificações no perfil endócrino que sofre influencia direta da temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BYRNE, J.J. & R.J. WHITE. 1975. Cyclic changes in liver and muscle glycogen, tissue lipid, and blood glucose in a naturally occurring population of *Rana catesbeiana*. **Comp. Biochem. Physiol.** **50(A)**: 709-715.
- FARRAR, E.S. & B.E. FRYE. 1977. Seasonal variation in the effects of adrenaline and glucagon in *Rana esculenta*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **33**: 76-81.
- FENOGLIO, C.; G. BERNOCCHI & S. BARNI. 1992. Frog hepatocyte modifications induced by seasonal variations: A morphological and cytochemical study. **Tissue and Cell**, **24(1)**: 17- 29.
- HANKE, W. & U. NEUMANN. 1972. Carbohydrate metabolism in amphibia. **Gen. Comp. Endocrinol.**, suppl.3: 198-208.
- JANSSENS, P.A.; A.G. CAINE & J.E. DIXON. 1983. Hormonal control of glycogenolysis and the mechanism of action of

- adrenaline in amphibian liver in vitro. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **49**: 477- 484.
- JANSSEN, P.A. & J.A. GRIGG. 1987. Hormonal regulations of hepatic glycogenolysis in the toad, *Xenopus laevis*, is mediated by cyclic AMP, and not Ca^{2+} . **Gen. Comp. Endocrinol.**, **67**: 227-233.
- JANSSEN, P.A. & F. MAHER. 1986. Glucagon and insulin regulate in vitro hepatic glycogenolysis in the axolotl *Ambystoma mexicanum* via changes in tissue cyclic AMP concentration. **Gen.Comp. Endocrinol.**, **61**: 64-70.
- KING, P.A; M.N. ROSHOLT, & Y.B. STOREY. 1995. Seazonal changes in plasma membrane glucose transport in freeze tolerant wood frogs. **Can. J. Zool.**, **73**: 1-9.
- MALAISSÉ, W.J.; A.C. BOSCHERO; S. KAWAZU & J.C. HUTTON. 1970. The Stimulus - secretion coupling of glucose-induced insulin release. **J. Lab. Clin. Med.**, **76**: 895-902.
- MARQUES, N & L. MENNA-BARRETO. 1997. **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. Ed. Universidade de São Paulo, 328p.
- PACKARD, G.C. & J.G. RANDALL. 1976. Effect of insulin on carbohydrate metabolism of frog liver in vitro. **Gen.Comp. Endocrinol.**, **28**: 368-370.
- PASONEN, S. & P. KOSKELA. 1974. Seasonal and age variation in the metabolism of common frog, *Rana temporaria* in northern Finland. **Comp. Biochem. Physiol.** **47(A)**: 635- 654.
- PENHOS, J.C. & E. RAMEY. 1973. Studies on the endocrine pancreas of amphibians and reptiles. **Am. Zool.**, **13**: 667-698.
- REGOUW, B.J.M.; P.J.H.C. CORNELISSEN; R.A.P. HELDER; J.B.F. SPIJKERS & Y.M.M. WEEBER. 1971. Specific determination of fatty acid in plasma. **Clin. Chem. Acta**, **31(1)**: 187-195.
- SCAPIN, S. 1982. Seasonal fluctuations of pancreatic activities and cyclic nucleotide levels in the frog *Rana esculenta*. **Comp. Biochem. Physiol.** **71(A)**: 205-209.
- SCAPIN, S. & G. DI GIUSEPPE. 1993. Glycogen phosphorylase activity in the liver of the frog *Rana esculenta*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **105(B)**: 401-402.
- SCAPIN, S. & G. DI GIUSEPPE. 1994. Seasonal variations of

- glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of the frog *Rana esculenta*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **2**: 189-195.
- SCHLAGHECKE, R. & V. BLUM. 1978a. Seasonal variations in liver metabolism of green frog, *Rana esculenta*. **Experientia.**, **34**: 456-457.
- SCHLAGHECKE, R. & V. BLUM. 1978b. Seasonal variations in fat body metabolism of green frog, *Rana esculenta*, **Experientia.**, **34**:1019-1020.
- SCHLAGHECKE, R. & V. BLUM. 1981. Seasonal variation in insulin and glucagon concentrations of *Rana esculenta*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **43**: 479 - 483.
- SIU LO, J.C. & W. TAYLOR. 1970. Determination of glycogen in small tissue sample. **J. Appl. Physiol.**, **28**(2): 234 - 236.
- STEINER, A.A.; S.O. PETENUSCI; L.G. BRENTAGANI & L.G.S. BRANCO. 2000. The importance of glucose for the freezing tolerance/intolerance of the anuran amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. **Rev. Bras. Biol.**, **60**(2): 321 - 328.

Recebido: 27/10/00

Aceito: 25/01/02