

## **Avaliação da influência de fatores associados a alterações climáticas nas fases larvares de rã-verde (*Pelophylax perezi*)**

As alterações climáticas têm um profundo impacto na biota, e os anfíbios estão entre as espécies mais vulneráveis devido às suas características únicas, como a incapacidade de manter uma temperatura corporal estável e a elevada dependência de água. Desta forma, é crucial avaliar a influência que alguns fatores, potencialmente modificados com as alterações climáticas, terão em espécies de anfíbios, nomeadamente nas vulneráveis fases larvares. Com este objetivo, foram expostas larvas de *Pelophylax perezi* a diferentes temperaturas (16, 20, 24, 28°C) e densidades populacionais (10, 20, 40, 80 indivíduos/L), analisando características morfológicas (e.g. tamanho) e biomarcadores de *stress* oxidativo (glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, glutaciona-S-transferase e peroxidação lipídica) para avaliar a influência no estado antioxidante do organismo. Como resultado, observou-se que comparativamente à temperatura mais baixa, a mais elevada potenciou a velocidade de crescimento e o tamanho alcançado na fase de desenvolvimento 25. Adicionalmente, na temperatura mais elevada, os níveis de peroxidação lipídica foram reduzidos comparativamente aos níveis apresentados pelos restantes grupos expostos. Para baixas densidades populacionais, os organismos atingiram maiores comprimentos e apresentaram maior capacidade antioxidante. Os resultados revelaram que parâmetros associados às alterações climáticas podem ter impacto direto no desenvolvimento dos anfíbios e nos mecanismos associados à resposta fisiológica a fatores de *stress* que poderão, em última análise, diminuir o *fitness*.

### **Palavras-chave**

alterações climáticas  
anfíbios  
atividade antioxidante  
fases larvares  
rã-verde

Carlos A Marques<sup>1\*</sup>

Inês Junqueira<sup>1</sup>

Ruth Pereira<sup>2</sup>

Fernando JM Gonçalves<sup>1,3</sup>

Sérgio Marques<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto & GreenUPorto, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

<sup>3</sup> CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

\*carlosamarques@ua.pt



## INTRODUÇÃO

As alterações climáticas têm sido uma crescente preocupação global. Estas englobam uma grande variedade de fatores de *stress* (IPCC, 2014), sendo os mais importantes as mudanças de temperatura (Webb et al., 2008), os níveis elevados de CO<sub>2</sub> atmosférico (IPCC, 2007) e o aumento da frequência e intensidade das secas e das cheias extremas (Barnett et al., 2005; Milly et al., 2005).

Embora os efeitos das alterações climáticas sejam observados a nível mundial, estes não serão distribuídos de igual forma, havendo sistemas a altas latitudes e altitudes que irão experienciar algumas das maiores taxas de aquecimento do planeta (Hassan et al., 2005; Woodward et al., 2010). Considerando a Europa ocidental, há evidências de que o padrão da oscilação do Atlântico Norte (NAO), que controla a força dos ventos ocidentais e influencia a quantidade de calor advectado do oceano Atlântico, está fortemente relacionado com as flutuações da temperatura das correntes no inverno (Elliott, 2000). Adicionalmente, foi demonstrado que a influência da NAO na temperatura da água dos rios chega até à Europa Central (Webb e Nobilis, 2007; Webb et al., 2008) e, uma compilação de 12 modelos climáticos de simulação de padrões regionais de marés projetou uma diminuição de 10 a 30% na disponibilidade sustentável de água na África do Sul, Sul da Europa, Médio Oriente e a parte oeste da América do Norte, até 2050 (Milly et al., 2005). Estas alterações poderão ter consequências consideráveis para os ecossistemas a nível regional (Milly et al., 2005). Adicionalmente, a flutuação da temperatura dos cursos de água de zonas sujeitas a grande urbanização tem vindo a mudar e a destruição da vegetação ripícola é um dos fatores de *stress* antropogénico identificado como responsável por estas mudanças (Krause et al., 2004; Nelson e Palmer, 2007). Um destes casos, consequência do dano contínuo das zonas ripícolas por atividades relacionadas com a agricultura, foi reportado para o rio Toikanbetsu (Japão) no qual foi registado um aumento de 6°C da temperatura máxima da água no verão, num período de 42 anos (Nagasaka e Nakamura, 1999; Milly et al., 2005). Em suma, os ecossistemas ripícolas e estuarinos são especialmente vulneráveis às mudanças de temperatura, pois são relativamente isolados, fisicamente fragmentados e são fortemente explorados pelo Homem (Woodward, 2009).

O aumento da temperatura e os regimes de precipitação irregulares que têm vindo a ser observados (Walther et al., 2002; Ou et al., 2015) são responsáveis pela diminuição das massas de água, o que leva ao aumento rápido da densidade populacional animal nas mesmas. Assim, a alteração dos fatores abióticos em cima descritos são característicos das alterações climáticas, resultando em implicações profundas na distribuição e declínio das espécies, o que tem sido extensivamente revisto em diversos estudos (McCarty, 2001; Bellard et al., 2012).

Entre os vertebrados terrestres, os anfíbios são relativamente vulneráveis aos efeitos das mudanças climáticas, considerando a importância que a humidade e a temperatura têm na sua biologia (Donnelly e Crump, 1998; Iglesias-Carrasco et al., 2017). Os anfíbios são animais ectotérmicos com pele altamente permeável e desprovida de estruturas protetoras (e.g. escamas e penas), ovos desprovidos de casca e ciclos de vida complexos, normalmente com os estádios iniciais de desenvolvimento dependentes de meios aquáticos (Duellman e Trueb, 1994). Adicionalmente, importantes aspetos da biologia de anfíbios, como o crescimento, desenvolvimento, alimentação e *timing* de hibernação e reprodução serão provavelmente

afetados pelas alterações climáticas (Duellman e Trueb, 1994). Outro padrão afetado pelas alterações climáticas é a distribuição de anfíbios, que é diretamente influenciada por padrões de chuva e temperatura (Bickford et al., 2010).

Nas últimas décadas, as populações de anfíbios têm sofrido declínios e extinções (Kiesecker et al., 2001). A perda e fragmentação de habitat por atividades antropogénicas e alterações climáticas estão entre as causas conhecidas para o súbito declínio nas populações de anfíbios (Blaustein et al., 2010; Jaime et al., 2018). Neste contexto, as larvas são especialmente vulneráveis quando comparadas com os adultos, pois são altamente dependentes de massas de água, cuja qualidade pode influenciar o seu *fitness*, essencial para a metamorfose e sobrevivência. Adicionalmente, para a maioria das espécies, as larvas, ao contrário dos adultos, estão confinadas a ecossistemas aquáticos e, por isso, especialmente suscetíveis à temperatura, qualidade da água e alterações na densidade populacional. Esta pode ser resultante das alterações climáticas a nível regional, nomeadamente a mudança dos padrões de chuva que, de acordo com projeções climáticas irá ocorrer no Sul da Europa (IPCC, 2014). Sendo os anfíbios simultaneamente predadores e presas, torna-se plausível assumir a influência das alterações climáticas na disponibilidade de alimento, que, em última instância, perturbarão relações predador-presa e interações competitivas, que podem alterar a estrutura da comunidade (Blaustein et al., 2010).

Apesar da abordagem clássica extensiva na identificação das respostas fenotípicas induzidas pelas alterações climáticas (Blaustein et al., 2001; Walther et al., 2002), escasseiam estudos que avaliem as respostas fisiológicas induzidas por estes fatores de *stress*. É também crucial encontrar ferramentas que permitam avaliar a importância que as alterações da temperatura e da densidade populacional, resultantes das alterações climáticas, têm na fisiologia dos organismos sujeitos a estas situações de *stress*. As sinergias com outros fatores de *stress* podem aumentar os efeitos das alterações climáticas. Por exemplo, o impacto da eutrofização e de toxinas podem ser exacerbados pelas secas durante o verão, traduzido pelo aumento das concentrações destes contaminantes (Woodward et al., 2010).

A atividade do sistema de defesa antioxidante, observada através da determinação da atividade enzimática de enzimas como a catalase, a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase, é uma das ferramentas normalmente usada para avaliar o *stress* ambiental induzido e o seu impacto biológico (Valavanidis et al., 2006). Estas enzimas, como foi descrito por van der Oost et al. (2003), têm funções antioxidantes que permitem ao organismo tolerar níveis basais de espécies reativas de oxigénio (ROS). Os ROS são produzidos naturalmente pelo metabolismo celular, em resposta a fatores ambientais e à exposição a tóxicos naturais e sintéticos (Davies, 2000; Birben et al., 2012). Este aumento pode ser causado por indução direta ou indireta ou pela inibição do sistema de defesa antioxidante (Farombi et al., 2007; Marques et al., 2011). Os ROS podem causar dano oxidativo nas proteínas, DNA e lípidos, podendo levar à apoptose e senescência celular, o que por sua vez pode resultar no desenvolvimento de doenças (Mittler, 2002; Colavitti e Finkel, 2005; Schieber e Chandel, 2014). Elevados níveis de ROS podem afetar processos metabólicos centrais como a glicólise e o metabolismo de aminoácidos e proteínas (Strydom et al., 2006). É, portanto, importante avaliar a atividade das enzimas implicadas no sistema de defesa antioxidante como indicadores de *stress* oxidativo.

Neste estudo, pretendemos avaliar de que forma os fatores abióticos podem influenciar o *fitness* e a defesa antioxidante de estádios larvares de rã verde (*Pelophylax perezi*). Para isso, fatores abióticos relacionados com alterações climáticas (como o aumento de temperatura e aumento da densidade populacional) foram testados para avaliar o seu efeito no crescimento e tamanho das larvas e nos elementos do sistema de defesa antioxidante glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GRed) e glutaciona-S-transferase (GST). A peroxidação lipídica foi também avaliada através da determinação dos níveis de substâncias ativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS).



## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido sob a supervisão de um especialista acreditado para a realização de experiências com animais, seguindo as recomendações da Federação das Associações de Ciência Laboratorial Animal (FELASA), e de acordo com as diretrizes europeias para a proteção de animais usados para fins científicos (diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia).

### Organismo-teste

A rã verde (*Pelophylax perezi*) é um anfíbio predominante na Europa e desempenha um papel essencial nos ecossistemas. As suas larvas são importantes para as cadeias tróficas devido à sua resiliência, sendo, ainda assim, sensíveis às alterações ambientais (e.g. poluição, fatores abióticos). Tendo isto em consideração, bem como a sua abundância, ampla distribuição e estado de conservação pouco preocupante, de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), esta espécie foi escolhida como organismo-teste.

As massas de ovos de *P. perezi* foram recolhidas no estádio 8 de desenvolvimento (Gosner, 1960), num lago localizado no campus da Universidade de Aveiro (40°38'04.4" N; 8°39'30.0" W) e imediatamente transportadas para o laboratório num recipiente de plástico. Os ovos foram individualizados e colocados em meio FETAX (Dawson e Bantle, 1987) até ao início dos ensaios.

O teste de temperatura foi iniciado imediatamente e o teste da densidade populacional iniciou-se quando as larvas atingiram o estádio 20 de Gosner (Gosner, 1960). As larvas submetidas a este último ensaio foram mantidas em meio FETAX com pH (7,6 – 7,9), temperatura ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (16 h<sup>L</sup>:8 h<sup>E</sup>) controlados. O final dos ensaios foi planeado tendo como meta o estádio 25 de Gosner uma vez que, no final deste estádio, as larvas apresentam alimentação autónoma (Gosner, 1960). Ao procedermos desta forma, excluímos a alimentação como um fator externo importante para o desenvolvimento. No final de cada ensaio, o comprimento total das larvas foi registado e os animais foram sacrificados e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior análise bioquímica.

### Ensaio de temperatura

Neste ensaio foram testadas 4 temperaturas: 16, 20, 24 e  $28^\circ\text{C}$ . Foram preparadas quatro réplicas, cada uma contendo 20 ovos no estádio 8 de Gosner, que foram mantidos em frascos de 150 mL, com meio FETAX e com pH (7,6 – 7,9) e fotoperíodo (16 h<sup>L</sup>:8 h<sup>E</sup>).

O meio foi renovado de dois em dois dias até ao final do ensaio e a mortalidade foi registada diariamente. Como os indivíduos dos diferentes grupos não atingiram o estágio 25 de Gosner em simultâneo, a duração destes ensaios variou de acordo com as temperaturas de exposição.

### **Ensaio de densidade populacional**

Para avaliar o efeito das diferentes densidades populacionais nas larvas de *P. perezi*, estas foram divididas em quatro grupos com densidades populacionais de 10, 20, 40 e 80 larvas por litro (D10, D20, D40 e D80, respetivamente). Os animais de cada grupo foram selecionados no estágio 20 de Gosner, e foram mantidos em aquários de 24 × 12 × 15 cm, com 1 L de meio FETAX. Este ensaio foi executado em condições de pH (7,6 – 7,9), temperatura ( $20 \pm 1$  °C) e fotoperíodo (16 h<sup>L</sup>:8 h<sup>E</sup>) controlados. Elevadas densidades populacionais levam a um aumento do consumo de oxigénio. Desta forma foi necessária a instalação de um sistema de arejamento para que o nível de oxigénio dissolvido fosse o mesmo entre os grupos e réplicas. O meio foi renovado de dois em dois dias e a mortalidade registada diariamente.

### **Biomarcadores de stress oxidativo**

O stress oxidativo foi avaliado pela determinação das atividades enzimáticas de GPx, GRed e GST e a extensão do dano LPO foi avaliada através da medição dos níveis de TBARS. Estes parâmetros foram determinados utilizando a biomassa total de um conjunto de 10 organismos por réplica, de cada uma das condições testadas.

As amostras, que tinham sido prévia e individualmente congeladas em azoto líquido, foram homogeneizadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0 com 0,1% TRITON X-100) a 4°C. Os homogeneizados foram centrifugados a 10 000 g por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram divididos em alíquotas, uma para cada determinação, e armazenados a -80°C.

A atividade da GPx foi determinada de acordo com Flohé e Günzler (1984), seguindo a oxidação de NADPH a um comprimento de onda de 340 nm (coeficiente de extinção molar<sup>1</sup> de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), quando a GSSG é reduzida de novo a GSH pela glutathione redutase. A atividade da GPx foi monitorizada usando peróxido de hidrogénio (0,255 mM) e hidroperóxido de cumeno (0,7 mM) como substratos independentes, correspondendo, respetivamente, à avaliação da glutathione peroxidase selénio-dependente e da glutathione peroxidase total.

A atividade da GST foi determinada por espectrofotometria de acordo com Habig et al. (1974). A GST catalisa a conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com glutathione, formando um tioéter (coeficiente de extinção molar de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) que pode ser quantificado por absorvância a 340 nm.

A atividade da GRed foi determinada por espectrofotometria, de acordo com Carlberg e Mannervik (1985). Neste ensaio, a oxidação de NADPH, mediada pela GRed, foi monitorizada a 340 nm (coeficiente de extinção molar de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A extensão de dano de LPO foi medida pela quantificação de TBARS, de acordo com o protocolo descrito por Buege e Aust (1978). Esta metodologia é baseada na reação dos subprodutos de LPO, como o

<sup>1</sup> Coeficiente de extinção molar: capacidade que uma mol de uma substância possui em absorver luz a um determinado comprimento de onda.

malondialdeído (MDA), com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A quantidade de TBARS foi medida por espectrofotometria, como determinação única, a um comprimento de onda de 535 nm (coeficiente de extinção molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de MDA por mg de amostra de proteína.

A determinação da concentração de proteína para cada réplica foi efetuada em triplicado, de acordo com o método espectrofotométrico de Bradford (comprimento de onda = 595 nm) (Bradford, 1976) adaptado para utilização de microplaca.

### Análise estatística

Com o objetivo de avaliar diferenças entre os valores obtidos para o comprimento, para a atividade das enzimas antioxidantes e para níveis de TBARS entre os diferentes tratamentos foram efetuadas análises de variância (ANOVA) de um fator, seguida do teste de Tukey (Zar, 1999). Previamente, todos os dados foram submetidos a um teste de normalidade e homogeneidade de variâncias de forma a preencher os pressupostos estatísticos. Quando esses requisitos não foram preenchidos, foi usado um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi escolhido o nível de significância de 0,05 para rejeitar a hipótese nula.

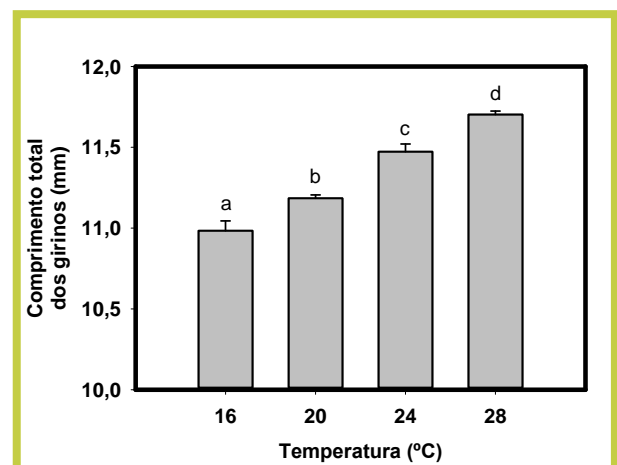
## RESULTADOS

### Ensaio de temperatura

Neste ensaio foi registada uma taxa de mortalidade abaixo dos 10% e não foram detetadas diferenças de morfologia entre os grupos tratados. No entanto, houve um impacto significativo no desenvolvimento das larvas, tendo as larvas expostas à temperatura mais baixa (16°C) demorado 20 dias a atingir o estágio 25 de desenvolvimento, enquanto as larvas expostas à temperatura mais elevada (28°C) atingiram o mesmo estágio em 8 dias. As larvas expostas às temperaturas intermédias, 20°C e 24°C, demoraram 13 e 12 dias, respetivamente, a atingir o estágio 25 de desenvolvimento. Adicionalmente, foram encontradas diferenças significativas ( $F = 58,206$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ) entre grupos expostos a diferentes temperaturas (Figura 1).

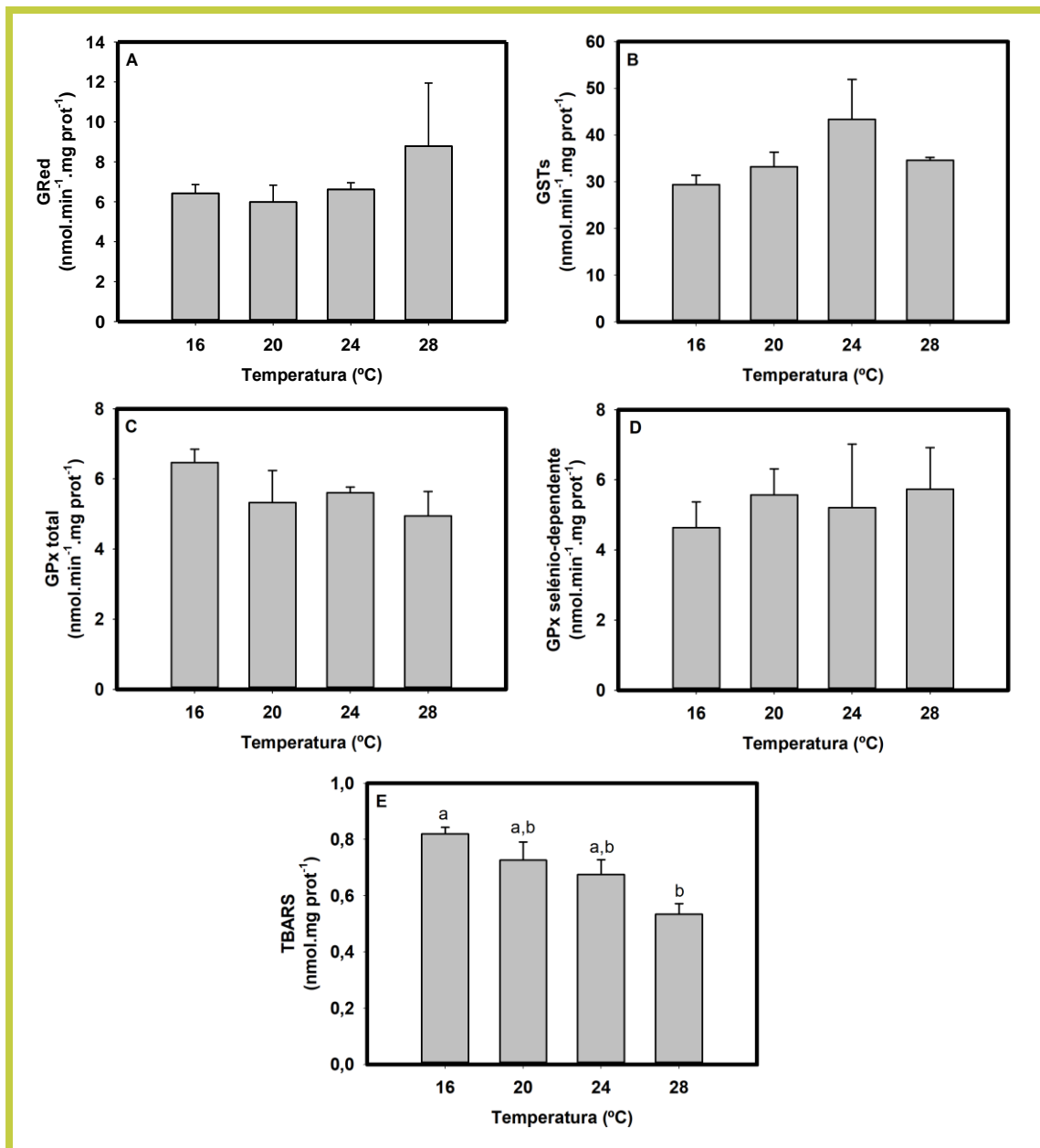
O comprimento corporal dos animais expostos à temperatura de 16°C foi significativamente diferente do comprimento corporal dos animais expostos à temperatura de 28°C. O tamanho máximo atingido durante o período de crescimento dependeu, assim, da temperatura.

Relativamente ao sistema de resposta ao *stress* oxidativo, não foram observadas diferenças significativas nas atividades da GRed, GST, GPx selénio-dependente e GPx total entre os grupos tratados (Figura 2).



**FIGURA 1:** Média do comprimento total dos girinos no final do ensaio de temperatura. “a”, “b”, “c” e “d” representam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos. As barras de erro representam o desvio padrão.

Contudo, a quantificação de LPO apresentou diferenças significativas entre as temperaturas de 16°C e 28°C ( $F = 6,546$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,007$ ), revelando os animais expostos à temperatura de 16°C maiores níveis de LPO comparativamente com os níveis do grupo exposto a 28°C.



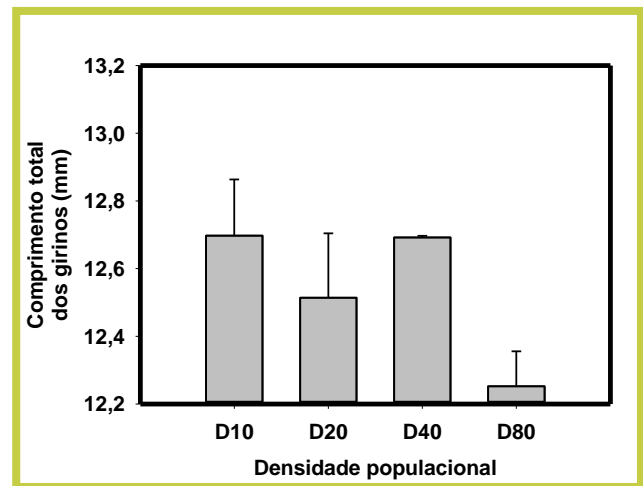
**FIGURA 2:** Valores médios de atividade de Gred (A), de GST (B), de GPx total (C), de GPx selénio-dependente (D) e de TBARS (E) em girinos de *P. perezi* a temperaturas de 16°C, 20°C, 24°C e 28°C. As barras de erro representam o erro padrão. “a” e “b” representam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre diferentes grupos.

### Ensaio de densidade populacional

O ensaio com diferentes densidades populacionais iniciou-se após a eclosão dos ovos (estádio 20) uma vez que antes deste estágio não existe movimentação e a competição por espaço só existirá fora do ovo. Todas as larvas atingiram o estágio 25 de desenvolvimento 9 dias após o início deste ensaio.

Os indivíduos que atingiram maiores comprimentos corporais foram encontrados nos grupos D10 e D40 (Figura 3). Contrariamente, os indivíduos do grupo sujeito à maior densidade populacional (D80) apresentaram os menores comprimentos corporais do teste. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre grupos, a densidade populacional parece influenciar o tamanho das larvas (Figura 3).

Ao nível da atividade antioxidante, não se verificaram diferenças significativas para nenhuma das enzimas GRed, GST, GPx selênio-dependente e GPx total (Figura 4). A análise de TBARS também não revelou diferenças significativas entre os grupos tratados (Figura 4). No entanto, há uma clara tendência para uma maior atividade antioxidante e menores níveis de LPO em indivíduos de grupos submetidos a menores densidades populacionais.



**FIGURA 3:** Média do comprimento total dos girinos no final do ensaio de densidade populacional. As barras de erro representam o desvio padrão.

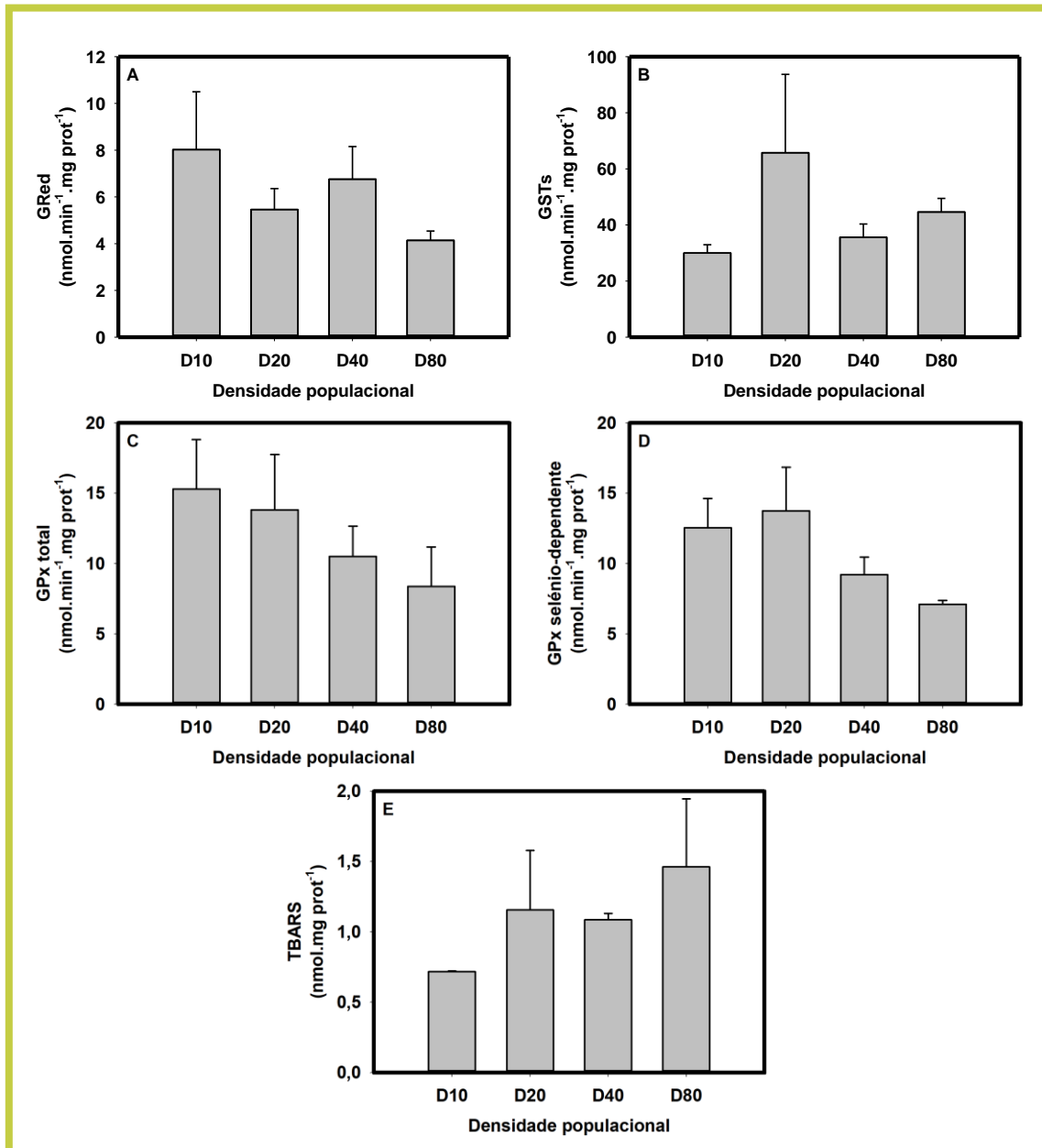
## DISCUSSÃO

As populações de anfíbios têm vindo a decrescer, com algumas das espécies a enfrentar extinção nas últimas décadas (Blaustein et al., 2010). Muita informação tem sido reunida, relacionando o declínio das populações de anfíbios com as alterações climáticas (Kiesecker et al., 2001; Blaustein et al., 2010). No entanto, até à data, não foi conduzido nenhum estudo que avalie a resposta fenotípica e fisiológica da rã-verde ao eventual *stress* causado pelas alterações climáticas. Adicionalmente, os ensaios específicos realizados neste estudo são pela primeira vez propostos e usados como ferramentas para avaliação de *stress* causado por fatores relacionados com alterações climáticas.

As alterações climáticas provocam mudanças nos padrões típicos de variação de temperatura sendo, por isso, um dos mais diretos fatores de *stress* em animais ectotérmicos, como o caso das rãs. Aliado a este parâmetro, a densidade populacional pode ser diretamente influenciada pela seca que é indissociável dos níveis de precipitação (Parris e Semlitsch, 1998; Gervasi e Foufopoulos, 2008).

O crescimento das larvas está, de facto, relacionado com a temperatura, considerando intervalos específicos para cada espécie (Smith-Gill e Berven, 1979; Harkey e Semlitsch, 1988). Ainda assim, tem sido descrito que as temperaturas baixas atrasam mais a diferenciação do que o crescimento, aumentando a duração de cada estágio e o tamanho estágio-específico (Smith-Gill e Berven, 1979). No entanto, estas observações foram feitas em animais perto de completar a metamorfose, ou até mesmo já metamorfozados, enquanto o presente estudo usou apenas animais até ao estágio 25. Neste caso, durante as primeiras fases do desenvolvimento, sem ingestão de alimento, as larvas beneficiam de temperaturas mais altas, apresentando maiores comprimentos no estágio 25, que podem, em última instância, resultar numa melhoria da sua adaptação ou *fitness* (Crespi e Warne, 2013).





**FIGURA 4:** Valores médios da atividade de Gred (A), de GST (B), de GPx total (C), de GPx selênio-dependente (D) e de TBARS (E) em girinos de *P. perezi* a densidades populacionais de 10, 20, 40 e 80 girinos.L<sup>-1</sup>. As barras de erro representam erro padrão.

No que diz respeito às enzimas do sistema de defesa antioxidante, embora não tenham sido observadas diferenças significativas, os animais maiores (expostos a temperaturas mais elevadas) apresentaram menores níveis de LPO comparativamente aos animais mais pequenos (expostos a temperaturas mais baixas). Adicionalmente, as atividades enzimáticas apresentam, geralmente, o mesmo padrão: larvas expostas a temperaturas mais elevadas apresentam níveis de atividades enzimáticas mais elevados comparativamente às larvas dos grupos expostos a temperaturas mais baixas. A única exceção a esta tendência foi registada para GPx total, onde se registou o comportamento oposto.

Foram realizados alguns estudos sobre as respostas dos mecanismos antioxidantes ao *stress* térmico (Pérez-Campo et al., 1990; Bagnyukova et al., 2003). No entanto, os resultados destes estudos não apontam para uma conclusão consensual, uma vez que diferentes espécies apresentam diferentes respostas ao *stress* térmico.

Considerando que os níveis de ROS gerados estão relacionados com o consumo de oxigénio e, concomitantemente, com uma maior taxa metabólica, pode ser esperado que a intensificação da respiração a temperaturas mais elevadas possa resultar numa maior produção de ROS (Bagnyukova et al., 2003). O facto destes estudos terem sido conduzidos em animais adultos ao invés de larvas, pode ser a razão por detrás destas diferenças. Por outro lado, tomando em consideração o acima mencionado sobre o presumível aumento da produção de ROS a temperaturas mais elevadas, poderia ser expectável uma diminuição do risco de *stress* oxidativo a temperaturas mais baixas e tal não se verifica, pelo menos no caso dos peixes (Malek et al., 2004). Adicionalmente, as variações de temperatura podem resultar em alterações das atividades enzimáticas, o que aumenta a complexidade da resposta a este estímulo (Lushchak e Bagnyukova, 2006).

Assim, à luz do padrão observado neste estudo, parece plausível assumir que temperaturas mais baixas podem influenciar negativamente o desenvolvimento e o crescimento. Consequentemente, este facto pode ter influência no *fitness* dos indivíduos desta espécie, considerando que o crescimento tem influência direta na competição, isto é, animais maiores têm vantagem competitiva comparativamente aos mais pequenos, uma vez que apresentam maior capacidade para escapar aos predadores (Tracy et al., 1993; Semlitsch et al., 1999).

Os anfíbios estão entre as espécies mais sensíveis à modificação de habitats (Justin et al., 2018). Ainda assim, os girinos têm capacidade de resposta e adaptação a mudanças repentinas de densidade populacional. Estes podem, por exemplo, evitar a morte quando um lago ou charco seca acelerando a metamorfose (Richter-Boix et al., 2004). Altas densidades populacionais podem ser interpretadas pelas larvas como uma ameaça e isso pode acelerar a metamorfose, levando assim a que os animais atinjam este estágio com tamanhos mais reduzidos (Richter-Boix et al., 2004). Este é um exemplo clássico da capacidade de adaptação e plasticidade em organismos com um ciclo de vida complexo (Newman, 1992; Gotthard e Nylin, 1995). A capacidade de adaptação e plasticidade reconhecidas nos girinos não foram visíveis no presente estudo e isso deve-se provavelmente à curta duração do ensaio uma vez que estes animais apenas demoraram 9 dias a atingir o estágio 25. Não foram observadas diferenças significativas na morfologia e crescimento das larvas expostas às diferentes densidades populacionais testadas. Contrariamente, outros estudos sugerem uma tendência para girinos, mantidos a baixas densidades populacionais, aumentarem o comprimento das suas caudas e os sujeitos a baixos volumes de água para aumentarem o tamanho e músculo das suas caudas (Kehr et al., 2014).

No entanto, no presente estudo verificou-se uma tendência para animais expostos a densidades populacionais mais baixas atingirem maiores tamanhos, quando comparados com animais expostos a altas densidades populacionais. Estas mudanças nas densidades populacionais podem ser introduzidas pela seca de lagoas, poças ou charcos e/ou pela introdução de outras espécies competitivas, levando a uma potencial competição intra e interespecífica (Parris e Semlitsch, 1998; Smith, 2006). De facto, a seca de

pequenos lagos e poças está identificada como a maior causa de mortalidade larvar em ambientes aquáticos temporários ou permanentes (Álvarez e Nicieza, 2002).

Na vasta maioria dos casos, a perda de água nos lagos está relacionada com a temperatura (Newman, 1989; Tejedo e Reques, 1994). Adicionalmente, a perda de água nos lagos aumenta a variação termal diária (Wilbur, 1990). Existe um compromisso entre hidro-períodos estáveis e predação quando os anfíbios escolhem um lago para se reproduzirem. Por um lado, lagos estáveis providenciam a quantidade de água necessária para o desenvolvimento larvar até à metamorfose mas apresentam altos níveis de predação (Roth e Jackson, 1987). Por outro, lagos temporários apresentam menores níveis de predação, mas podem secar antes de as larvas atingirem a metamorfose (Roth e Jackson, 1987). Estes fatores encontram-se sempre associados, influenciando os padrões de desenvolvimento e crescimento.

Assume-se que densidades populacionais mais altas podem ter uma forte influência em larvas a partir do estágio 25 até à metamorfose, dado o aumento da competição pela procura de alimento. Em especial, em comunidades de larvas de anfíbios anuros, uma alta densidade populacional aumenta a competição resultando em animais com tamanhos mais reduzidos na metamorfose (Brockelman, 1969; Maciel e Juncá, 2009). Adicionalmente, a disponibilidade de alimento tem um impacto direto no estado oxidativo dos animais, uma vez que a sua dinâmica alimentar sofre alterações com a competição (Beaulieu e Costantini, 2014). No entanto, esta explicação não pode corroborar os resultados do presente estudo, considerando que estes ilustram a resposta a este fator de *stress* antes de as larvas atingirem a transição para a fase em que se alimentam livremente.

Crump (1981) sugeriu uma interpretação alternativa para este problema considerando que, sob condições de grande densidade populacional, os indivíduos provavelmente gastam mais energia a evitar o choque e o *stress* associado, levando a um crescimento mais reduzido e a uma menor massa corporal. Uma alta densidade populacional pode, de facto, induzir *stress* nas comunidades submetidas a este fator, e isto pode também ser refletido nos parâmetros fisiológicos e metabólicos, tal como os resultados de LPO parecem indicar. Adicionalmente, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos de larvas, era esperado que esta condição fosse ameaçadora para *P. perezi* uma vez que é conhecida pela sua alta dependência de água (Marques, 2011).

Finalmente, uma vez que as consequências das alterações climáticas a nível global são evidentes, é urgente avaliar a sua influência nos organismos ao nível individual e populacional. Neste estudo pretendeu-se compreender melhor a influência de alguns fatores, previsivelmente modificados com as alterações climáticas, no *fitness* individual de organismos suscetíveis aos mesmos, integrando biomarcadores de *stress* oxidativo e parâmetros morfológicos. Em geral, sugere-se que os estádios larvares de *P. perezi*, particularmente a sua morfologia, são influenciados por condições abióticas extremas. Assim, considerando a importância que as fases larvares têm no *fitness* e sobrevivência dos anfíbios adultos, é plausível que as diferenças observadas possam comprometer o *fitness* dos organismos adultos e, conseqüentemente, alterar algumas dinâmicas nos ecossistemas.

**agradecimentos** • Os autores agradecem o apoio financeiro do CESAM pelo programa estratégico UID/AMB/50017/2013 (POCI-01-0145-FEDER-007638) financiado pelo fundo Europeu de desenvolvimento regional através do COMPETE2020 e PT2020 e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). Sérgio Marques agradece também o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia através da bolsa de Pós-Doutoramento SFRH/BPD/112803/2015.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, D., & Nicieza, A. G. (2002). Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology*, 16(5), 640–648
- Bagnyukova, T. V., Storey, K. B., & Lushchak, V. I. (2003). Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *Journal of Thermal Biology*, 28(1), 21–28.
- Barnett, T. P., Adam, J. C., & Lettenmaier, D. P. (2005). Potential impacts of a warming climate on water availability in snow-dominated regions. *Nature*, 438(7066), 303–309.
- Beaulieu, M., & Costantini, D. (2014). Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology*, 2(1).
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., & Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 15(4), 365–377.
- Bickford, D., Howard, S. D., Ng, D. J. J., & Sheridan, J. A. (2010). Impacts of climate change on the amphibians and reptiles of Southeast Asia. *Biodiversity and Conservation*, 19(4), 1043–1062.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- Blaustein, A. R., Belden, L. K., Olson, D. H., Green, D. M., Root, T. L., & Kiesecker, J. M. (2001). Amphibian Breeding and Climate Change. *Conservation Biology*, 15(6), 1804–1809.
- Blaustein, A. R., Walls, S. C., Bancroft, B. a., Lawler, J. J., Searle, C. L., & Gervasi, S. S. (2010). Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. *Diversity*, 2(2), 281–313.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254.
- Brockelman, W. Y. (1969). An analysis of density effects and predation in *Bufo americanus* tadpoles. *Ecology*, 632–644.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In S. F. and L. P. B. T.-M. in *Enzymology* (Ed.), *Biomembranes - Part C: Biological Oxidations* (Vol. Volume 52, pp. 302–310). Academic Press.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. In B. T.-M. in *Enzymology* (Ed.), *Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds* (Vol. Volume 113, pp. 484–490). Academic Press.
- Colavitti, R., & Finkel, T. (2005). Reactive Oxygen Species as Mediators of Cellular Senescence. *IUBMB Life*, 57(4–5), 277–281.
- Crespi, E. J., & Warne, R. W. (2013). Environmental conditions experienced during the tadpole stage alter post-metamorphic glucocorticoid response to stress in an amphibian. *Integrative and Comparative Biology*, 53(6), 989–1001
- Crump, M. L. (1981). Energy Accumulation and Amphibian Metamorphosis. *Oecologia*, 49(2), 167–169.
- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life*, 50(4–5), 279–289.
- Dawson, D. A., & Bantle, J. A. (1987). Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the Frog Embryo Teratogenesis Assay—*Xenopus* (FETAX). *Journal of Applied Toxicology*, 7(4), 237–244.
- Donnelly, M. A., & Crump, M. L. (1998). Potential Effects of Climate Change on Two Neotropical Amphibian Assemblages. *Climatic Change*, 39(2), 541–561.
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1994). *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University Press.
- Elliott, J. M. (2000). Pools as refugia for brown trout during two summer droughts: trout responses to thermal and oxygen stress. *Journal of Fish Biology*, 56(4), 938–948.

- Farombi, E. O., Adelowo, O. A., & Ajimoko, Y. R. (2007). Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4(2), 158–165.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. In B. T.-M. in Enzymology (Ed.), *Oxygen Radicals in Biological Systems* (Vol. Volume 105, pp. 114–120). Academic Press.
- Gervasi, S. S., & Foufopoulos, J. (2008). Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology*, 22(1), 100–108.
- Gosner, K. L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*, 16(3), 183–190.
- Gotthard, K., & Nylin, S. (1995). Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life history. *Oikos*, 3–17.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139.
- Harkey, G. A., & Semlitsch, R. D. (1988). Effects of Temperature on Growth, Development, and Color Polymorphism in the Ornate Chorus Frog *Pseudacris ornata*. *Copeia*, 1988(4), 1001–1007.
- Hassan, R., Scholes, R., & Ash, N. (2005). Ecosystems and human well-being: current state and trends, vol 1. Findings of the condition and trends working group of the Millennium Ecosystem Assessment. Washington, DC: Island Press.
- Iglesias-Carrasco, M., Martín, J., & Cabido, C. (2017). Urban habitats can affect body size and body condition but not immune response in amphibians. *Urban Ecosystems*, 20(6), 1331–1338.
- IPCC. (2007). Climate Change 2007 - The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fourth Assessment Report of the IPCC. (S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, ... H. L. Miller, Eds.). Cambridge, UK and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- IPCC. (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. Geneva, Switzerland.
- Jaime, B., Saioa, F., J., G. T. W., & María, C. L. (2018). Long-term monitoring of an amphibian community after a climate change- and infectious disease-driven species extirpation. *Global Change Biology*, 0(0).
- Justin, N. A., I., W. J., E., T. M., A., B. G., Alessandro, C., M., W. S., ... Vincent, C. (2018). Thermal biology mediates responses of amphibians and reptiles to habitat modification. *Ecology Letters*, 21(3), 345–355.
- Kehr, A. I., Schaefer, E. F., Duré, M. I., & Gómez, V. I. (2014). Influence of light intensity, water volume and density in tadpoles raised in mesocosm experiments. *Journal of Zoology*, 293(1), 33–39.
- Kiesecker, J. M., Blaustein, A. R., & Belden, L. K. (2001). Complex causes of amphibian population declines. *Nature*, 410(6829), 681–684.
- Krause, C. W., Lockard, B., Newcomb, T. J., Kibler, D., Lohani, V., & Orth, D. J. (2004). Predicting influences of urban development on thermal habitat in a warm water stream. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 40(6), 1645–1658.
- Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(1), 36–41.
- Maciel, T. A., & Juncá, F. A. (2009). Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema diplolister* and *Rhinella granulosa* (Amphibia: Anura). *Zoologia (Curitiba)*, 26(3), 413–418.
- Malek, R. L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M. A., & Gerhard, G. S. (2004). The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(3), 363–373.
- Marques, S. M., Antunes, S. C., Nunes, B., Gonçalves, F., & Pereira, R. (2011). Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. *Ecotoxicology*, 20(6), 1315–1327.
- Marques, S. M. R. L. (2011). Gene expression in understanding mechanisms of toxicity in amphibians. Tese de Doutorado. Universidade de Aveiro, Aveiro.
- McCarty, J. P. (2001). Ecological Consequences of Recent Climate Change. *Conservation Biology*, 15(2), 320–331.
- Milly, P. C. D., Dunne, K. A., & Vecchia, A. V. (2005). Global pattern of trends in streamflow and water availability in a changing climate. *Nature*, 438(7066), 347–350.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410.

- Nagasaka, A., & Nakamura, F. (1999). The influences of land-use changes on hydrology and riparian environment in a northern Japanese landscape. *Landscape Ecology*, 14(6), 543–556.
- Nelson, K. C., & Palmer, M. A. (2007). Stream Temperature Surges Under Urbanization and Climate Change: Data, Models, and Responses<sup>1</sup>. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 43(2), 440–452.
- Newman, R. A. (1989). Developmental plasticity of *Scaphiopus couchii* tadpoles in an unpredictable environment. *Ecology*, 1775–1787.
- Newman, R. A. (1992). Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *BioScience*, 42(9), 671–678.
- Ou, M., Hamilton, T. J., Eom, J., Lyall, E. M., Gallup, J., Jiang, A., ... Brauner, C. J. (2015). Responses of pink salmon to CO<sub>2</sub>-induced aquatic acidification. *Nature Clim. Change*, 5(10), 950–955.
- Parris, J. M., & Semlitsch, D. R. (1998). Asymmetric competition in larval amphibian communities: conservation implications for the northern crawfish frog, *Rana areolata circulosa*. *Oecologia*, 116(1), 219–226.