



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas - Programa Magister en Ciencias mención Zoología

PRESENCIA DE POSIBLES CRIOPROTECTORES (GLUCOSA Y GLICEROL) EN EL ANFIBIO ANURO, *PLEURODEMA THAUL* (LESSON, 1826) SOMETIDOS A ESTRÉS POR FRÍO.

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención Zoología.

PABLA NICOLE HERNANDEZ CIFUENTES
CONCEPCIÓN- CHILE
2016.

Profesor Tutor: Dr. Eduardo Tarifeño Silva.
Departamento de Zoología.
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.
Profesora Cotutora: Dra. Helen Grace Díaz Páez.
Departamento de Ciencias Básicas.
Escuela de Educación.

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Sede Concepción en conjunto con el Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Educación, Sede Los Ángeles, Universidad de Concepción.

Profesor tutor:

Dr. Eduardo Tarifeño Silva.

Profesora cotutora:

Dra. Helen Díaz Páez.

Comisión evaluadora:



Dr. Claudio Correa Quezada.

Dr. Claudio Veloso Iriarte.

Directora de Programa:

Dra. Lucila Moreno Salas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Página
Resumen	9
Abstract	11
Introducción	13
1. Efecto del frío sobre los anfibios.	13
2. Tipos de hibernación en anfibios.	14
3. Tolerancia al congelamiento y sobreenfriamiento: mecanismos de supervivencia frente al frío.	15
4. Mecanismos anticongelantes en anfibios: Los crioprotectores.	18
5. La glucosa como crioprotector: bioquímica, regulación y función.	20
6. Funcionamiento del glicerol como crioprotector	24
7. <i>Pleurodema thaul</i> como modelo de estudio.	25
Hipótesis	28
Predicciones	29
Objetivos de trabajo	30
1. Objetivo general	30
2. Objetivos específicos	30
Metodología	31
1. Área de estudio	31
2. Características de la localidad	32
3. Fase de captura	32
4. Fase de Cautiverio y Aclimatación	33
5. Fase experimental	34
5.1. Protocolo de estrés térmico por frio	34
5.2. Determinación de la concentración de glucosa	38
5.3. Determinación de la concentración de glicerol	38
6. Análisis estadísticos	39
Resultados	40
1. Análisis de las variables masa-tamaño corporal	40

2. Variaciones de los niveles plasmáticos de glicerol	40
2.1. Grupos sin someter al protocolo de estrés térmico por frío.	40
2.2. Grupos sometidos al protocolo de estrés térmico por frío.	41
3. Correlación entre las mediciones de glucosa con el método enzimático Spinreact y glucómetro Accu-Chek Active.	43
4. Variaciones de los niveles plasmáticos de glucosa.	45
4.1. Grupos sin someter al protocolo de estrés térmico por frío.	45
4.2. Grupos sometidos al protocolo de estrés térmico por frío.	46
Discusión	50
Conclusión	59
Agradecimientos	60
Literatura citada	61
Páginas Web	72
Anexos	73



ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema simplificado del proceso de Glucogenólisis hepático, extraído de do Amaral <i>et al.</i> , 2013.	22
Figura 2	Ubicación geográfica del área de captura de los individuos de <i>P. thaul</i> .	31
Figura 3	Diagrama de la organización de los individuos sometidos al protocolo de experimentación.	35
Figura 4	Esquema del protocolo de estrés térmico por frío.	37
Figura 5	Diseño experimental mensual del protocolo de estrés térmico por frío aplicado a los individuos de <i>P. thaul</i> .	37
Figura 6	Niveles de glicerol plasmático (mg/dL) en individuos de <i>P.thaul</i> sin someter al protocolo de estrés térmico por frío, mantenidos en los tres tratamientos de aclimatación. En rojo concentración inicial (Gi) y en azul concentración final (Gf).	40
Figura 7	Concentraciones de glicerol plasmático (mg/dL) en individuos de <i>P.thaul</i> sometidos al protocolo de estrés térmico por frío. En rojo concentración inicial (Gi) y en azul concentración final (Gf) para los tres tratamientos de aclimatación.	42
Figura 8	Variaciones en los niveles de glicerol inicial (Gi) (temperatura de aclimatación) y glicerol final (Gf) (temperatura de 0°C) en individuos de <i>P.thaul</i> sometidos al protocolo de estrés térmico por frío, en los tres tratamientos aplicados a la muestra.	43

Figura 9	a) Correlación entre los niveles de glucosa plasmática inicial (mg/dL) en todos los tratamientos, medida con el glucómetro Accu-Check Active y el método enzimático con el kit Spinreact. b) Correlación entre los niveles de glucosa plasmática final (mg/dL) en todos los tratamientos, medida con el glucómetro Accu-Check Active y el método enzimático con el kit Spinreact. c) Correlación entre los niveles de glucosa plasmática total (inicial y final) (mg/dL) en todos los tratamientos, medida con el glucómetro Accu-Check Active y el método enzimático con el kit Spinreact.	44
Figura 10	Niveles de glucosa plasmática (mg/dL) inicial (Glui) en rojo y final (Gluf) en azul, en individuos de <i>P.thaul</i> sometidos a los tres tratamientos de aclimatación, que no fueron expuestos al protocolo de estrés por frío.	46
Figura 11	Concentraciones de glucosa plasmática (mg/dL) inicial (Glui) en rojo y final (Gluf) en azul en individuos de <i>P.thaul</i> sometido a los tres tratamientos de aclimatación y expuestos al protocolo de estrés por frío.	47
Figura 12	Variaciones en los niveles de glucosa inicial (Glui) (temperatura de aclimatación) y glucosa final (Gluf) (temperatura de 0°C) en individuos de <i>P.thaul</i> sometidos al protocolo de estrés térmico por frío, en los tres tratamientos aplicados a la muestra.	48

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1	Concentraciones de glicerol y glucosa. Se analizan datos para variaciones de glicerol inicial (Gi) y final (Gf), así como para las variaciones de glucosa inicial (Glui) y final (Gluf) en <i>Pleurodema thaul</i> , agrupados por tratamiento (5°C, 25°C y T° ambiente). Valores son dados como media ± DS (desviación estándar). Análisis de test de Wilcoxon para las diferencias en glucosa dentro de cada tratamiento son representados con valor de (Z). Análisis de test de Kruskal-Wallis para comparar las variaciones entre grupos de tratamiento son representados como X ² (NS: no significativo, *P <0.05, **P <0.005, ***P <0.001).	49
----------------	--	----



ÍNDICE DE ANEXOS

Página

- ANEXO 1** Tabla con datos registrados en terreno al momento de la captura de los individuos. Masa, Largo Hocico-Cloaca (LHC), Niveles de Glucosa plasmática (Glu), Temperatura corporal (Tc) y Temperatura ambiental (Ta). Datos entregados como Media \pm SD (desviación estándar), Rango mínimo (min) y máximo (máx). 73
- ANEXO 2** Tabla con los datos registrados en laboratorio. Masa y Largo Hocico-Cloaca (LHC) para cada grupo mantenido a diferentes temperaturas de aclimatación (5°C, 25°C y T° ambiente). Datos entregados como Media \pm SD (desviación estándar), Rango mínimo (min) y máximo (máx). 73
- ANEXO 3** Niveles de Glicerol plasmático medido enzimáticamente usando un kit comercial BioSystems (G), Glucosa plasmática medida con el glucómetro Accu-Chek Active (Glu) y Glucosa plasmática medida enzimáticamente usando un kit comercial Spinreact (Glue), para cada grupo mantenido a diferentes temperaturas de aclimatación (5°C, 25°C y T° ambiente). 74

RESUMEN

Los anfibios, al ser ectotermos, presentan una alta dependencia fisiológica de la temperatura ambiental. Sin embargo, han logrado adaptarse a diferentes hábitats térmicos prosperando incluso en ambientes estacional o permanentemente fríos. Para ello han desarrollado diferentes estrategias, entre las que destaca la hibernación, sea ésta mediante la inmersión en el agua, la permanencia en hábitat terrestre, en un hibernáculo térmicamente aislado, o mediante la tolerancia al congelamiento. En esta última, es fundamental el rol que cumplen las moléculas crioprotectoras, reconociéndose entre los anfibios anuros a aquellos que presentan propiedades coligativas, siendo las más comunes la glucosa, el glicerol y la urea.

Dada la amplitud latitudinal y gran variedad climática presente en Chile, muchas especies de anfibios se ven enfrentadas a climas extremos, condición que favorecería el uso de mecanismos para tolerar el congelamiento. El presente estudio analizó la síntesis de moléculas crioprotectoras en *Pleurodema thaul* sometidos a estrés térmico por frío. Para ello, se midieron las concentraciones plasmáticas de glucosa y glicerol utilizando un glucómetro Accu-Chek Active y métodos enzimáticos con kit comerciales para glucosa y glicerol.

Los resultados muestran un incremento de moléculas con efecto crioprotector en los individuos sometidos al estrés térmico por frío. Sin embargo, este efecto fue reconocido solo para la glucosa, lo que resulta coincidente con los datos expuestos en anuros tolerantes al congelamiento. Respecto al glicerol, éste no manifiesta variaciones atribuibles al estrés térmico. La presencia de la glucosa como un mecanismo de tolerancia al congelamiento, ha

sido reportada como una de las vías más efectivas, por su rápida obtención a partir del glucógeno hepático.

De esta forma el presente estudio comprueba que *P. thaul*, sometido a estrés térmico por frío, aumenta significativamente sus niveles plasmáticos de glucosa, lo que en forma preliminar sería un indicador de la presencia de un mecanismo anticongelante en esta especie.

Palabras clave: anfibios, crioprotector, glucosa, glicerol.



ABSTRACT

Amphibians, as ectothermic organisms, are highly physiological dependent on environmental temperature. However, they have adapted to different thermal habitats prospering even in seasonally or permanently cold environments. For this they have developed different adaptive mechanisms, among which this hibernation by immersion in water, or terrestrial habitat in either a thermally isolated hibernaculum or freezing tolerance. In the last situation, the role of cryoprotectant molecules is essential, being recognized those who have colligative properties among anuran amphibians; the most common are glucose, glycerol and urea.

Given the extent latitudinal and great climatic variety present in Chile, many species of its amphibians have to confront extreme climates, which would force them to establish mechanisms to tolerate the freezing and achieve their survival. This study analyzes the existence of cryoprotectant molecules synthesis in *Pleurodema thaul* subjected to cold thermal stress. For that, were measured plasma concentrations of glucose and glycerol obtained using glucometer Accu-Chek Active and enzymatic methods through commercial kit for glucose and glycerol.

The results show an increase of molecules with cryoprotective effect at individuals undergoing cold thermal stress. However, this effect was recognized only for glucose, which is coincident with the data presented in freeze -tolerant frogs. About glycerol, this does not show variations attributable to thermal stress. The presence of glucose as a mechanism of freezing tolerance has been reported as one of the most effective ways, for rapid collection from liver glycogen.

This way, the present study found that *P. thaul*, undergoing cold thermal stress, increasing significantly plasma levels of glucose, which preliminarily would be an indicator of the presence of an antifreeze mechanism in this species.

Key words: amphibians, cryoprotectant, glucose, glycerol.



INTRODUCCIÓN

1. Efecto del frío sobre los anfibios.

Dada su condición de ectotermos, los anfibios poseen una capacidad termorreguladora muy limitada (Navas, 1997), obteniendo desde el medio externo la energía requerida para incrementar su temperatura corporal y así poder ejecutar todas sus funciones metabólicas (Sanabria *et al.*, 2007). Esto convierte a la temperatura en un factor selectivo de primer orden ya que influye en la supervivencia, crecimiento y dispersión de estos individuos (Angilletta, 2009).

La temperatura ambiente tiene un efecto en los patrones de distribución y abundancia de los organismos (Dunson & Travis, 1991; Tejedo *et al.*, 2012), por lo que el número de especies se ve reducido en ambientes que presentan escasa disponibilidad de recursos térmicos y/o altos costos para aumentar la temperatura corporal, desarrollando estrategias conductuales y fisiológicas especiales para permanecer en este tipo de hábitats (Navas, 1999).

Por otro lado, se sabe que todos los animales poseen un intervalo de temperaturas en el cual su organismo puede alcanzar su máxima eficiencia definida por la temperatura óptima de funcionamiento (aquella en donde el animal desarrolla sus funciones fisiológicas, conductuales, reproductivas, etc.), además de presentar un máximo y mínimo de temperatura soportable (Eckert *et al.*, 1991, Angilletta *et al.*, 2002, Tejedo *et al.*, 2012). Es por ello, que a nivel conductual, la termorregulación permite una rápida y económica adaptación a la variabilidad espacial y temporal de la disponibilidad de recursos térmicos (Templeton, 1982), por lo que gran parte de los anfibios termorregulan haciendo selección

de los microhábitats durante el día y la noche, para generar un rango de temperatura óptimo (Brattstrom, 1963). Es así como, debido a su capacidad para mantener relativamente constante su temperatura corporal por ciertos periodos de tiempo y a su gran capacidad de adaptación (Benavides *et al.*, 2005), que los anfibios han logrado sobrevivir y permanecer en un amplio espectro de ambientes térmicos, algunos de los cuales son extremadamente exigentes para ellos (Anguilleta *et al.*, 2002; Iturra-Cid, 2010; Hill *et al.*, 2006; Hillman *et al.*, 2009); sin embargo, en casos extremos deben entrar en una estado de aletargamiento para hacer frente a estas condiciones (Blaustein *et al.*, 1994; Storey & Storey, 2001), en los cuáles la supervivencia de los individuos está basada en diferentes mecanismos para evitar la congelación o bien para tolerarla, recurriendo en algunos casos a la hibernación (Hillman *et al.*, 2009).

2. Tipos de hibernación en anfibios.

La hibernación corresponde a una respuesta fisiológica del organismo frente a temperaturas estacionales frías en zonas templadas o de altura, lo que implica la congelación total o parcial del animal en donde su metabolismo es disminuido, incluyendo el almacenamiento de las reservas energéticas necesarias para soportar el aletargamiento, el que puede durar semanas e incluso varios meses. Para esto, los organismos reajustan el termostato hipotalámico a un nuevo valor cercano al de la temperatura ambiental en la cual se encuentra el animal (Eckert *et al.*, 1991; Pinder *et al.*, 1992) evitando el gasto energético excesivo que genera el intentar mantener una temperatura corporal más elevada.

Las especies de anfibios que viven en altas latitudes o altitudes, pasan gran parte de su ciclo de vida, ocultos en refugios de invierno, lo que las lleva a explotar la alta

productividad generada en verano (Pinder *et al.*, 1992; Wells, 2007). Debido a estas condiciones los anfibios presentan mecanismos que les permiten soportar los periodos de descenso brusco de temperaturas, encontrándose tres formas diferentes de hibernar: i) inmersión en el agua, ii) permanencia en tierra en un hibernáculo térmicamente aislado donde algunos organismos se resguardan de las duras condiciones climáticas al esconderse bajo la hojarasca o la nieve, lo que hace que las temperaturas en este microhábitat no desciendan por debajo de los -8°C , incluso cuando la temperatura del aire se encuentre por debajo de -20°C , y iii) permanencia en tierra con tolerancia al congelamiento lo que se asocia a mecanismos que impiden que los fluidos extracelulares alcancen el punto de congelación lo que permitiría por tanto, a los organismos sobrevivir en dichas condiciones extremas (Pinder *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 2006; Weels, 2007; Tattersall & Ultsch, 2008; Storey & Storey, 2001).

Tanto los anfibios que hibernan en agua como aquellos que lo hacen en tierra utilizan aparentemente los mismos mecanismos para sobrevivir al invierno: la acumulación de reservas, el mantenimiento del metabolismo mediante la oxidación de lípidos y el ajuste de membranas celulares y proteínas para optimizar el metabolismo a bajas temperaturas (Pinder *et al.*, 1992).

3. Tolerancia al congelamiento y sobreenfriamiento: mecanismos de supervivencia frente al frío.

La tolerancia al congelamiento se asocia a la supervivencia de muchos animales durante el invierno y ha sido reportada como una característica de cientos de especies de insectos terrestres (especialmente en Himenoptera, Diptera, Coleoptera y Lepidoptera),

invertebrados marinos (incluyendo moluscos, gasterópodos univalvos y bivalvos) y también en nemátodos, miriápodos y gasterópodos terrestres (Storey & Storey, 1996). Dentro de los vertebrados, se ha reportado la tolerancia al congelamiento en anfibios y reptiles (Storey & Storey, 1996). Sin embargo, no se conoce ningún animal que sobreviva a la congelación completa de sus líquidos tisulares (Eckert *et al.*, 1991). Para poder tolerar la congelación del líquido extracelular los individuos presentan adaptaciones específicas que controlan los sitios y la tasa de formación de hielo en forma segura, evitando la ocurrencia de posibles daños físicos tanto extra como intracelulares (Pinder *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 2006; Hillman *et al.*, 2009; Storey & Storey, 1996).

Uno de los mecanismos adaptativos más interesantes es la tolerancia al congelamiento, que ha sido definida como la capacidad que tienen los individuos para sobrevivir a la congelación y descongelación de una cantidad biológicamente significativa de agua corporal, que por lo general corresponde al 50% o más de agua corporal en hielo extracelular (Pinder *et al.*, 1992; Storey & Storey, 1996; Hill *et al.*, 2006; Hillman *et al.*, 2009; Costanzo & Lee, 2013). La mayor parte de las especies que emplean este mecanismo son capaces de soportar la congelación por cortos periodos (horas como máximo) con temperaturas que van de los -1°C a los -3°C , donde la acumulación de hielo generalmente es menor al 20% del agua corporal total, restringiendo el hielo a los tejidos periféricos como la piel y los músculos esqueléticos (Storey & Storey, 1996). Adicionalmente, se ha reconocido como temperatura límite en la tolerancia de los anfibios anuros los -8°C (Schmid, 1982). Pese a esto, los estudios han determinado que existe una baja probabilidad de encontrar este tipo de temperaturas en los microambientes de hibernación, los que se encuentran principalmente bajo la hojarasca y la nieve (Schmid, 1982; Pinder *et al.*, 1992;

Storey & Storey, 2001). Entre los anfibios que utilizan esta estrategia se encuentran *Rana sylvatica*, *Hyla versicolor*, *Pseudacris crucifer*, *Pseudacris triseriata*, todos habitantes de América del Norte (Pinder *et al.*, 1992; Storey, 1990; Layne & Lee, 1987). En estos anuros, el mecanismo básicamente consiste en la formación de una gran cantidad de hielo a partir del agua presente en el líquido extracelular, lo que provoca que los solutos contenidos en la porción líquida se concentren, es decir, aumenta la presión osmótica extracelular. Este proceso causa un drenaje del agua desde las células, disminuyendo el punto de congelación intracelular. Al disminuir aún más la temperatura, continúa este proceso determinando una mayor disminución del punto de congelación del agua remanente intracelular (Eckert *et al.*, 1991).

Otros animales pueden experimentar “sobreenfriamiento”, en el cual los líquidos corporales pueden enfriarse por debajo de su temperatura de congelación, permaneciendo sin congelarse debido a la ausencia de cristales de hielo (Eckert *et al.*, 1991) por acción de las moléculas crioprotectoras. Para los animales que experimentan sobreenfriamiento se conocen algunas adaptaciones que apuntan a regular el cambio del volumen celular, como es el caso de los crioprotectores coligativos, que se encargan de reducir el punto de congelación minimizando la crenación celular durante la formación de hielo extracelular. Otro tipo de crioprotector son los conocidos como estabilizantes de membrana, que generalmente se encuentran en bajas concentraciones y evitan que las membranas celulares sufran la transición líquido-gel (Pinder *et al.*, 1992; Storey & Storey, 1996; Steiner *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2006; Hillman *et al.*, 2009). Además del funcionamiento de los crioprotectores, se sabe que una alta densidad de las proteínas de transporte de membrana

garantiza la rápida distribución del crioprotector (Storey & Storey, 1996; Steiner *et al.*, 2000).

4. Mecanismos anticongelantes en anfibios: Los crioprotectores.

Los crioprotectores funcionan como mecanismos de protección al congelamiento dándole al individuo la posibilidad de reactivar las funciones vitales después de días o semanas de congelación continua; es por ello que se acumulan antes o durante el proceso de congelación y juegan un papel importante en la protección celular y tisular frente a las lesiones producidas por el proceso de congelación-descongelación.

Estos constituyen una amplia gama de compuestos orgánicos que presentan bajo peso molecular, alta solubilidad y permeabilidad, fácil disponibilidad, compatibilidad con macromoléculas y que son capaces de eliminar los efectos perjudiciales de la congelación (Storey & Storey, 1986; Storey, 1990; Layne & Lee, 1995; Storey & Storey, 1996; 2001; Costanzo & Lee, 2013). Su función está dada al agregarse a los líquidos corporales (Hill *et al.*, 2006), por lo que estos se introducen en los líquidos intra y extracelulares, lo que determina el incremento de la concentración de solutos en ambos compartimentos. Al aumentar la cantidad de soluto en los líquidos extracelulares disminuye el punto de congelamiento y se limita la formación del hielo en este compartimento. Mientras que el incremento de la concentración de los solutos en los líquidos intracelulares limita la cantidad de agua que debe salir de las células lográndose un equilibrio osmótico con los líquidos extracelulares que están concentrados (Storey & Storey, 1996; Hill *et al.*, 2006).

Se conocen dos tipos principales de crioprotectores producidos mediante reacciones fisiológicas: los no coligativos y los coligativos.

Los crioprotectores no coligativos disminuyen el punto de congelación de los líquidos corporales debido a sus propiedades químicas especiales. Se cree que estos compuestos actúan por medio de la unión (enlaces débiles del tipo uniones hidrógeno) a los cristales de hielo recién formados construyendo formas geométricas específicas que impiden el crecimiento del hielo porque evitan que las moléculas de agua se unan entre sí con libertad y que los cristales comiencen su desarrollo. Estos pueden encontrarse diluidos y aun así ser muy efectivos, porque descienden el punto de congelación varios cientos de veces más que la reducción lograda solo mediante principios coligativos simples (Storey & Storey, 1996; Steiner *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2006). Dentro de estos, se reconocen a las llamadas proteínas anticongelantes (que pueden corresponder a proteínas de estructura primaria y terciaria o incluso glicoproteínas). Las soluciones acuosas de proteínas anticongelantes típicamente tienen un punto de congelación que es más bajo que su punto de fusión (histéresis), ayudando a los organismos a sobrevivir a temperaturas cercanas al punto de congelación del agua. Estas han sido descritas en varios tipos de organismos, como bacterias, plantas, peces marinos polares, en algunos insectos y arañas (Storey & Storey, 1996; Sinclair *et al.*, 2003; Antony *et al.*, 2016). Su funcionamiento básico no impide el crecimiento de los cristales de hielo, pero lo limitan a tamaños manejables que no comprometen las funciones vitales de la célula. Por esta razón se las conoce también como “proteínas reestructuradoras del hielo”. Su acción es necesaria para impedir la ocurrencia de un inusual comportamiento del hielo conocido como recristalización; por lo tanto contrarrestan la recristalización aprisionando a los pequeños cristales, evitando o enlenteciendo su transformación en cristales más grandes y peligrosos (Hill *et al.*, 2006; Goodsell, 2009).

Los crioprotectores coligativos, por otra parte, disminuyen el punto de congelación de los líquidos corporales sólo por medio de principios coligativos; es decir, estos disminuyen el punto de congelación al incrementar la concentración total de solutos en los líquidos y no por medio de propiedades químicas específicas. Estos han sido descritos en los anfibios, siendo los más recurrentemente encontrados en la literatura la glucosa, el glicerol y la urea (Storey & Storey, 1996; Hillman *et al.*, 2009; Costanzo & Lee, 2013). La glucosa ha sido descrita como molécula crioprotectora en al menos seis especies de anfibios anuros: *Rana sylvatica*, *Lithobates catesbeianus*, *Pseudacris triseriata*, *Acris crepitans*, *Pseudacris crucifer* y *Rhinella schneideri*, especies que se encuentran en el hemisferio norte, a excepción de *R. schneideri* que presenta distribución en Sudamérica (Steiner *et al.*, 2000). Mientras que la presencia de glicerol como crioprotector ha sido comprobado en *Hyla versicolor*, que también presenta distribución asociada al hemisferio norte. Respecto a la urea, esta se ha reportado para la especie *R. sylvatica*. Resulta destacable la mención de un probable efecto crioprotector para *Rhinella spinulosa* en Argentina, donde Sanabria y colaboradores (2015) reportan la conducta de sobreenfriamiento para esta especie, argumentando posibles incrementos en los niveles de glucosa plasmática, debido dado que la molécula de glucosa ha sido reconocido como el más eficiente mecanismo crioprotector a nivel tisular (Costanzo & Lee, 2013; Sanabria *et al.*, 2015).

5. La glucosa como crioprotector: bioquímica, regulación y función.

El mecanismo de producción de glucosa extracelular cómo agente crioprotector se activa cuando el anfibio se enfrenta a condiciones de frío extremo, donde los individuos son capaces de producir cantidades masivas de glucosa a partir de reservas de glucógeno, en forma súbita, cuando comienza la formación de hielo en sus cuerpos (Hill *et al.*, 2006).

Bioquímicamente, el glucógeno es una forma importante de almacenamiento de energía química, por lo tanto, la glucosa que deriva de éste se moviliza fácilmente en el organismo, ya que no requiere de una reacción anabólica de síntesis (Layne & Lee, 1987; Jenkins & Swanson, 2005).

La glucosa es capaz de actuar como crioprotector, tanto desde el punto de vista metabólico como coligativo. La capacidad de tolerancia al congelamiento depende en gran medida de los niveles de crioprotectores que pueden alcanzar los tejidos corporales (do Amaral *et al.*, 2013). Es así como Storey & Storey (1986) describieron una relación inversa entre los niveles de glucosa plasmática y glucógeno del hígado durante los episodios de congelación en *Rana sylvatica*, lo que sugirió que la glucogenólisis en el hígado era la fuente de este crioprotector. Esto llevó a suponer que los anfibios almacenaban glucógeno en el hígado como preparación para la hibernación. Por lo que las reservas de glucógeno debían alcanzar previamente niveles necesarios para asegurar la supervivencia exitosa del individuo, durante la congelación que se produce en invierno (Costanzo *et al.*, 1993; Jenkins & Swanson, 2005).

Por tanto, la glucosa sintetizada a partir de las enormes reservas de glucógeno hepático, se exporta rápidamente desde el hígado a los tejidos corporales antes que la circulación termine (do Amaral *et al.*, 2013), encontrándose los niveles más altos en los órganos principales como el corazón y cerebro y descendiendo progresivamente hacia los órganos y tejidos periféricos (Storey & Storey, 1986; Pinder *et al.*, 1992; Costanzo *et al.*, 1993). Las especies que acumulan glucosa inician la eliminación de crioprotectores inmediatamente después de la descongelación, restaurando los niveles de glucógeno hepático. Los ciclos múltiples de congelación-descongelación producen un patrón de repetición de síntesis y

degradación del crioprotector (Storey & Storey, 1986; Pinder *et al.*, 1992; Costanzo *et al.*, 1993).

La Glucogenólisis hepática corresponde a la ruta de síntesis de la glucosa, la que consiste en la degradación del glucógeno a glucosa en el hígado de los vertebrados, en general. De forma simplificada, este proceso involucra como enzimas principales a la proteína quinasa A (PKA) y su subunidad catalítica (PKAc), glucógeno fosforilasa quinasa (PhK), glucógeno fosforilasa (GPa y GPb), generándose una cadena de reacciones de fosforilación (Figura 1) (do Amaral *et al.*, 2013).

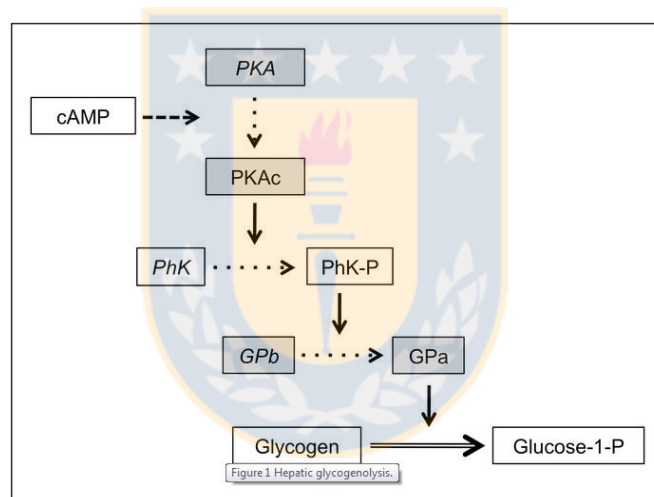


Figura 1: Esquema simplificado del proceso de Glucogenólisis hepático, extraído de do Amaral *et al.*, 2013.

El control entre la formación periférica de hielo y la producción de glucosa hepática es indudablemente nervioso y hormonal, probablemente mediado por catecolaminas (Conlon, 1998). Los estudios con hepatocitos aislados de *R. sylvatica* han demostrado que la producción de glucosa es altamente sensible a la estimulación por la hormona epinefrina, ya

que esta estimula rápidamente la hiperglucemia en frío (5° C). Del mismo modo se ha comprobado para *R. temporaria* que no existiría un estímulo de la epinefrina en temperaturas cálidas (25° C), determinándose además, que la respuesta a la adrenalina hiperglucémica es mayor en época de otoño en *R. pipiens* (Pinder *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 2000). Por lo tanto, la síntesis de crioprotector por ranas tolerantes a la congelación puede ser una respuesta exagerada, dado que se generan grandes cantidades de glucosa cuando la sensibilidad normal del hígado aumenta frente a la estimulación de catecolaminas durante los meses de invierno (Pinder *et al.*, 1992).

A nivel metabólico se ha determinado que el mecanismo de control de la glucógeno fosforilasa en *R. sylvatica* tiene componentes diferentes. De esta manera, la activación de la enzima parece tener dos fases, una inmediata, con un aumento en el porcentaje de la enzima en una forma activa, iniciada luego de 2 minutos de exposición al congelamiento y que se completa en 30 a 60 minutos, y una posterior, con un aumento más lento en la actividad total de la fosforilasa después de aproximadamente 30 minutos de exposición a la congelación y que persiste durante varias horas. En general, el contenido de la fosforilasa en el hígado puede elevarse desde siete hasta trece veces para apoyar las tasas de síntesis de glucosa. El control de la activación de la glucógeno fosforilasa en el hígado *R. sylvatica* se da través de la fosforilación de proteínas (Pinder *et al.*, 1992; Costanzo *et al.*, 1993). Debido a estas características, la glucosa se torna en un crioprotector, que parece ventajoso para la reanudación de la función metabólica después de la congelación. Estudios *in vitro* con tejidos de corazón aislado de *R. sylvatica* han demostrado que la contractilidad se recuperó después de la congelación sólo cuando el tejido se congela en presencia de glucosa (Pinder *et al.*, 1992).

6. Funcionamiento del glicerol como crioprotector

Otro crioprotector descrito en anfibios corresponde al glicerol (Storey y Storey, 2001; 2005). Sin embargo, su presencia solo ha sido comprobada en *Hyla versicolor*.

Hillman y Colaboradores (2009) indican que el frío actuaría estimulando la síntesis de glicerol durante otoño y finales de invierno, por lo tanto, *H. versicolor* aumentaría las concentraciones de glicerol al verse enfrentada a condiciones térmicas bajas, por lo que esta molécula presenta una significancia coligativa en la protección térmica frente al frío. Lo que ocurre en esta especie es tolerancia al congelamiento extracelular evitando el congelamiento intracelular a través de la liberación de glicerol en sus tejidos, generándose un incremento abrupto de este en el plasma sanguíneo (Storey & Storey, 2005; Costanzo & Lee, 2013). De esa forma, el hielo queda afuera de las células, quitándoles el agua y dejando en ellas una solución densamente azucarada. Sin embargo, esto no serviría de mucho si los órganos de la *Hyla versicolor* no tuvieran la capacidad de vivir sin oxígeno por un tiempo, además de poseer la capacidad de recuperarse frente a los eventuales daños que puede ocasionar la producción de hielo interno. Son estas características las que posibilitan a la especie para sobrevivir varios días a bajas temperaturas (-6°C) (Storey & Storey, 2005; Layne & Lee, 1987).

En lo que se refiere al aumento y la eliminación del glicerol, durante el congelamiento y descongelamiento respectivamente, los autores sugieren que puede ser menos móvil que la glucosa y parece estar mucho más uniformemente distribuido entre los órganos (Pinder *et al.*, 1992). Adicionalmente, se ha descrito que una vez terminado el congelamiento, las concentraciones de glicerol continúan elevadas durante varias semanas. Esto ha llevado a

los investigadores a pensar que existe un depósito inerte de glicerol en *H. versicolor* durante los meses de invierno (Layne & Lee, 1987; Pinder *et al.*, 1992; Hillman *et al.*, 2009).

7. *Pleurodema thaul* como modelo de estudio.

Pleurodema thaul, llamada comúnmente “sapito de cuatro ojos”, corresponde a una especie de anuro nativa del sur de Sud América, descrita para Chile y Argentina. En Chile, es uno de los anfibios más abundantes (Díaz-Páez & Ortiz, 2001) debido a que ha logrado adaptarse a distintos tipos de hábitats, presentando una amplia distribución latitudinal, delimitada entre Carrera Pinto, Región de Atacama (27° 06' S, 69° 53' W) en el norte (Correa *et al.*, 2007), hasta Aysén (45 ° 30'S, 70 ° 20'W) en el sur (Cei, 1962; Díaz-Páez & Ortiz, 2001; Duellman & Veloso, 1977; Iturra-Cid, 2010; Victoriano *et al.*,1995), y desde la costa hasta 3125 m (Correa *et.al.*,2010). Se encuentra asociado a ambientes xeromorfos, mesomórficos, regiones andinas y patagónicas higromórficas (Iturra-Cid 2010). En lo que a su estado de conservación concierne, esta especie ha sido categorizada como especie Casi Amenazada de acuerdo al Reglamento de Clasificación de Especies (RCE) del Ministerio del Medio Ambiente (<http://www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/index2.htm>), mientras que la lista roja de especies amenazadas propuesta por la UICN para el año 2015 la categoriza como Preocupación Menor (LC) en vista de su amplia distribución, tolerancia de una amplia gama de hábitats y la gran población presunta (<http://www.iucnredlist.org/details/57291/0>).

Esta especie es capaz de vivir en ambientes de gran altitud, donde se sabe que las condiciones del entorno pueden llegar a ser extremas desde el punto de vista térmico, tanto

por las bajas temperaturas como por las altas temperaturas. (Sommaruga, 2001). De acuerdo a Navas (1997) existen anfibios que logran permanecer en estos ambientes, debido a su capacidad para soportar la alta variabilidad térmica frente a las frecuentes temperaturas críticas mínimas, la elevada radiación ultravioleta dada por la altura y la presencia de hielo y nieve durante gran parte del año.

Sin embargo, una de las características más importantes en estos ambientes es la presencia de una multitud de microhábitats y microclimas que surgen de la interacción del relieve y la pendiente del suelo con la radiación solar y el viento. Estos microhábitats y microclimas son explotados por varias especies de plantas y animales (Logares, 2003). Para los anuros, Navas (1996) reconoció que las especies presentes en la zona alta de la Cordillera de los Andes de Colombia, realizaban una selección de diferentes microhábitats de acuerdo al periodo del día, y con esto lograban reducir la exposición al estrés térmico.

En el caso de *P. thaul*, es poco lo que se sabe; Iturra-Cid (2010) analizó una pequeña fracción de los aspectos térmicos descriptivos en condiciones naturales y experimentales, como lo son la temperatura de preferencia (T_p), las temperaturas críticas máxima (TC_{max}) y mínima (TC_{min}), las tasas de calentamiento (T_{cal}) y enfriamiento (T_{enfr}), asociadas a variación geográfica (tres poblaciones ubicadas a diferentes latitudes dentro de Chile), además del registro de la temperatura corporal, de sustrato y el aire durante épocas invernales (Iturra-Cid *et al.*, 2014).

Si bien es cierto que Iturra-Cid y colaboradores (2014) reconoce la capacidad de *P. thaul* para hibernar, no existen trabajos relacionados con la descripción de los procesos involucrados en la hibernación en esta especie, ni con los mecanismos que esta utilizaría

para sobrellevar el estrés producido por el frío. Es por ello que resulta interesante identificar si esta especie presenta mecanismos que le permitan sobrevivir en condiciones térmicas de congelamiento, vía la producción de crioprotectores coligativos.

En Chile a la fecha no se han realizado, en anuros, estudios específicos acerca de tolerancia al congelamiento y/o sobreenfriamiento y tampoco existen estudios atinentes a la posible presencia de los crioprotectores, aun cuando existen especies, cuya distribución latitudinal y altitudinal las enfrenta a ambientes extremos, como es el caso de *P. thaul*.



HIPOTESIS

Diversos estudios han demostrado la presencia de crioprotectores de tipo coligativo en anfibios. Además, se sabe que los anfibios que hibernan en condición de congelamiento presentan diversas moléculas que actúan como crioprotectores, habiéndose determinado a la glucosa como la molécula más recurrente con efecto crioprotector en anuros.

En Chile *P. thaul* es la especie de anuro con mayor distribución latitudinal y una de las que tiene mayor rango altitudinal por lo que se ve enfrentada a diversos ambientes, algunos de los cuales son extremos, encontrándose en algunos casos con climas asociados a frío y nieve. Por lo tanto, es esperable que en esta especie se evidencien mecanismos crioprotectores al ser sometidos a estrés por frío. En base a lo anterior, se establecen las siguientes hipótesis:

H₁: Bajo condiciones de estrés térmico por frío *Pleurodema thaul* presenta un incremento en los niveles plasmáticos de moléculas con acción crioprotectora.

H₂: De las moléculas descritas con efecto crioprotector, *P. thaul* utiliza como principal molécula crioprotectora a la glucosa.

PREDICCIONES

- Se espera que los niveles plasmáticos de crioprotectores (glucosa y/o glicerol) se incrementen al enfrentar a individuos de *P. thaul* a estrés por frío.
- Se espera que los individuos de *P. thaul* sometidos a una temperatura de aclimatación menor (5°C) presenten mayores niveles plasmáticos de crioprotectores (glucosa y glicerol) que los individuos sometidos a una temperatura de aclimatación mayor (25°C).
- Se espera que la variación en los niveles plasmáticos de las moléculas crioprotectoras sea mayor en los individuos de *P. thaul* sometidos a una temperatura de aclimatación mayor (25°C) en comparación a individuos sometidos a una temperatura de aclimatación menor (5°C), por cuanto estos ya habrían elevado sus niveles plasmáticos de crioprotector por efecto de la temperatura de aclimatación.

OBJETIVOS DE TRABAJO

1. Objetivo general:

Reconocer el uso de moléculas crioprotectoras por parte de individuos de *P. thaul* sometidos a estrés térmico por frío.

2. Objetivos específicos:

1. Cuantificar la tolerancia de individuos adultos de *P. thaul* a condiciones de estrés térmico por frío.
2. Comparar las variaciones en las concentraciones plasmáticas de los crioprotectores (glucosa y glicerol) en individuos expuestos a diferentes condiciones térmicas (25°C, 5°C) y cotejarlas con condiciones ambientales normales.
3. Determinar si la talla y/o masa corporal de los individuos influye en las variaciones plasmáticas de los crioprotectores glucosa y glicerol.
4. Establecer si la especie utiliza solo un crioprotector o es capaz de utilizar glucosa y glicerol como crioprotectores, al ser sometida a estrés por frío.

METODOLOGÍA

1. Área de estudio:

Los individuos de *P. thaul* capturados proceden de la localidad de Antuco, específicamente del sector Los Pangues, Región del Biobío, Chile ($37^{\circ}23'38''\text{S}$; $71^{\circ}26'16''\text{O}$) (Figura 2). Esta área fue seleccionada por sus características climáticas, dado que al ser esta un área de altura (1024 m.s.n.m.), presenta condiciones ambientales que son consideradas extremas para los anfibios, con temperaturas mínimas bajo los 0°C en época invernal.

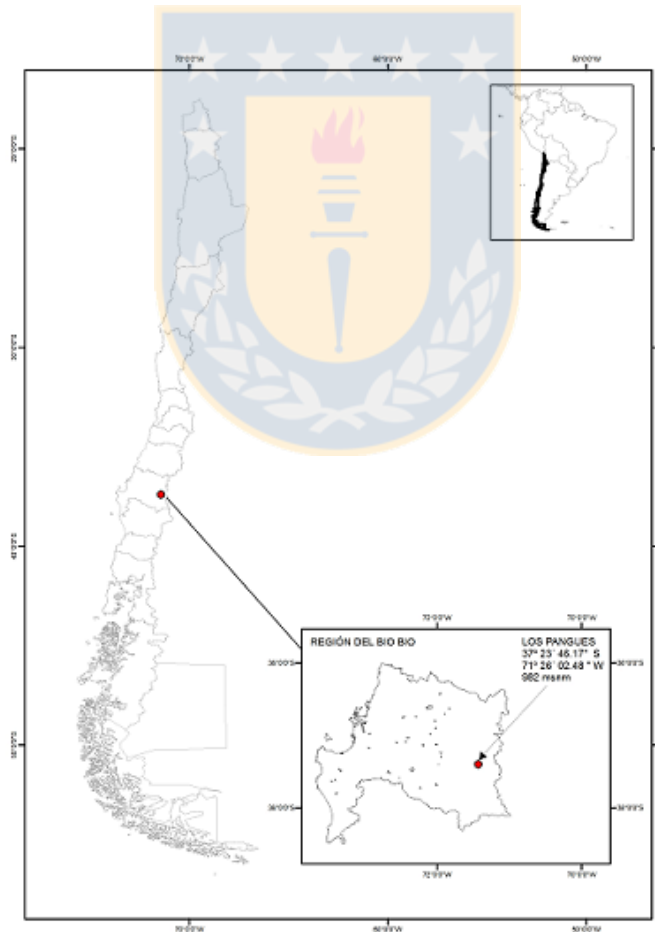


Figura 2. Ubicación geográfica del área de captura de los individuos de *P. thaul*.

2. Características de la localidad:

Sector Los Pangues, Antuco: presenta un clima de transición entre mediterráneo y templado húmedo hacia el sur, mientras que en altura presenta clima frío. Las precipitaciones caen en forma de nieve, entre los meses de junio a septiembre y de agua lluvias en el resto del año, con una concentración máxima entre mayo y agosto (55%) y un 9% entre enero y marzo. Las temperaturas son extremas y disminuyen sus promedios por efecto de la altura (CONAF, 1993). La temperatura media máxima anual registrada es de 14°C y la mínima es de -0,9°C, con una temperatura media anual de 6,8°C (Luebert & Plissock, 2006). La zona de colecta se encuentra ubicada en la entrada Oeste del Parque Nacional Laguna del Laja. La vegetación se caracteriza por ser un bosque homogéneo de ciprés de la cordillera (*Austrocedrus chilensis*), acompañado en menor grado con especies tales como el radial (*Lomatia hirsuta*) y un sotobosque abierto compuesto principalmente de herbáceas y especies arbustivas como el radial enano (*Orites myrtoidea*) y el maitén de Chubut (*Maytenus chubutensis*) (CONAF, 1993).

3. Fase de captura:

Las colectas de individuos se realizaron durante el periodo de verano - otoño del año 2015. La captura se llevó a cabo en forma manual a través de la técnica de búsqueda de refugios utilizados por los anfibios y encuentro visual (Donnelly et al., 1994). Para la manipulación de los especímenes se utilizaron las medidas establecidas en el “Protocolo para el control de enfermedades infecciosas de Anfibios durante estudios de campo” (Lobos et al. 2012), el cual establece que tanto el calzado como vestimenta utilizada en terreno por el recolector, deben ser limpiados y desinfectados antes y después de realizar la

experiencia, con abundante agua y posteriormente el calzado deberá ser sumergido en una solución desinfectante de virkon 1% (10 g/l, DuPont Animal Health Solutions) por un minuto (como alternativa se podrá utilizar solución de cloro (hipoclorito de sodio al 4%). Para la manipulación de cada individuo se deben utilizar guantes de nitrilo (guantes azules) o látex (sin talco) desechables y una vez finalizada la manipulación de los individuos, todo el material utilizado debe ser dispuesto en bolsas plásticas para su posterior desinfección o eliminación.

Veinte individuos adultos fueron colectados, posterior a su captura se implementó el diseño experimental en laboratorio. Durante la captura, cada individuo fue depositado dentro de bolsas herméticas, para posteriormente ser transportados en cajas de pequeño tamaño habilitadas (con orificios de respiración y papel absorbente humedecido) como contenedor individual y así evitar algún daño físico o la muerte del animal.

Adicionalmente cada individuo fue sexado mediante observación de caracteres sexuales externos. Se midió y registró su temperatura corporal mediante termómetro infrarrojo Fluke 62 mini IR thermometer (°C) y su masa corporal mediante balanza digital OHAUS YA-100 de precisión 0,01 g. El largo corporal fue registrado desde el hocico al urostilo (Cei, 1962) mediante un pie de metro digital Mitutoyo 6” de precisión 0,01 mm (ver ANEXO 1).

4. Fase de Cautiverio y Aclimatación:

Los anfibios se mantuvieron en cautiverio por un periodo total de un año en el Laboratorio de Ecofisiología de Herpetozoos de la Universidad de Concepción Los Ángeles, el cual está acondicionado con control de temperatura, humedad y fotoperíodo.

Al llegar los individuos fueron depositados en terrarios individuales durante una semana para evitar el contagio de agentes patogénicos entre ellos, proveyendo a cada terrario de condiciones similares a las de su hábitat. Posteriormente, se agruparon en terrarios grupales de 15 cm de ancho x 30 cm de largo y 20 cm de alto, esto a fin de disminuir el estrés. Se alimentaron tres veces por semana con una dieta compuesta de gusanos de tebos, larvas de tenebrios y adultos de mosca del vinagre.

Para la identificación individual se utilizó el reconocimiento fotográfico (Bradfield, 2004; Kenyon *et. al.*, 2009 y 2010), que consiste en un tipo de marcaje natural no invasivo que evita las desventajas generadas con las marcas artificiales como estrés, infecciones, lesiones corporales, entre otras. Las fotografías fueron tomadas para registrar el patrón dorsal de manchas y colores de los individuos con cámara Cybertshot Sony DSC-H2 una vez por mes y archivadas en formato jpg.

5. Fase Experimental:

5.1. Protocolo de estrés térmico por frío:

Para verificar si *P. thaul* era capaz de soportar el estrés por frío mediante la utilización de crioprotectores (glucosa y glicerol) se ejecutó el siguiente protocolo.

Para la experimentación la muestra fue separada en dos grupos de n=4 y cuatro grupos de n=3. Los dos grupos de n=4 fueron colocados bajo condiciones controladas dentro del laboratorio, aclimatándose por un período mínimo de 4 semanas a 25°C y una humedad relativa del 60%, en un régimen de fotoperíodo 14 horas luz y 10 horas oscuridad (simulando las condiciones ambientales promedio de primavera - verano). Dos grupos de

n=3 fueron aclimatados a 5°C, humedad relativa del 60% y fotoperíodo 8 horas luz y 16 horas oscuridad (simulando las condiciones ambientales promedio de otoño-invierno). Finalmente, dos grupos de n=3 fueron sometidos a condiciones ambientales normales (no controladas), para lo cual los terrarios se dejaron en un espacio abierto acondicionado para la supervivencia de los individuos y que simula las condiciones naturales de su hábitat donde la temperatura, humedad y fotoperíodo corresponden a las fluctuaciones diarias normales de Los Ángeles (Nowakowska *et al.*, 2011). Todos los individuos asignados a cada tratamiento fueron escogidos de forma aleatoria (Figura 3).

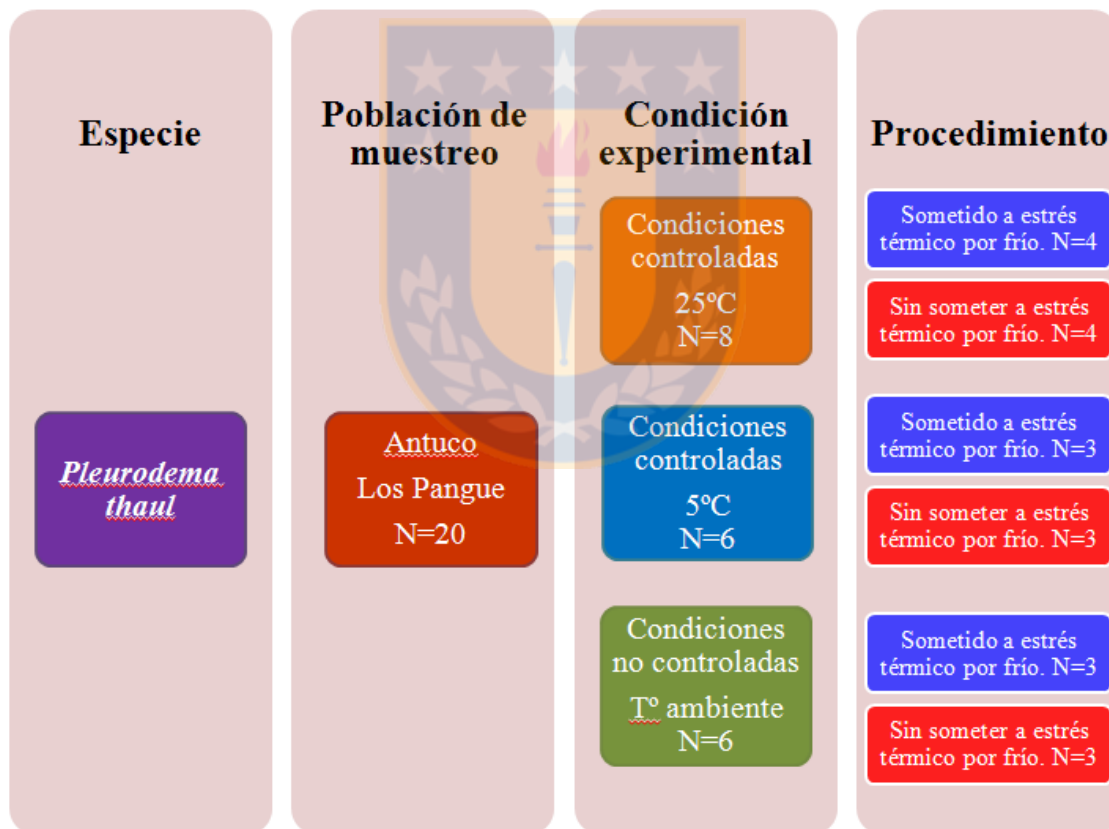


Figura 3: Diagrama de la organización de los individuos sometidos al protocolo de experimentación.

Previo a cada experimentación, se registró la masa corporal y el largo hocico - cloaca de cada individuo, además de la Temperatura Corporal experimental (T_{cexp}) que corresponde a la temperatura corporal determinada en condiciones de laboratorio. Ésta se registró desde el dorso del animal mediante Termómetro Infrarrojo (Fluke 62 mini IR thermometer, $0,1^{\circ}\text{C}$ de precisión).

Se consideró en cada caso como la Temperatura Corporal inicial (T_{ci}) a aquella registrada al inicio de la experimentación y como Temperatura Corporal final (T_{cf}) a la registrada al finalizar la experimentación.

Para efectuar el protocolo de estrés térmico por frío, cada individuo fue puesto dentro de una caja plástica provista de respiración y papel absorbente húmedo, la que fue trasladada al interior de un sistema de refrigeración el que se mantuvo a una temperatura constante de aproximadamente de 0°C , simulando las temperaturas ambientales que se pueden encontrar durante época invernal. La temperatura del sistema fue controlada con un termotester (Eosun EM Digital multimeter 18 high performance). Los animales permanecieron bajo estas condiciones durante cuatro horas (Pinder *et al.*, 1992) (Figura 4). Para evitar el deceso de los animales, se revisó durante el proceso el estado del animal cada hora. Una vez concluido el experimento, los anfibios fueron retornados a los terrarios, donde se mantuvieron sin nuevas experimentaciones durante una semana. Esto tuvo por finalidad, permitir la recuperación del animal y retornar a sus condiciones fisiológicas normales (Storey & Storey, 1986; Layne *et al.*, 1996).

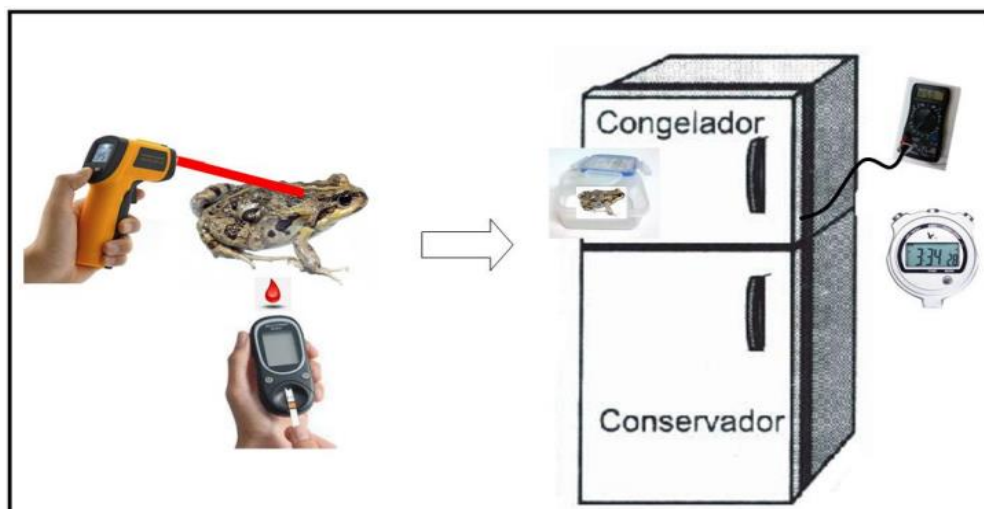


Figura 4: Esquema del protocolo de estrés térmico por frío.

En promedio, la experimentación duro 4 meses, en los que se realizaron 2 eventos de experimentación mensual (Iturra-Cid, 2010), manteniendo siempre una semana de “descanso” (sin experimentación) para cada animal. (Figura 5).

<u>Pleurodema thaul</u>			
Mes 1	Semana 1	Aclimatados a 25°C.	Aplicación del Protocolo de estrés térmico por frío.
		Aclimatados a 5°C.	
		Mantenidos a T° ambiente.	
	Semana 2	Aclimatados a 25°C.	Recuperación de las condiciones fisiológicas normales.
		Aclimatados a 5°C.	
		Mantenidos a T° ambiente.	
	Semana 3	Aclimatados a 25°C.	Aplicación del Protocolo de estrés térmico por frío.
		Aclimatados a 5°C.	
		Mantenidos a T° ambiente.	
	Semana 4	Aclimatados a 25°C.	Recuperación de las condiciones fisiológicas normales.
		Aclimatados a 5°C.	
		Mantenidos a T° ambiente.	

Figura 5: Diseño experimental mensual del protocolo de estrés térmico por frío aplicado a los individuos de *P. thaul*.

5.2. Determinación de la concentración de glucosa:

Para determinar los niveles de glucosa en la sangre, se realizó una punción con jeringa de insulina de 50 unidades y capacidad 0,5 ml en la vena ventral del individuo, extrayendo una gota de sangre (menor al 0,1% de su peso corporal) (Tapley *et al.*, 2011; Allender *et al.*, 2008) la que fue incorporada en la cinta de lectura del glucómetro Accu-Chek Active. Esta metodología fue corroborada enzimáticamente usando un kit comercial (Spinreact). Para realizar este último proceso, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 8.000 Gx durante 10 a 15 minutos (cuando las fases, plasma y células, se separan). Se utilizaron 10 ul del sobrenadante (plasma) para realizar la reacción enzimática, la que fue incubada a T° ambiente por 20 minutos y fuera del contacto con la luz, llevándola finalmente a espectrofotometría a 505nm (Espectrofotómetro UV-VIS Genesys™10, THERMO, precisión 1,0nm). Las medidas fueron registradas al inicio del protocolo de estrés por frío para cada individuo, denominándose nivel de glucosa inicial (Glui) y al finalizar este, medida que corresponde al nivel de glucosa final (Gluf) (una vez transcurridas 4 horas de estrés térmico). Las concentraciones de glucosa fueron expresadas en mg/dL.

5.3. Determinación de la concentración de glicerol:

Esta medida se realizó siguiendo la metodología propuesta por Nowakowska *et al.* (2011), para ello se extrajo 0,1 ml de sangre mediante punción en la vena ventral del individuo, como se describió anteriormente. Las concentraciones de glicerol en plasma sanguíneo fueron testeadas enzimáticamente usando un kit comercial (BioSystems). Para ello las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 8.000 Gx durante 10 a 15 minutos

(cuando las fases se separan), utilizando 10 ul. del sobrenadante (plasma). Para realizar la reacción enzimática, la muestra fue incubada a T° ambiente por 20 minutos y fuera del contacto con la luz, llevándose finalmente a espectrofotometría a 500 nm (Espectrofotómetro UV-VIS Genesys™10, THERMO, precisión 1,0 nm). Las concentraciones de glicerol fueron expresadas en mg/dL. Al igual que con la glucosa, los niveles de glicerol fueron medidos al inicio y término del protocolo de estrés por frío.

Una vez realizadas todas las fases experimentales los animales fueron trasladados a terrarios dispuestos en condiciones ambientales normales y se contempló una salida para efectuar la liberación de los anuros, ya que estos deben ser devueltos a su hábitat original con el fin de preservar la especie y no alterar en demasía la dinámica de poblaciones.

6. **Análisis estadísticos**

Debido al pequeño tamaño de la muestra, solo se utilizaron análisis no paramétricos. De esta manera, para analizar masa y tamaño corporal entre los grupos (5°C, 25°C y T° ambiente), así como los cambios en las respuestas entre tratamientos se utilizó Kruskal - Wallis. Mientras que para determinar la existencia de variaciones en las concentraciones plasmáticas inicial y final, tanto de glicerol como de glucosa en cada uno de los tratamientos de aclimatación y la relación entre descenso de temperatura corporal (T_{cexp}) e incremento de glicerol y/o glucosa plasmática, se utilizó el test estadístico Wilcoxon. Entre los objetivos del presente estudio se encontraba la verificación de los métodos de análisis para la glucosa, por lo cual se utilizó la correlación de Spearman para determinar la correspondencia entre las concentraciones plasmáticas de glucosa obtenidas mediante el glucómetro Accu-Chek Active y el método enzimático.

RESULTADOS

1. Análisis de las variables masa - tamaño corporal.

Al analizar las variables masa y tamaño corporal en los tres grupos de aclimatación, no se detectaron diferencias significativas, para ello se aplicó la prueba estadística no paramétrica Kruskal - Wallis, (ANEXO 2) $X^2 = 1,51$; $P > 0,05$ y $X^2 = 5,035$; $P > 0,05$, respectivamente.

2. Variaciones de los niveles plasmáticos de glicerol.

2.1. Grupos sin someter al protocolo de estrés térmico por frío.

Para determinar la existencia de variaciones en las concentraciones plasmáticas de glicerol (mg/dL), en los tres tratamientos de aclimatación (Figura. 6), los datos obtenidos fueron sometidos al análisis no paramétrico Wilcoxon, el cual indica la ausencia de cambios significativos entre los niveles plasmáticos de glicerol inicial (Gi) y final (Gf) (5°C $Z_{(Gi-Gf)} - 0,119$; $P > 0,05$, 25°C $Z_{(Gi-Gf)} - 0,355$; $P > 0,05$, Temperatura ambiente $Z_{(Gi-Gf)} - 0,834$; $P > 0,05$).

Además se compararon los niveles plasmáticos de Gi y Gf entre los tres tratamientos de aclimatación, para lo cual se aplicó el test no paramétrico Kruskal - Wallis, el que indico la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 1).

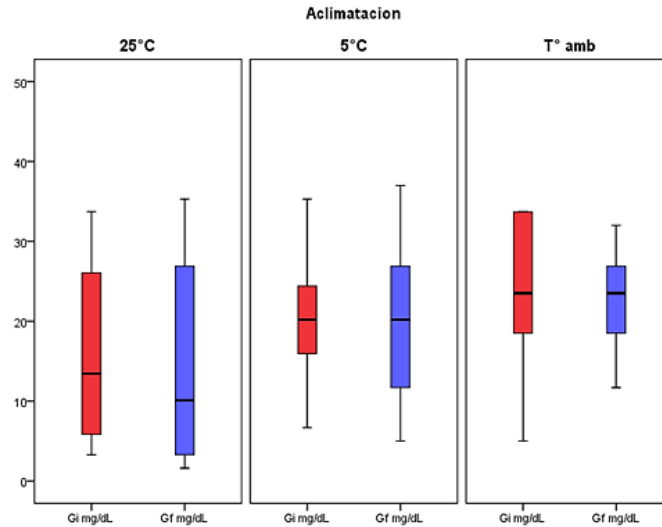


Figura 6: Niveles de glicerol plasmático (mg/dL) en individuos de *P.thaul* sin someter al protocolo de estrés térmico por frío, mantenidos en los tres tratamientos de aclimatación. En rojo concentración inicial (Gi) y en azul concentración final (Gf).

2.2. Grupos sometidos al protocolo de estrés térmico por frío.

Se analizaron las concentraciones plasmáticas de glicerol (mg/dL) antes del tratamiento y post-tratamiento (Figura 7) mediante el análisis estadístico no paramétrico Wilcoxon, el cual indica la ausencia de diferencias significativas entre Gi y Gf (5°C $Z_{(Gi-Gf)}$ -1,103; $P > 0,05$, 25°C $Z_{(Gi-Gf)}$ -1,471; $P > 0,05$, Temperatura ambiente $Z_{(Gi-Gf)}$ -0,9; $P > 0,05$)

En este caso también se aplicó el test no paramétrico Kruskal - Wallis para determinar la existencia de diferencias entre los niveles plasmáticos de Gi y Gf entre los tres tratamientos de aclimatación (5°C, 25°C y T° ambiente), determinándose la ausencia de diferencias significativas (Tabla 1).

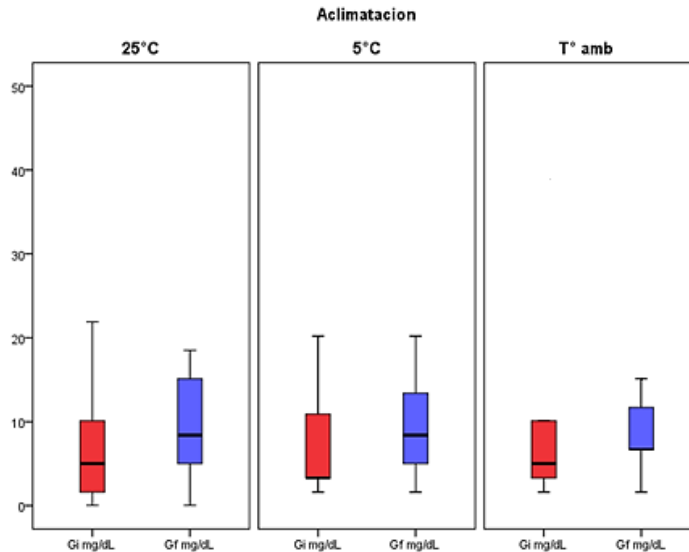


Figura 7: Concentraciones de glicerol plasmático (mg/dL) en individuos de *P.thaul* sometidos al protocolo de estrés térmico por frío. En rojo concentración inicial (Gi) y en azul concentración final (Gf) para los tres tratamientos de aclimatación.

Finalmente, para determinar una relación entre descenso de temperatura corporal (T_{cexp}) e incremento de glicerol plasmático (G) se aplicó el test no paramétrico Wilcoxon, tanto en los individuos mantenidos a 25°C ($Z_{T-G} -1,130$; $P > 0,05$), los mantenidos a 5°C ($Z_{T-G} -3,498$; $P < 0,005$) y aquellos a temperatura ambiente ($Z_{T-G} -0,174$; $P > 0,05$), con lo que se descartó esta relación para los individuos aclimatados a 25°C y T° ambiente, ya que las variaciones no son significativas. Sin embargo, los individuos mantenidos a 5°C presentan una variación significativa en este parámetro, por lo que los individuos aclimatados a menores temperaturas manifiestan un aumento en sus niveles de glicerol plasmático al ser sometidos al protocolo de estrés por frío (Figura 8).

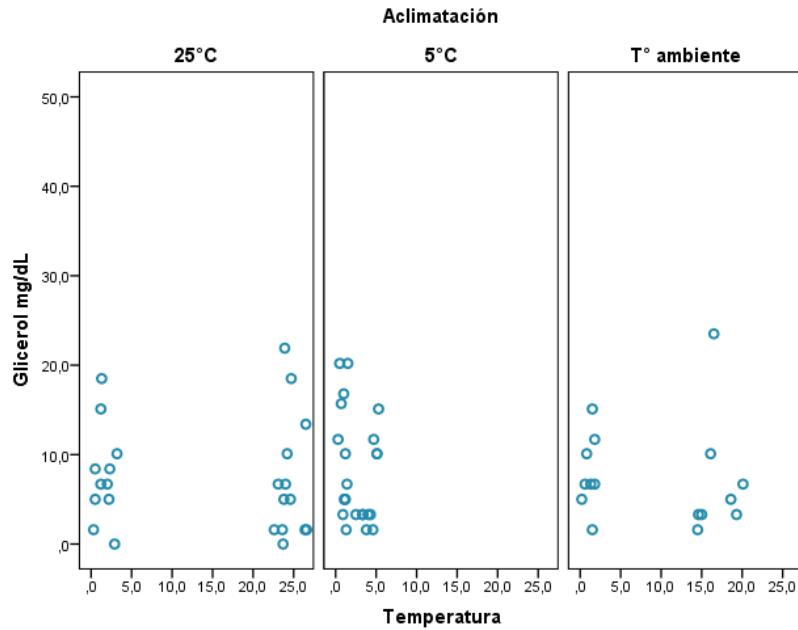


Figura 8: Variaciones en los niveles de glicerol inicial (Gi) (temperatura de aclimatación) y glicerol final (Gf) (temperatura de 0°C) en individuos de *P.thaul* sometidos al protocolo de estrés térmico por frío, en los tres tratamientos aplicados a la muestra.

3. Correlación entre las mediciones de glucosa con el método enzimático Spinreact y glucómetro Accu-Chek Active.

Para determinar la correspondencia entre las concentraciones plasmáticas de glucosa obtenidas mediante la utilización del glucómetro Accu-Chek Active y el método enzimático con el kit comercial Spinreact, se utilizó el Coeficiente de Correlación de Spearman, encontrándose una correlación significativa entre ambas medidas cuando se compararon los niveles iniciales r_s 0,892; $P < 0,001$; los niveles finales r_s 0,966; $P < 0,001$ y las medidas en conjunto r_s 0,936; $P < 0,001$, corroborando que los datos obtenidos con

ambos métodos no presentan diferencias significativas (Figura 9), esto resulta de suma importancia porque avala la utilización del glucómetro, método que puede ser manipulado en terreno y que resulta menos invasivo para los individuos (utiliza un menor volumen sanguíneo).

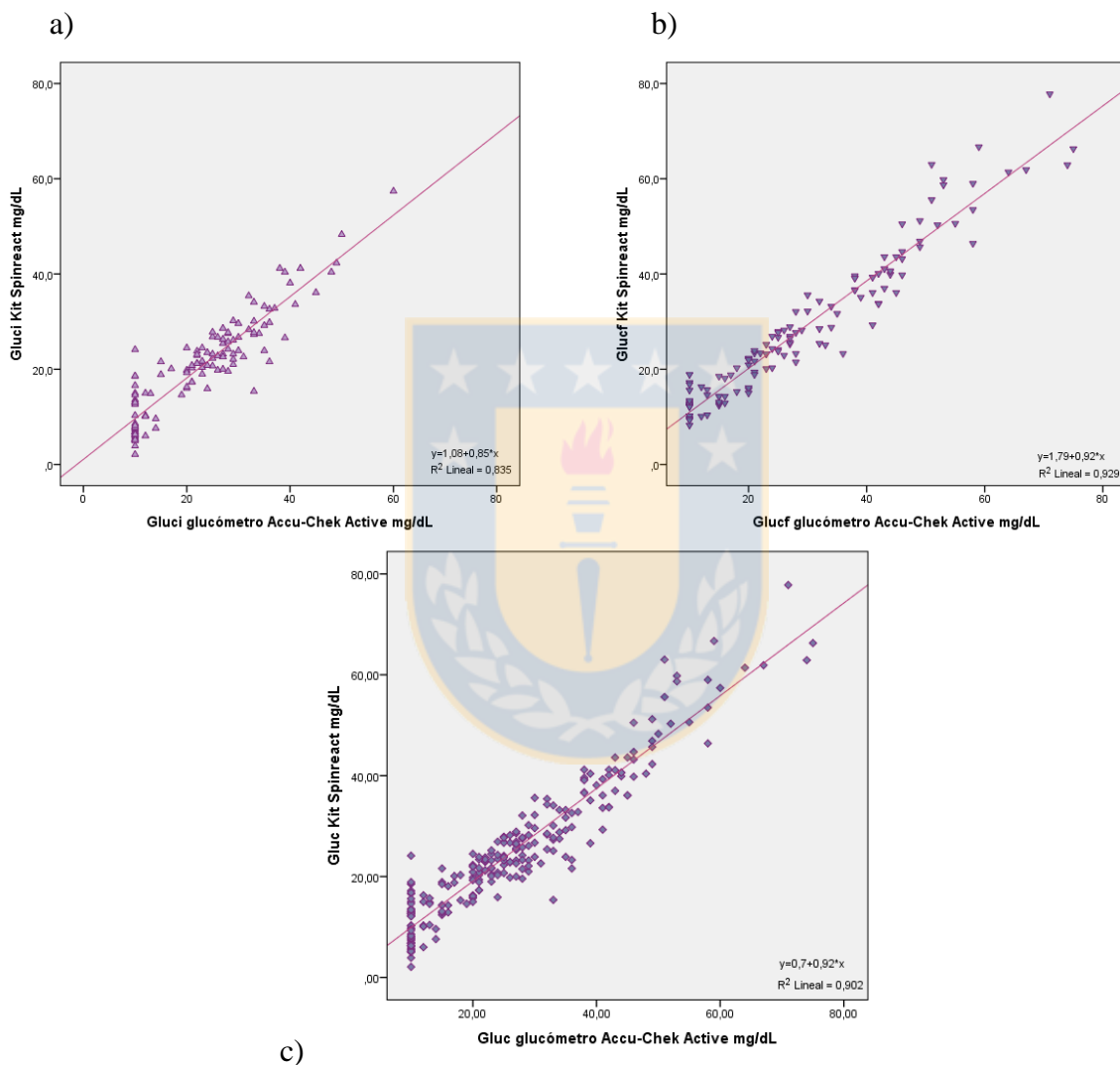


Figura 9: a) Correlación entre los niveles de glucosa plasmática inicial (mg/dL) en todos los tratamientos, medida con el glucómetro Accu-Chek Active y el método enzimático con el kit Spinreact. b) Correlación entre los niveles de glucosa plasmática final (mg/dL) en todos los tratamientos, medida con el glucómetro Accu-Chek Active y el método enzimático con

el kit Spinreact. c) Correlación entre los niveles de glucosa plasmática total (inicial y final) (mg/dL) en todos los tratamientos, medida con el glucómetro Accu-Check Active y el método enzimático con el kit Spinreact.

4. Variaciones de los niveles plasmáticos de glucosa.

4.1. Grupos sin someter al protocolo de estrés térmico por frío.

Para determinar la existencia de variaciones en las concentraciones plasmáticas de glucosa (mg/dL), en los tres tratamientos de aclimatación (Figura. 10), los datos obtenidos fueron sometidos al análisis no paramétrico Wilcoxon, el que indica la ausencia de cambios significativos entre los niveles plasmáticos de glucosa inicial (Glui) y final (Gluf) (5°C $Z_{(Glui-Gluf)} -1,363$; $P > 0,05$, 25°C $Z_{(Glui-Gluf)} -0,086$; $P > 0,05$ y Temperatura ambiente $Z_{(Glui-Gluf)} -0,408$; $P > 0,05$).

Adicionalmente, se compararon los niveles plasmáticos de Glui y Gluf entre los tres tratamientos de aclimatación (5°C, 25°C y T° ambiente), para lo cual se aplicó el test no paramétrico Kruskal - Wallis, el que indico la presencia de diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 1).

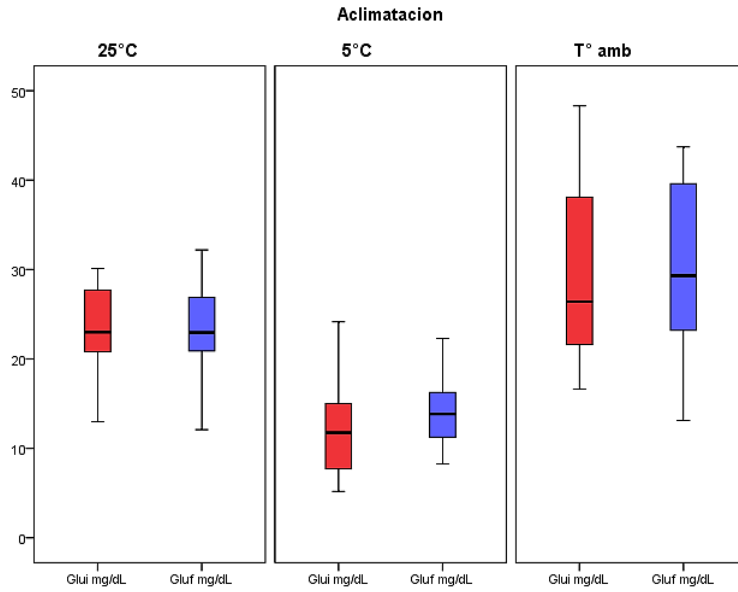


Figura 10: Niveles de glucosa plasmática (mg/dL) inicial (Glui) en rojo y final (Gluf) en azul, en individuos de *P.thaul* sometidos a los tres tratamientos de aclimatación, que no fueron expuestos al protocolo de estrés por frío.

4.2. Grupos sometidos al protocolo de estrés térmico por frío.

Se analizaron las concentraciones plasmáticas de glucosa (mg/dL) antes del tratamiento y post-tratamiento (Figura 11) mediante el análisis estadístico no paramétrico Wilcoxon, el cual confirmó la existencia de diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de Glui y Gluf (5°C $Z_{(Glui-Gluf)} -3,724$; $P < 0,001$, 25°C $Z_{(Glui-Gluf)} -4,458$; $P < 0,001$ y Temperatura ambiente $Z_{(Glui-Gluf)} -3,296$; $P < 0,001$).

Las diferencias que se pueden apreciar gráficamente entre los Glui y los Gluf de los tres tratamientos de aclimatación (5°C, 25°C y T° ambiente), fueron confirmadas mediante el

test no paramétrico Kruskal - Wallis, que indicó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 1).

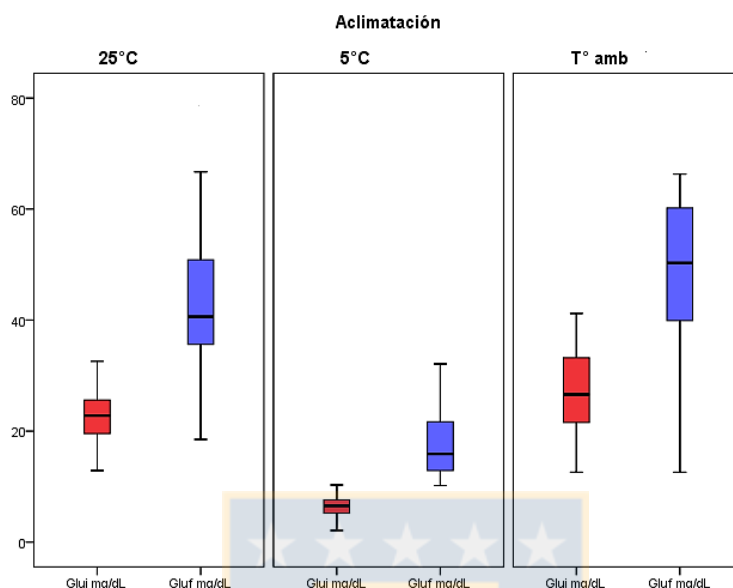


Figura 11: Concentraciones de glucosa plasmática (mg/dL) inicial (Glui) en rojo y final (Gluf) en azul en individuos de *P.thaul* sometido a los tres tratamientos de aclimatación y expuestos al protocolo de estrés por frío.

Finalmente, se encontró concordancia entre el descenso de temperatura y el aumento de glucosa plasmática, en todos los tratamientos de aclimatación (Figura 12), para confirmar esto también se utilizó el test Wilcoxon para el grupo mantenido a 25°C ($Z_{Temp-Gluc} -3,884$; $P < 0,001$), a 5°C ($Z_{Temp-Gluc} -3,662$; $P < 0,001$) y a T° ambiente ($Z_{Temp-Gluc} -4,309$; $P < 0,001$), demostrándose en todos los casos la existencia de diferencias muy significativas. Esto demuestra una relación inversa, en donde las dos variables presentan una alta dependencia, para este caso cuando disminuye la temperatura corporal los niveles de glucosa plasmática aumentan en proporción constante (Figura 12).

Esta correlación negativa es mayor en los individuos aclimatados a 25°C y a T° ambiente; es decir, los niveles de glucosa plasmática aumentaron más en estos grupos cuando fueron sometidos a estrés por frío (0°C). En el grupo aclimatado a 5°C, también se encontró una correlación negativa significativa; sin embargo esta fue menor; es decir, los niveles de glucosa plasmática no aumentaron radicalmente al someter a los individuos a estrés por frío. Con esto queda manifiesto que los individuos son capaces de modificar sus niveles de glucosa plasmáticos entre el inicio del experimento (Temperatura inicial) y el final de este (Temperatura final cercana a 0°C).

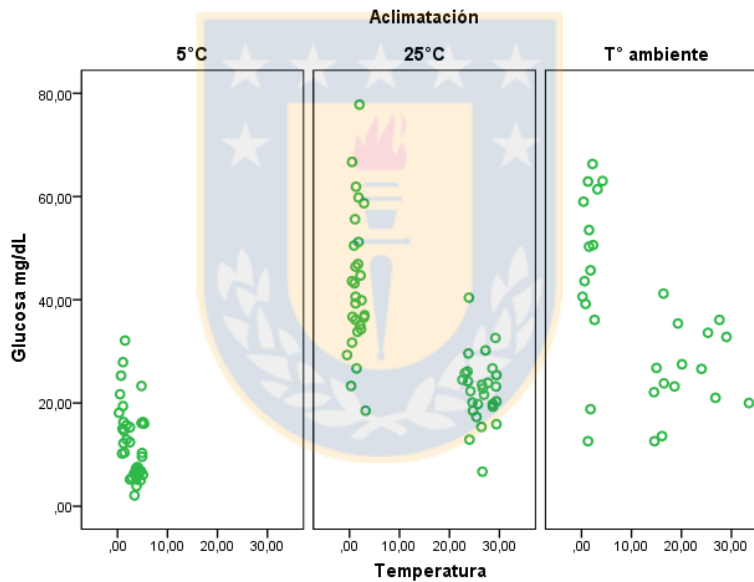


Figura 12: Variaciones en los niveles de glucosa inicial (Glui) (temperatura de aclimatación) y glucosa final (Gluf) (temperatura de 0°C) en individuos de *P.thaul* sometidos al protocolo de estrés térmico por frío, en los tres tratamientos aplicados a la muestra.

Tabla 1: Concentraciones de glicerol y glucosa. Se analizan datos para variaciones de glicerol inicial (Gi) y final (Gf), así como para las variaciones de glucosa inicial (Glui) y final (Gluf) en *Pleurodema thaul*, agrupados por tratamiento (5°C, 25°C y T° ambiente). Valores son dados como media ± DS (desviación estándar). Análisis de test de Wilcoxon para las diferencias en glucosa dentro de cada tratamiento son representados con valor de (Z). Análisis de test de Kruskal-Wallis para comparar las variaciones entre grupos de tratamiento son representados como X² (NS: no significativo, *P <0.05, **P <0.005, ***P <0.001).

			5°C	25°C	T° ambiente	X ²
Sin someter a estrés por frío		Gi	20,32±8,45	15,54±11,05	23,0±10,43	3,070^{NS}
		Gf	20,17±9,40	14,98±12,72	21,67±9,19	2,492^{NS}
	Z		-0,119^{NS}	-0,355^{NS}	-0,834^{NS}	
Sometido a estrés por frío		Gi	7,01±6,04	7,21±6,94	10,42±11,99	0,444^{NS}
		Gf	9,22±5,82	11,5±10,35	10,98±9,93	0,078^{NS}
	Z		-1,103^{NS}	-1,471^{NS}	-0,9^{NS}	
Sin someter a estrés por frío		Glui	12,82± 6,59	23,64±6,26	31,58±11,74	26,883^{***}
		Gluf	14,51±4,82	24,64±6,16	29,19±8,57	26,600^{***}
	Z		-1,363^{NS}	-0,086^{NS}	-0,408^{NS}	
Sometido a estrés por frío		Glui	7,37±3,70	22,55±6,53	26,42±8,23	34,968^{***}
		Gluf	17,72± 6,14	43,07±13,55	46,91±15,84	31,830^{***}
	Z		-3,724^{***}	-4,458^{***}	-3,296^{***}	

DISCUSIÓN

La fisiología térmica de anfibios anuros es una temática que ha sido tratada desde distintas perspectivas como la termorregulación, metabolismo, temperaturas corporales de campo, hibernación, tolerancia al congelamiento, entre otras, existiendo múltiples estudios al respecto (Brattstrom, 1963; Eckert *et al.*, 1991; Angilletta *et al.*, 2002; Sanabria *et al.*, 2003; 2007; Storey & Storey, 2005; Logares & Úbeda, 2006; Angilletta, 2009; Vidal & Labra, 2008, Iturra-Cid *et al.*, 2014). En lo que concierne al tópico de crioprotección, la mayor parte de la literatura se concentra en trabajos realizados en especies de ambientes extremos del Hemisferio Norte, donde destacan los trabajos que abordan los mecanismos de tolerancia al congelamiento en *Rana sylvatica*, *Pseudacris crucifer*, *Pseudacris triseriata* e *Hyla versicolor* (Storey & Storey, 1996; Wells, 2007; Costanzo & Lee, 2013). Sin embargo, en el Hemisferio Sur este tópico ha sido poco estudiado (Felton *et al.*, 2009), aun cuando se han realizado algunas menciones de su presencia (Steiner *et al.*, 2000; Sanabria *et al.*, 2015).

Se sabe que los anuros regulan su temperatura corporal por el equilibrio logrado con las condiciones térmicas del exterior (Pinder *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 2006; Vidal & Labra, 2008); sin embargo, existen algunas especies capaces de habitar ambientes extremos, como grandes altitudes o latitudes, donde las bajas temperaturas, aumento de la frecuencia de heladas, presión atmosférica baja y la alta radiación solar incidente, suponen un difícil entorno térmico para ellos. Aquellos anfibios que explotan tales hábitats presentan características fisiológicas y de comportamiento que reflejan las difíciles condiciones del medio (Navas, 1999), lo que puede resultar en un periodo de actividad reducida y lentitud en los procesos fisiológicos que deben desarrollar, esto dado por la exposición constante a

temperaturas bajo cero (Muir *et al.*, 2014), las que incluso pueden ser diarias (Navas 1996). De aquí la importancia de poseer algún mecanismo que les ayude a la supervivencia invernal, confiriéndole tolerancia a la congelación (Storey & Storey, 1996; 2005).

Pese a la amplia información que ha indicado la existencia de tolerancia a la congelación en diversos taxa animal (Storey & Storey, 1986; 1996; Sinclair *et al.*, 2003; Antony *et al.*, 2016), los mecanismos que permiten a los anfibios tolerar condiciones de congelamiento no se han analizado a cabalidad. En Sudamérica recientemente, Sanabria y colaboradores (2015), indican la posibilidad de que *Rhinella spinulosa* utilice mecanismos de crioprotección, que le permite tolerar las condiciones extremas de sus hábitats, aludiendo a una posible alza en los niveles de glucosa plasmática, sin embargo, esto no ha sido confirmado.

En Chile, los estudios de fisiología térmica en anuros, han indagado en aspectos tales como los límites térmicos de tolerancia, Temperaturas de Selección (Tsel.), Temperaturas Críticas máximas (TCmáx.) y mínimas (TCmin.), Tasas de Calentamiento y Enfriamiento en las especies de *Calyptocephalella gayi*, *Pleurodema thaul*, *P. bufonina*, *Batrachyla taeniata* y *Rhinella spinulosa* (Benavides, 2003; Lambrinos & Kleier, 2003; Iturra - Cid & Ortiz, 2010; Navas *et al.*, 2010; Nova, 2010; Iturra - Cid *et al.*, 2014), quedado excluidos los aspectos de tolerancia al congelamiento y crioprotección. Resulta destacable la reciente información de probables mecanismos de crioprotección en *R. spinulosa* (Sanabria *et al.*, 2015), especie que también se encuentra presente en territorio chileno, lo que abre la posibilidad de que estos mecanismos también se expresen en otras especies que habitan lugares de condiciones climáticas extremas.

Las condiciones climáticas a lo largo de Chile son muy variables (con una amplitud latitudinal de casi 40 grados), haciendo del país un ambiente altamente heterogéneo con diferentes regímenes térmicos (di Castri & Hajek, 1976). En este sentido, *Pleurodema thaul* en la localidad de Antuco, corresponde a una población que se ve enfrentada a temperaturas invernales por bajo los 0°C, lo que la llevaría a la necesidad de establecer un mecanismo de supervivencia (Anguilletta, 2009; Sanabria et al., 2015).

La experimentación realizada mostró que los niveles plasmáticos de glucosa en *P.thaul* aumentan frente al descenso de la temperatura, mientras que los de glicerol se mantienen relativamente constantes, por lo que se reconoce que la glucosa funcionaria como crioprotector, no así el glicerol, dado que no existieron variaciones significativas de este cuando los individuos se sometieron al protocolo de estrés por frío, como se esperaba. Estos resultados tienen que ver con la fácil movilización que presenta la glucosa en el organismo, ya que esta deriva del glucógeno hepático y no necesita una reacción anabólica de síntesis (Storey & Storey, 1986; Costanzo *et al.*, 1993; Jenkins & Swanson, 2005), por lo que se deduce que esta ruta metabólica, es mucho más rápida y eficiente para los individuos.

Dentro de los crioprotectores que se han descrito para anfibios anuros, la presencia de glucosa ha sido reconocida como el más recurrente entre estos organismos (Layne & Lee, 1987, 1995; Costanzo *et al.*, 1992, 1993; Costanzo & Lee, 1994; 2005; Irwin *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 2000; Jenkins & Swanson, 2005; Pinder *et al.*, 1992), encontrándose una relación proporcional inversa; es decir, los niveles de glucosa se incrementan a medida que la temperatura ambiental, y por ende la temperatura corporal, desciende. Estos antecedentes son concordantes con los resultados encontrados en este

estudio para *P. thaul*, dado que frente a la exposición al frío, la población estudiada presenta un aumento en la síntesis de glucosa, no importando la temperatura de aclimatación a la cual se hubiese sometido el grupo de estudio. Lo que corroboraría a la glucosa como la molécula de más fácil acceso metabólico para los anuros, reafirmando su alto reporte literario (Layne & Lee, 1987, 1995; Costanzo *et al.*, 1992, 1993; Costanzo & Lee, 1994; 2005; Irwin *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 2000; Jenkins & Swanson, 2005; Pinder *et al.*, 1992).

Se ha reconocido que la supervivencia a la congelación en *R. sylvatica* está influenciada por distintas variables que incluyen temporada, velocidad de congelación, tiempo de congelación, concentración de crioprotector, etc. (Storey & Storey, 2004). Layne y colaboradores (1998) han reconocido que individuos mantenidos durante un periodo de 13 días a $-2,5^{\circ}\text{C}$ y 2 semanas a $-1,5^{\circ}\text{C}$ han presentado un 100% de supervivencia, sin embargo reconocen que durante la época de otoño-invierno la temperatura letal se registra entre los -5° y -6°C . Para hacer frente a las inclemencias climáticas los individuos incrementan los niveles de glucosa plasmática, los que dependen de la temporada en la cual se encuentren, así durante primavera se ha registrado un aumento de glucosa que va desde los 15-60 mM, mientras que en invierno las alzas pueden ascender a más de 200 mM (Storey & Storey, 2004). Estos datos concuerdan, en parte, con lo encontrado en esta investigación, ya que se registraron alzas de glucosa durante el protocolo de estrés por frío, sin embargo, es cierto que los incrementos registrados para *R. sylvatica* son muchos mayores a los registrados en esta investigación para *P.thaul*, pero debemos recordar que existen múltiples variables que no fueron consideradas y que podrían afectar los resultados

obtenidos, como la temporada, velocidad de congelación e incluso el tiempo de congelación.

La tolerancia a la congelación, sin duda ha evolucionado de un conjunto de capacidades fisiológicas y bioquímicas preexistentes que se encuentran ampliamente presente en los anfibios (Storey & Storey, 2004; Eckert *et al.*, 1991). Estudios realizados para *R. sylvatica* han encontrado que la producción de glucosa se estimula sólo cuando estas ranas comienzan a congelarse (Costanzo *et al.*, 1993; Storey & Storey; 1986, 2004), lo que es consecuente con los cambios en los niveles de glucosa encontrados para *P. thaul*, ya que estos se apreciaron solo en los individuos sometidos al protocolo de estrés por frío, mientras que los individuos no sometidos a este protocolo mantuvieron los niveles de glucosa plasmática con variaciones no significativas.

Al analizar los resultados obtenidos en los grupos por separado se encontró que existe una correspondencia entre el descenso de temperatura y el aumento de glucosa plasmática, la que es mayor en los individuos aclimatados a 25°C y aquellos mantenidos a temperatura ambiente, mientras que los individuos aclimatado a 5°C presentaron un alza en los niveles de glucosa plasmático menor; es decir, los niveles de glucosa plasmática no aumentaron radicalmente al someter a los individuos a estrés por frío. Esta diferencia junto con corroborar la síntesis de glucosa en condiciones de bajas temperaturas, se debería a que los individuos permanecieron durante mucho tiempo en aclimatación (más de un mes) y 5°C es considerado una temperatura critica mínima (Iturra-Cid, 2010), en este sentido solo este grupo genero un alza significativa de glucosa durante las primeras semanas de aclimatación, luego de lo cual los niveles de glucosa plasmática disminuyeron, ya que se estima, basados en Storey & Storey (2005) esta debió ser almacenada en órganos como el

cerebro y corazón, donde la glucosa evitaría el congelamiento a nivel tisular de órganos vitales del individuo (Pinder *et al.*, 1992; Storey & Storey, 2005). Esto sería concordante con lo descrito en otros anuros por Storey & Storey (1986, 2005), ya que la síntesis de glucosa como crioprotector en los anuros deriva del catabolismo de glucógeno hepático y las reservas que se hayan establecido durante el verano y principios del otoño mediante la alimentación.

Se ha determinado que tras la descongelación los organismos son extremadamente hiperglucémicos, superando el umbral renal de reabsorción de glucosa, por lo que esta se excreta en la orina abundantemente, especialmente durante las primeras horas después de la descongelación (Layne *et al.*, 1996). Sin embargo, este recurso no se pierde completamente, porque la glucosa se reabsorbe de manera efectiva desde la vejiga (Costanzo & Lee, 1997) y luego se restablece en forma de glucógeno hepático quedando disponible para ser utilizado en el próximo evento de congelación (Storey & Storey, 1986). Sin embargo, el proceso de eliminación de la glucosa es mucho más lento que el de la síntesis inducida por la congelación y puede tomar más de una semana a 4° C para que la glucosa vuelva a los niveles exhibidos antes del congelamiento (Storey & Storey, 1986), de aquí la importancia de respetar el protocolo experimental que contempla la mantención de una semana, como mínimo, sin experimentación para permitir que los individuos logren retornar a sus condiciones fisiológicas normales.

Estudios anteriores han detectado que la glucosa es el único crioprotector producido por especies como *R. sylvatica*, *P. crucifer* y *P. triseriata*, en donde los niveles plasmáticos de ésta se incrementan al ser expuestos a la congelación invernal (Storey & Storey 1986; 2004). Sin embargo, se sabe también que existen otros crioprotectores que pueden

funcionar en sinergia con la glucosa o excluyendo la presencia de esta (Layne & Lee, 1987; Storey y Storey, 1986, 2004; Layne *et al.*, 1996; Costanzo & Lee, 2005, 2013), por lo que los resultados obtenidos para la glucosa se han debido comparar y relacionar con los resultados obtenidos con el glicerol.

Se sabe que el glicerol actúa como un buen crioprotector en insectos haciendo que sus tejidos comiencen un proceso de deshidratación que evita la congelación, aumentando la concentración de las proteínas y reduciendo la cantidad de agua. Su funcionamiento contribuye a aportar la energía que se libera en el torrente sanguíneo y propiciar la distribución de esta energía facilitando el metabolismo celular (Storey & Storey 1996; 2005). Sin embargo, para el caso de los anfibios no existe gran disponibilidad literaria a la cual recurrir para conocer a cabalidad el funcionamiento de este.

En especies como *Hyla versicolor* el glicerol es el principal crioprotector pero, su funcionamiento es muy diferente al de la glucosa (Layne & Jones, 2001). El glicerol comienza su almacenamiento durante los meses de otoño, cuando las temperaturas comienzan a descender en el ambiente, generando un incremento abrupto de este en el plasma sanguíneo (Layne & Jones, 2001; Storey & Storey, 2005; Costanzo & Lee, 2013), permitiéndole sobrevivir varios días a bajas temperaturas (-6°C) (Storey & Storey, 2005; Layne & Lee, 1987). Esto se podría relacionar con los resultados encontrados, ya que los individuos de *P.thaul* mantenidos a 5°C fueron los únicos que presentaron una correspondencia entre el descenso de temperatura y el aumento de glicerol plasmático, es decir se encontraron cambios significativos entre los niveles de glicerol. Esto tendría que ver con la aclimatación a la cual fue sometida el grupo, ya que 5°C pudo ser reconocido por los individuos como temperaturas otoñales, cuando se genera un gran incremento de

glicerol plasmático y una vez terminado el congelamiento, las concentraciones de glicerol continúan elevadas durante varias semanas (Layne & Lee, 1987; Pinder *et al.*, 1992; Layne & Jones, 2001; Hillman *et al.*, 2009).

Dados estos antecedentes, se reconoce que en los individuos de *P. thaul* provenientes de la localidad de Antuco, la principal molécula de efecto crioprotector debiera ser la glucosa, relegando a un rol secundario al glicerol (Costanzo & Lee, 2013; Layne, 1999).

Es importante destacar que las variables de peso y talla corporal, no afectaron los resultados encontrados en este estudio, por lo que se entiende que las variaciones plasmáticas (inicial- final) encontradas para la glucosa, no estarían siendo influenciadas por estas variables. Sin embargo no se puede descartar que estas variaciones puedan verse influidas por otros factores como el nivel de glucógeno hepático alcanzado antes de comenzar el descenso térmico, lo que en condiciones ambientales normales ocurriría durante los meses de verano-otoño, el sexo de los individuos, lo que en este estudio no se analizó por la escasa cantidad de hembras capturadas y/o actividad reproductiva, ya que cuando los individuos se encuentran activamente reproductivos (momento en el que es más fácil capturarlos), la mayor parte de la energía se deriva a la producción de huevos (principalmente en las hembras) (Iturra-Cid, 2010) que para el caso de *P.thaul* tiene un ciclo casi continuo con actividad gametogénica durante el otoño, el invierno, y la primavera (Díaz-Páez & Ortiz, 2001), lo que claramente influiría en la síntesis de crioprotectores. Sin embargo esto debe ser analizado en futuros estudios.

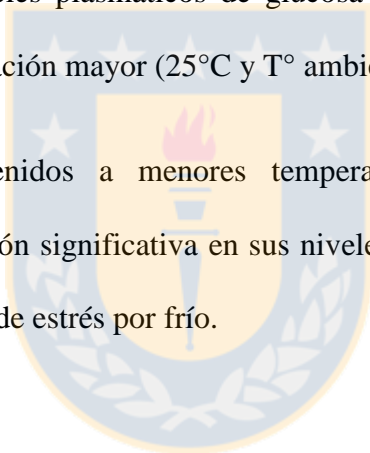
Finalmente se debe realzar que los resultados obtenidos se podrían reafirmar en futuros estudios, para ello queda abierta la invitación a seguir trabajando en esta temática, tal vez

haciendo análisis de tejidos para medir los niveles de glucosa y/o glicerol a nivel celular, lo que debe ser cuidadosamente diseñado, sobre todo en especies de pequeño tamaño corporal como *P.thaul*, ya que la muestra de tejido que se debe extraer podría ser demasiado invasivo para los individuos, atentando con su bienestar e incluso poniendo en peligro su supervivencia. Se podría también modificar el diseño experimental, llevando los individuos a congelación y no solo mantener estrés por frío, es decir, exponerlos a temperaturas inferiores a 0°C. También sería ideal aumentar el tamaño muestral, sin embargo realizar esto es difícil por los requisitos que exige el SAG. Para otorgar los permisos de captura y manipulación de especies.



CONCLUSION

- Se acepta la H₁, ya que la síntesis de moléculas crioprotectoras se activa solo cuando los individuos se enfrentan a periodos de estrés térmico por frío, presentando un incremento en los niveles plasmáticos de estas.
- *P. thaul* utilizaría como principal molécula crioprotectora a la glucosa, relegando a un efecto parcial el glicerol, por lo que también se acepta la H₂.
- Los individuos aclimatados a menores temperaturas (5°C) presentan menores variaciones en los niveles plasmáticos de glucosa que aquellos sometidos a una temperatura de aclimatación mayor (25°C y T° ambiental).
- Los individuos mantenidos a menores temperaturas de aclimatación (5°C) manifiestan una variación significativa en sus niveles de glicerol plasmático, al ser sometidos al protocolo de estrés por frío.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le agradezco a mi familia por su comprensión, paciencia y apoyo en la realización de este trabajo, principalmente a mi hija Konnie y mi pareja Cristian Vásquez quien me acompañó en innumerables ocasiones a limpiar, alimentar y fotografiar a los sapitos mantenidos en el laboratorio. Agradezco la ayuda de familiares, amigos y conocidos durante la ejecución de este trabajo, entre ellos destaco a Claudia Jara, Christopher Ramos, Joan Sandoval y Nicza Alveal, por la ayuda en aplicación del protocolo experimental, el uso de software, la facilitación de información bibliográfica, y por su buena disposición para resolver cualquier problema, Natalie Quiroz, Gonzalo Riquelme y Shalom Yáñez por ayudarme con algunas traducciones.

De forma muy especial quiero agradecer a mi profesor tutor de tesis Dr. Eduardo Tarifeño Silva, por su constante apoyo, correcciones y sugerencias en el desarrollo del escrito y por su gran acogida durante mi estadía en el magister y a mi profesora cotutora Dra. Helen Díaz-Páez por su paciencia, comprensión, constante apoyo y preocupación, así como también, por sus invaluable consejos, observaciones y críticas, las que han sido de suma ayuda tanto académica como personalmente.

LITERATURA CITADA.

Allender M. & Fry M. (2008). “Amphibian Hematology.” *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 11(3), 463-480.

Angilletta, M., Niewiarowski, P. & Navas, C. (2002). “The evolution of thermal physiology in ectotherms.” *Journal of Thermal Biology*. 27(4), 249–268.

Angilletta, M. (2009). “Thermal adaptation a theoretical and empirical synthesis”. Oxford University Press, USA. Pp 289.

Antony, S., Buddle, C. & Sinclair, B. (2016). “Thermal biology and immersion tolerance of the Beringian pseudoscorpion *Wyochernes asiaticus*.” *Polar Biology*. 39(1), 1351-1355

Benavides, G. (2003). “Biología térmica de *Bufo spinulosus*: efecto de la temperatura sobre el desarrollo larval, una comparación intraespecífica”. Tesis de Doctorado, Universidad de Chile.

Benavides, G., Veloso, A., Jimenez, P. & Mendez, M. (2005). “Assimilation efficiency in *Bufo spinulosus* tadpoles (Anura: Bufonidae): effects of temperature, diet quality and geographic origin”. *Revista de Chile de Historia Natural*. 78 (2), 295–302.

Blaustein, A., Hoffman, P., Hokit, D., Kiesecker, J., Walls S. & Hays, J. (1994). "UV repair and resistance to solar UV-B in amphibian eggs: A links to population declines?" Proceedings of the National Academy of Sciences. 91 (5), 1791-1795.

Bradfield, K. (2004). "Photographic identification of individual Archey's Frogs, *Leiopelma archeyi*, from natural markings". DOC Science Internal Series. Department of Conservation, Wellington. N.Z. Pp 36

Brattstrom, B. (1963). "A preliminary review of the thermal requirements of amphibians". Ecology. 44,238–255.

Cei, J.M. (1962). "Batracios de Chile." Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago de Chile. Pp 128 + cviii.

Conaf. (1993). "Documento de Trabajo N° 129: Plan de Manejo Parque Nacional Laguna del Laja". República de Chile, Ministerio de Agricultura, Corporación Nacional Forestal, VIII Región del Bío Bío. Pp. 211.

Conlon, J., Yano, K., Chartrel, N., Vaudry, H. & Storey, K. (1998). "Freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica* is associated with unusual structural features in insulin but not in glucagón." Journal of Molecular Endocrinology. 21, 153–159.

Costanzo, J. & Lee, R. (1994). "Biophysical and Physiological Responses Promoting Freeze Tolerance in Vertebrates." International Union of Physiological Sciences/American Physiological Society. 9(1994), 252-256.

Costanzo, J. & Lee, R. (1997) "Frogs resorb glucose from urinary bladder". Nature,389(6649), 343-344.

Costanzo, J. & Lee, R. (2005). "Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog". The Journal of Experimental Biology. 208(21), 4079-4089.

Costanzo, J. & Lee, R. (2013). "Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates." The Journal of Experimental Biology. 216, 1961-1967.

Costanzo, J., Wright, M. & Lee, R. (1992) "Freeze tolerance as an overwintering adaptation in Copes' grey treefrog (*Hyla chrysoscelis*)", Copeia, 1992(2), 565-569.

Costanzo, J., Lee, R. & Lortz, P. (1993). "Physiological responses of freeze-tolerant and intolerant frogs: clues to evolution of anuran freeze tolerance". American Journal of Physiology. 265(1993), 721-725.

Correa, C., Sallaberry, M., González, B., Soto, E. & Méndez, M. (2007). "Notes on geographic distribution: Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Pleurodema thaul*: Latitudinal and altitudinal distribution extension in Chile." Check List. 3(3), 267-270.

Correa, C., Riveros, E., Lobos, G. & Velásquez, N. (2010) “Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Pleurodema thaul* (Lesson,1827): Altitudinal distribution extensión and new records from its northern range.” Check List.6(1),10-12.

Díaz- Páez, H. &. Ortiz, J. C. (2001). “The reproductive cycle of *Pleurodema thaul* (Anura, Leptodactylidae) in central Chile”. Amphibia- Reptilia. 22 (4), 431-445.

Di Castri, F. & Hajek, E. (1976). “Bioclimatología de Chile”. Ediciones Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Do Amaral, M., Lee, R. & Costanzo, J. (2013) “Enzymatic Regulation of Glycogenolysis in a Subarctic Population of the Wood Frog: Implications for Extreme Freeze Tolerance.” PLoS ONE 8(11): e79169. doi:10.1371/journal.pone.0079169.

Donnelly, M., Guyer, C., Juterbock, J., & Alford, R. (1994). “Techniques for marking amphibians.” Pp. 277–284 in Heyer, W., Donnelly, M., McDiarmid, R., Hayek, L., & Foster M.(eds.): “Measuring and monitoring biological diversity”. Standard methods for amphibians. Washington & London, Smithsonian Institution Press, 364 pp

Duellman W. & Veloso A. (1977). “Phylogeny of *Pleurodema* (Anura: Leptodactylidae): a biogeographic model.” Occasional Papers of the Museum of Natural History, University of Kansas. (64), 1-46.

Dunson, W.A. & Travis, J. (1991). "The role of abiotic factors in community organization". *American Naturalist*. 138 (5), 1067–1091.

Eckert R., Randall, D. & Augustine, G. (1991). "Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones". Interamericana. McGraw-Hill, España. Pp.436.

Edwards, J., Koster, K. & Swanson, D. (2000). "Time course for cryoprotectant synthesis in the freeze-tolerant chorus frog, *Pseudacris triseriata*." *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 125(3), 367–375.

Felton, A., Fischer, J., Lindenmayer, D., Montague-Drake, R., Lowe, A., Saunders, D., Felton, A., Steffen, W., Munro, N., Youngentob, K., Gillen, J., Gibbons, P., Bruzgul, J., Fazey, I., Bond, S., Elliott, C., Macdonald, B., Porfirio, L., Westgate, M. & Worthy, M. (2009). "Climate change, conservation and management: an assessment of the peer-reviewed scientific journal literature." *Biodiversity and Conservation*. 18(8), 2243-2253.

Hill, R., Wise, G. & Anderson, M. (2006). "Fisiología Animal". Editorial Médica Panamericana. España. Pp 1020.

Hillman, S., Withers, P., Drewes, R. & Hillyard, S. (2009). "Ecological and environmental physiology of amphibians." Oxford University Press, USA. Pp 469.

Irwin, J., Costanzo, J. & Lee, R. (1999). "Terrestrial hibernation in the northern cricket frog, *Acris cnepitans*." *Canadian Journal of Zoology*. 77(8), 1240-1246.

Iturra-Cid, M. (2010). “Variación geográfica de la ecología térmica de *Pleurodema thaul* (AMPHIBIA: LEIUPERIDAE) en Chile: adaptación local, potencial evolutivo y consecuencias en un escenario de cambio climático.” Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Zoología, Universidad de Concepción. Pp. 62.

Iturra-Cid, M., Vidal, M., Labra, A. & Ortiz, J.C. (2014). Winter Thermal Ecology Of *Pleurodema thaul* (Amphibia: Leptodactylidae). *Gayana*. 78 (1). 25-30.

Jenkins, J. & Swanson, D. (2005). “Liver glycogen, glucose mobilization and freezing survival in chorus frogs, *Pseudacris triseriata*”. *Journal of Thermal Biology*. 30(6), 485–494.

Kenyon N., Phillott A., & Alford R. (2009). “Evaluation of photographic identification method (PIM) as a tool to identify *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae)”. *Herpetological Conservation and Biology* 4(3), 403–410.

Kenyon N., Phillott A. & Alford R. (2010). “Temporal variation in dorsal patterns of juvenile green-eyed tree frogs, *Litoria genimaculata* (Anura: Hylidae).” *Herpetological Conservation and Biology*. 5(1), 126-131.

Lambrinos, J. & Kleier, C. (2003). “Thermoregulation of juvenile Andean toads (*Bufo spinulosus*) at 4300 m.” *Journal of Thermal Biology*. 28(1), 15-19.

Layne, J. (1999). "Freeze tolerance and cryoprotectant mobilization in the gray treefrog (*Hyla versicolor*).” *Journal of Experimental Zoology*. 283(3):221-5.

Layne, J. & Jones, A. (2001). "Freeze tolerance in the gray treefrog: cryoprotectant mobilization and organ dehydration.” *Journal of Experimental Zoology*. 290(1):1-5.

Layne, J. & Lee, R. (1987). "Freeze tolerance and the dynamics of ice formation in wood frogs (*Rana sylvatica*) from southern Ohio.” *Canadian Journal of Zoology*. 65, 2062-2065.

Layne, J. & Lee, R. (1995). "Adaptations of frogs to survive freezing.” *Climate Research*. 5, 53-59.

Layne, J., Lee, R. & Cutwa, M. (1996) "Post-hibernation excretion of glucose in urine of the freeze tolerant frog *Rana sylvatica*”, *Journal of Herpetology*. 30(1), 85–87.

Layne, J., Costanzo, J. & Lee, R.(1998) "Freeze duration influences postfreeze survival in the frog *Rana sylvatica*.”*Journal of Experimental Zoology*. 280, 197-211.

Logares, R. & Úbeda, C. (2006). "First insights into the overwintering biology of *Alsodes gárgola* frogs and tadpoles inhabiting harsh Andean-Patagonian alpine environments.” *Amphibia-Reptilia*. 27,263-267

Logares, R. (2003). "Aspectos ecofisiológicos de *Alsodes gárgola* Gallardo 1970 (Anura:Leptodactylidae) en ambientes nordpatagónicos de tipo alpino.” Trabajo final para

optar al grado de licenciado en ciencias biológicas, Universidad Nacional del Comahue. Pp. 94.

Luebert, F. & Pliscoff, P. (2006). “Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile”. Primera edición, Editorial Universitaria, Santiago, Chile, Pp. 323.

Muir, A., Biek, R. & Mable, B. (2014). “Behavioural and physiological adaptation to low-temperature environments in the common frog, *Rana temporaria*.” *BMC Evolutionary Biology*. DOI: 10.1186/1471-2148-14-110.

Navas, C. (1996). “Implications of microhabitat selection and patterns of activity on the thermal ecology of high elevation neotropical anurans.” *Oecologia*. 108(4), 617– 626.

Navas, C. (1997). “Thermal extremes at high elevations in the Andes: Physiological ecology of frogs.” *Journal of Thermal Biology*. 22(6), 467-477.

Navas, C. (1999). “Biodiversidad de anfibios y reptiles en el Páramo: una visión ecofisiológica”. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 23(Suplemento especial), 465-474.

Navas, C., Úbeda, C., Logares, R. & Jara, F. (2010). “Thermal tolerances in tadpoles of three species of Patagonian anurans”. *South American Journal of Herpetology* 5, 89-96.

Nowakowska, A., Caputa, M. & Rogalska, J. (2011) “Effects of temperature and photoperiod on glucose, glycerol and glycogen concentrations in *Helix pomatia* Linnaeus, 1758 in spring and autumn.” *Folia Malacologica*. 19(3), 155-163.

Nova, R. (2010). “Proyecciones sobre el estudio de la termofisiología de *Calyptocephalella gayi* en Chile y los impactos del cambio climático”. Tesis de Grado, Universidad del Biobío.

Pinder, A., Storey, K. & Ultsch, G. (1992). “Estivation and hibernation”. En: *Environmental physiology of the amphibians*, Feder, M. & Burggren, W., The University of Chicago Press, Chicago. Pp 250-274.

Sanabria, E., Quiroga, L. & Acosta, J. (2003). “Ecología térmica de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (ANURA: Leptodactylidae) en los Banados de Zonda, San Juan, Argentina.” *Cuadernos de Herpetología*. 17,127–129.

Sanabria, E., Quiroga, L. & Acosta, J. (2007). “*Odontophrynus occidentalis* (NCN). Body temperature.” *Herpetological Review*. 38, 188–189.

Sanabria, E., Rodríguez, C., Vergara, C., Ontivero, E., Banchig, M., Navas, A., Herrera-Morata, M. & Quiroga, L. (2015). “Thermal ecology of the post-metamorphic Andean toad (*Rhinella spinulosa*) at elevation in the monte desert, Argentina.” *Journal of Thermal Biology*. 52, 52-57.

Schmid, W. (1982). "Survival of frogs in low temperatures." *Science*. 215, 697-698.

Sinclair, B., Addo-Bediako, A. & Chown, S. (2003). "Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance." *Biological reviews*. 78, 181-195.

Sommaruga, R. (2001). "The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes." *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*. 62,35-42.

Steiner, A., Petenusci, S., Brentegani, L. & Branco, L. (2000). "The importance of glucose for the freezing tolerance/intolerance of the anuran amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*." *Revista Brasileira de Biología*. 60(2), 321-328.

Storey, K. (1990). "Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation." *Quarterly Review of Biology*. 65, 145-174.

Storey, K. & Storey, J. (1986). "Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles." *Canadian Journal of Zoology*. 64, 49-54.

Storey, K. & Storey, J. (1996). "Natural freezing survival in animals." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 27, 365-386.

Storey, K. & Storey, J. (2001): "Hibernation: Poikilotherms." *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.

Storey, K. & Storey, J.,(2005). "Freeze tolerance." In: Extremophiles (Gerday, C. & Glansdorff, N., eds.) Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK <http://www.eolss.net>.

Tapley B., Acosta-Galvis A. & Lopez J. (2011). "A field method for sampling blood of male anurans with hypertrophied limbs." *Phyllomedusa*. 10(1), 75-77.

Tattersall, G. & Ultsch, G. (2008). "Physiological Ecology of Aquatic Overwintering in Ranid Frogs." *Biological Reviews*. 83, 119-140.

Tejedo, M., Duarte, H., Gutiérrez-Pesquera, L., Beltrán, J., Katzenberger, K., Marangoni, F., Navas, C., Nicieza, A., Relyea, R., Rezende, E., Richter-Boix, A., Santos, M., Simon, M. & Solé, M. (2012). "El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios." *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*. 23(2), 1-27

Templeton, A. (1982). "Adaptation and integration of evolutionary forces". 15-31. In R. Milkman (eds). *Perspectives on evolution*. Sinauer, Sunderland.

Victoriano P., Ortiz J.C., Troncoso L. & Galleguillos R. (1995). "Allozyme variation in populations of *Pleurodema thaul* (Lesson, 1826) (Anura; Leptodactylidae)." *Comparative Biochemistry and Physiology*. 112(B), 487-492.

Vidal, M. & Labra A. (2008). “Herpetología de Chile”. Science Verlag Ediciones. Santiago, Chile. Pp. 594

Wells, K. (2007). “The ecology and behavior of amphibians.” The University of Chicago Press, Chicago and London. Pp 123-156.

PÁGINAS WEB

Listado de especies Clasificadas desde el 1º al 9º proceso de clasificación en Ministerio del Medio ambiente. Recuperado de <http://www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/index2.htm>

Lobos, G., Vidal, M., Labra M., Correa, C., Rabanal, F., Díaz-Páez, H., Alzamora, A. & Soto, C. (2012) “Protocolo para el control de enfermedades infecciosas en Anfibios durante estudios de campo”. En <http://www.herpetologiadechile.cl/index.html>

The UICN Red List of Threatened Species en UICN. Recuperado de <http://www.iucnredlist.org/details/57291/0>

ANEXOS

ANEXO 1: Tabla con datos registrados en terreno al momento de la captura de los individuos. Masa, Largo Hocico-Cloaca (LHC), Niveles de Glucosa plasmática (Glu), Temperatura corporal (Tc) y Temperatura ambiental (Ta). Datos entregados como Media \pm SD (desviación estándar), Rango mínimo (min) y máximo (máx).

Estudio de campo					
N	Masa (g)	LHC (mm)	Glu (mg/dL)	Tc (°C)	Ta (°C)
	Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD
	Rango min-máx	Rango min-máx	Rango min-máx	Rango min-máx	Rango min-máx
24	8,92 \pm 3,17 4,30 / 16,50	36,37 \pm 4,93 30,64 / 45,96	29,33 \pm 13,64 10,00 / 57,00	4,79 \pm 2,71 1,40 / 13,50	12,22 \pm 1,11 11,10 / 14,00

ANEXO 2: Tabla con los datos registrados en laboratorio. Masa y Largo Hocico-Cloaca (LHC) para cada grupo mantenido a diferentes temperaturas de aclimatación (5°C, 25°C y T° ambiente). Datos entregados como Media \pm SD (desviación estándar), Rango mínimo (min) y máximo (máx).

Estadísticos Descriptivos			
	5°C	25°C	T° ambiente
	N=6	N=8	N=6
Replicas por individuo	6	7	5
Masa (g)			
Media \pm SD	5,33 \pm 2,22	4,59 \pm 1,65	5,25 \pm 2,26
Rango min-máx	2,4 / 11,3	1,4 / 7,9	2,6 / 11,6
LHC (mm)			
Media \pm SD	36,40 \pm 4,66	36,08 \pm 3,39	37,96 \pm 3,79
Rango min-máx	28,91 / 46,54	28,35 / 42,25	32,56 / 46,60

ANEXO 3: Niveles de Glicerol plasmático medido enzimáticamente usando un kit comercial BioSystems (G), Glucosa plasmática medida con el glucómetro Accu-Chek Active (Glu) y Glucosa plasmática medida enzimáticamente usando un kit comercial Spinreact (Glue), para cada grupo mantenido a diferentes temperaturas de aclimatación (5°C, 25°C y T° ambiente).

			N° datos	G (mg/dL) Media ± SD Rango min-máx	Glu (mg/dL) Media ± SD Rango min-máx	Glue (mg/dL) Media ± SD Rango min-máx
5°C	Sin someter a estrés por frío	Inicio	N=20	20,32±8,45 6,7-35,3	13,05±6,39 10-36	12,82± 6,59 5,2-29,8
		Final	N=20	20,17±9,40 5,0-37,0	12,65±4,43 10-27	14,51±4,82 8,2-28,9
	Somético a estrés por frío	Inicio	N=18	7,01±6,04 1,6-20,2	11,44±3,28 10-20	7,37±3,70 2,1-16,3
		Final	N=18	9,22±5,82 1,6-20,2	18,50±5,87 10-28	17,72± 6,14 10,2-32,1
25°C	Sin someter a estrés por frío	Inicio	N=26	15,54±11,05 3,3-33,7	25,42±7,26 10-42	23,64±6,26 8,2-41,2
		Final	N=26	14,98±12,72 1,6-35,3	24,96±6,57 10-43	24,64±6,16 9,3-41,1
	Somético a estrés por frío	Inicio	N=28	7,21±6,94 0,0-21,9	24,75±7,09 10-39	22,55±6,53 6,7-40,4
		Final	N=28	11,5±10,35 0,0-32,0	44,61±11,47 15-71	43,07±13,55 18,5-77,8
T° ambiente	Sin someter a estrés por frío	Inicio	N=15	23,0±10,43 5,0-33,7	34,53±13,73 10-60	31,58±11,74 16,6-57,4
		Final	N=15	21,67±9,19 3,3-32,0	48,73±17,94 15-46	29,19±8,57 13,1-40,1
	Somético a estrés por frío	Inicio	N=15	10,42±11,99 1,6-37,0	29,13±10,22 10-45	26,42±8,23 12,6-41,2
		Final	N=15	10,98±9,93 1,6-35,3	48,73±17,94 10-75	46,91±15,84 12,6-66,3