BRAZ TITON JUNIOR

**RELAÇÕES ENTRE ASPECTOS DO BALANÇO
HÍDRICO E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS
ASSOCIADAS À DISTRIBUIÇÃO
GEOGRÁFICA DOS ANUOS BRASILEIROS.**

SÃO PAULO - SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia Geral)

**RELAÇÕES ENTRE ASPECTOS DO BALANÇO
HÍDRICO E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS
ASSOCIADAS À DISTRIBUIÇÃO
GEOGRÁFICA DOS ANUROS BRASILEIROS.**

**RELATIONS BETWEEN WATER BALANCE TRAITS AND
CLIMATIC CONDITIONS ASSOCIATED TO
GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF BRAZILIAN
ANURANS.**

BRAZ TITON JUNIOR

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Universidade de São Paulo - USP - para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área
de Fisiologia Geral).**

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO RIBEIRO GOMES

SÃO PAULO - SP

2015

Titon Jr., Braz

Relações entre aspectos do balanço hídrico e condições climáticas associadas à distribuição geográfica dos anuros brasileiros.

Número de páginas: 97

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

1. Anfíbios 2. Temperatura 3. Desidratação. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

DEDICATÓRIA

Tese de Doutorado – Braz Titon Junior

Dedico esta obra ao que há de mais importante em minha vida:

*Deus, acima de tudo, pela
iluminação na escolha dos
caminhos que me levaram até
aqui, passando ileso em meio a
todas as dificuldades e me
transformando em tudo que sou
agora.*

*Minha família, especialmente aos
meus pais, Cida e Braz, que
sempre me conduziram, até o
momento em que pude caminhar
na vida com minhas próprias
pernas. E a todos meus familiares,
com os quais sempre pude contar
com o apoio.*

*Minha esposa, Stefanny, que mais
do que companheira amorosa,
também é uma amiga em todas as
horas e a pessoa com quem passei
não somente a dividir, mas a
confiar minha vida e meus sonhos.*

*Minha nova família, especialmente
aos meus sogros Luiz e Lúcia, que
me acolheu e me apoiou neste
caminho trilhado.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço de maneira especial ao
meu orientador, Fernando, que
acompanhou e lapidou minha vida
acadêmica desde o início me
ensinando a arte de fazer ciência.*

*Agradeço também aos amigos de
laboratório por todos os momentos
de riso compartilhados e por todo
o apoio nas dificuldades.*

*Agradeço ainda a todos os
funcionários que foram e sempre
serão peças fundamentais nas
pesquisas.*

Este trabalho contou com o apoio das seguintes instituições:

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP:
Bolsa de Doutorado (2010/16804-3)*

*Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia Geral) –
Instituto de Biociências – USP.*

Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências – USP.

SUMÁRIO:

Resumo	01
Abstract	02

INTRODUÇÃO GERAL:

Aspectos do balanço hídrico de anuros	04
Biomass brasileiros como modelo no estudo da evolução do balanço hídrico em anuros	13
Apresentação e estruturação da tese	14
Referências Bibliográficas	16

CAPÍTULO I: *Relações entre balanço hídrico e variáveis climáticas associadas à distribuição geográfica em anuros.*

Resumo	30
Abstract	31
Introdução	32
Materiais e Métodos	34
Resultados	41
Discussão	42
Referências Bibliográficas	48
Figuras	54
Tabelas	55

CAPÍTULO II: *Poderiam ser as diferenças em distribuição geográfica em sapos associadas a variações fisiológicas?*

Resumo	61
Abstract	62
Introdução	63
Materiais e Métodos	66
Resultados	74
Discussão	78
Referências Bibliográficas	83
Figuras	88
Tabelas	90
Conclusões	94
Anexos	97

Resumo: Anfíbios anuros, de uma forma geral, são caracterizados por baixa resistência cutânea à perda de água por evaporação, altas taxas de reidratação a partir da pele e alta tolerância à desidratação. Entretanto, diferenças interespecíficas destes parâmetros do balanço hídrico podem estar associadas a características ambientais das áreas de ocorrência. No Brasil, encontramos biomas com características climáticas contrastantes e uma rica anurofauna, consistindo em um modelo interessante para o estudo da evolução do balanço hídrico em anuros. Através de uma abordagem comparativa, este estudo testou as hipóteses de que, quando comparadas às espécies de anuros que habitam ambientes mais méxicos, espécies de ambientes mais xéricos deveriam apresentar: (1) maior resistência à perda de água por evaporação, (2) maior taxa de reidratação, (3) menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação e (4) maior sensibilidade do desempenho locomotor à temperaturas mais baixas e menor sensibilidade deste a temperaturas mais altas. As taxas de reidratação e a resistência da pele à perda de água por evaporação apresentaram relação alométrica respectivamente positiva e negativa com a massa corpórea, indicando a evolução de mecanismos compensatórios das modificações das relações entre área de superfície e volume corpóreo com a variação de tamanho. Anuros de ambientes caracterizados por maior restrição em disponibilidade hídrica e temperaturas mais altas apresentaram maiores taxas de reidratação, menor sensibilidade do desempenho locomotor a temperaturas mais altas e maior sensibilidade deste a temperaturas mais baixas, indicando padrões de adaptação fisiológica a características ambientais. A variação em sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação apresentou padrões mais complexos de relação com variáveis ambientais, sendo esta relação dependente dos ambientes e grupos filogenéticos amostrados.

Palavras chave: anfíbios, temperatura, nível de precipitação, desempenho locomotor, reidratação, tolerância à desidratação, resistência à perda de água por evaporação.

Abstract: Anuran amphibians, in general, are characterized by low skin resistance to evaporative water loss, high rates of hydration through the skin and high tolerance to dehydration. However, interspecific differences of these water balance traits can be related to environmental characteristics of the areas of occurrence. In Brazil, there are biomes with contrasting climatic conditions and rich anuran fauna, which constitute an interesting model for studies on water balance evolution in anurans. Through a comparative approach, this study tested the hypotheses that, when compared to anuran species that inhabit more mesic environments, species from xeric environments should show: (1) increased resistance to evaporative water loss, (2) higher rates of rehydration, (3) low sensitivity of locomotor performance to dehydration and (4) increased sensitivity of the locomotor performance at lower temperatures and lower sensitivity of it at higher temperatures. Rehydration rates and skin resistance to evaporative water loss showed, respectively, positive and negative allometric relations with body mass, indicating the evolution of compensatory mechanisms to changes in the relationship between surface area and volume with body size variation. Anurans from environments characterized by higher restriction in water availability and higher temperatures had higher rates of hydration, lower sensitivity of locomotor performance at higher temperatures and higher sensitivity of it at lower temperatures, indicating patterns of physiologic adaptation to environmental characteristics. The variation in sensitivity of the locomotor performance to dehydration showed more complex relation patterns with environmental variables. These relations were dependent on the environments and phylogenetic groups sampled.

Keywords: amphibians, temperature, precipitation, locomotor performance, rehydration, tolerance to dehydration, resistance to evaporative water loss.

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos do balanço hídrico de anuros

Com a evolução de organismos multicelulares cada vez mais complexos, assegurar proteção contra riscos mecânicos, químicos e radioativos e, ao mesmo tempo, manter uma interação com o ambiente, permitindo a troca energética e de outros materiais, se tornou um dos principais dilemas evolutivos (Chuong *et al.* 2002). Assim, o tegumento evoluiu com uma grande diversidade de propriedades mecânicas, múltiplas vias de difusão e barreiras seletivas para determinadas substâncias. Mesmo com toda a diversidade existente nestas estruturas, aspectos funcionais básicos em comum e pontos de convergência podem ser observados (Lillywhite 2006). Apesar da evolução de conjuntos de caracteres que tornaram o tegumento cada vez menos permeável ter ocorrido em diversos grupos filogenéticos em resposta às pressões seletivas associadas à invasão de ambientes terrestres e cada vez mais secos, a evaporação ainda é uma das principais rotas de perda de água juntamente com a excreção (McNab 2002, Lillywhite 2006). Vale destacar que em alguns grupos, como os anfíbios, a alta permeabilidade cutânea permanece uma característica geral, não impedindo a ocupação de ambientes áridos por estes e até mesmo possibilitando adaptações como altas taxas de absorção de água cutânea a partir do substrato úmido. Outras adaptações fundamentais associadas à economia de água em ambiente terrestre foram a mudança da amônia para ureia e ácido úrico como produtos de excretas nitrogenadas e a capacidade de controle do volume excretado, seja por redução drástica das taxas de filtração glomerular, como nos tetrápodes não-endotérmicos, ou através do advento da capacidade de produzir urina osmoticamente mais concentrada que o plasma, nos endotérmicos (McNab 2002).

O componente estrutural prevalente na composição do tegumento de todo vertebrado é a queratina (McNab 2002), a qual já era encontrada 400 milhões de anos atrás em células epiteliais de lampreias (McLaughlin & Dayhoff 1969). Durante a evolução dos vertebrados, o surgimento de processos de queratinização mais elaborados permitiu a adaptação à hábitos de

vida anfíbios e eventualmente terrestres (Lillywhite 2006). Aproximadamente 100 milhões de anos mais tarde, a formação de um extrato córneo evolui nos anfíbios (Matoltsy & Bereiter-Hahn 1986). Entretanto, uma barreira mais eficiente à perda de água surgiu a cerca de 300 milhões de anos com a produção de lipídeos, além do muco, como componente da matriz celular e nos espaços intercelulares (Matoltsy & Bereiter-Hahn 1986, Lillywhite 2006). Essa característica evoluiu independentemente em répteis, aves, mamíferos (Maderson 2003, Maderson & Alibardi 2000, Menon & Menon 2000) e anfíbios (Lillywhite & Mittal 1999).

Para os anfíbios, de uma forma generalizada, as taxas de perda de água por evaporação são particularmente elevadas chegando a valores até 50 vezes maiores do que os observados para lagartos de massa corpórea equivalente (Thorson 1955, Claussen 1969, Wygoda 1984). Nesse grupo a respiração cutânea é muito representativa e exige uma pele úmida e permeável para as trocas gasosas acarretando, dessa forma, nessas taxas de perda de água relativamente altas quando comparadas a outros tetrápodes (McNab 2002). Entretanto, altas resistências já foram registradas em espécies pontuais de diferentes gêneros como *Litoria*, *Hyperolius*, *Chiromantis* e *Phyllomedusa* (Withers *et al.* 1982, 1984, Wygoda 1984). Estas espécies chamaram a atenção por apresentarem níveis de resistência à perda de água por evaporação comparáveis àquelas observadas em répteis adaptados à vida em desertos, e foram chamadas de “anfíbios a prova d’água” (Christian & Parry 1997, Lillywhite *et al.* 1997).

Os mecanismos pelos quais os anfíbios à prova d’água reduzem suas taxas de perda de água por evaporação são bem elucidados para os gêneros *Phyllomedusa* e *Litoria* (Shoemaker *et al.* 1992), onde um elaborado comportamento de espalhar uma secreção lipídica sobre a superfície do corpo (*wiping behavior*) foi inicialmente descrito (Blaylock *et al.* 1976). Primeiro, o animal seleciona um local onde pode passar uma grande quantidade de tempo imóvel, e, com movimentos estereotipados, espalha os lipídeos secretados por glândulas cutâneas. Estes lipídeos são compostos principalmente por uma mistura complexa de ceras,

triglicerídeos, ácidos graxos livres, hidrocarbonetos e colesterol. Assim, a alta resistência à perda de água por evaporação destes animais resulta da integração de aspectos comportamentais e fisiológicos (McClanahan *et al.* 1978, Withers *et al.* 1984). Já para os gêneros *Chiromantis* e *Hyperolius* esses mecanismos não são muito claros, uma vez que eles não apresentam glândulas de lipídeos (Shoemaker *et al.* 1992). Ambos os gêneros apresentam camadas de iridóforos bem desenvolvidas, que se supõe ajudar a diminuir o movimento da água, uma vez que essas estruturas apresentam maior concentração na região dorsal do que na ventral que é muito mais permeável (Drewes *et al.* 1977, Withers *et al.* 1982, Kobelt & Linsenmair 1986). Além disso, no gênero *Chiromantis*, cortes do estrato córneo analisados no microscópio eletrônico revelaram uma camada diferenciada de aproximadamente 0,2 μm que não é observada nem na região pélvica (não considerada à prova de água nesse gênero) nem em regiões dorsais de outras espécie do gênero *Bufo*, *Rana* e *Phyllomedusa*. Apesar desta camada não ter sua composição química determinada, ela aparenta contribuir com a resistência à perda de água por evaporação devido às suas características morfológicas (Shoemaker *et al.* 1992).

Embora alguns estudos tenham mostrado que uma co-ossificação de determinadas regiões do corpo confere grande aumento da resistência à perda de água, esse aumento se dá somente para regiões específicas. Dessa forma, a eficiência na conservação de água depende de uma associação com um comportamento de busca de algum tipo de abrigo que proteja as demais regiões do corpo contra a perda de água (Seibert *et al.* 1974, Ruibal & Shoemaker 1984, Navas *et al.* 2002, Jared *et al.* 2005). Além disso, um tegumento espesso e altamente queratinizado não parece ter sido selecionado ao longo da evolução dos anfíbios, uma vez que a camada de queratina na pele dos anuros é muito pequena (Lillywhite 2006). Assim, a secreção de lipídeos parece ser uma das principais adaptações para a redução da perda de água. Essa estratégia não é exclusividade dos anuros a prova de água e já foi observada,

juntamente com o comportamento de espalhamento desses lipídeos, para outros anfíbios que apresentam certa resistência a perda de água por evaporação (Blaylock *et al.* 1976, McClanahan *et al.* 1978, Lillywhite *et al.* 1997, Barbeau & Lillywhite 2005). Essa resistência à perda evaporativa de água apresenta grande variação interespecífica em anuros, a qual vem sendo associada aos hábitos das espécies. Anuros com hábito arbóreo, em geral, apresentam uma maior resistência à perda de água quando comparados a espécies terrestres e aquáticas (Whithers *et al.* 1984, Wygoda 1984, Young *et al.* 2005).

Apesar da espessura da pele por si só não ser o principal mecanismo para reduzir a perda evaporativa de água em anfíbios, a produção periódica de "cocoons" (casulos), em alguns táxons, é uma exceção a esta generalização (Lillywhite 2006). Algumas espécies com o hábito de se enterrar produzem esses casulos durante as estações mais secas, estando essa estratégia, na maioria dos casos, associada ainda à estivação (Shoemaker *et al.* 1992). Estes casulos recobrem todo o corpo do animal, com exceção das narinas na maioria dos casos, e podem ser constituídos por até cerca de 60 camadas de células do estrato cornificado, com lipídios e materiais proteicos secretados e impressados entre elas (McClanahan *et al.* 1976, Ruibal & Hillman 1981, Withers 1995, Christian & Parry 1997). Estes casulos conferem uma considerável resistência à passagem de água, permitindo que estas espécies estabeleçam-se a profundidades mais rasas durante a seca quando comparadas a espécies que não produzem casulos, as quais necessitam se aprofundar conforme o solo ao seu redor vai secando (Lee & Mercer 1967, Ruibal & Hillman 1981, McClanahan *et al.* 1983, Withers 1998).

Vale ressaltar que entre as adaptações morfológicas e fisiológicas que evoluíram em direção à economia de água nos anuros, os efeitos maximizados são observados quando estas adaptações estão associadas a ajustes comportamentais. Assim, para as espécies que não apresentam essas adaptações, a única forma de evitar a perda excessiva de água é através de adaptações comportamentais (Wells 2007). Os hábitos noturnos (Stille 1952, Cree 1989,

Haddad 1995, Navas *et al.* 2007) e a limitação das atividades a micro-habitats úmidos e/ou em estações mais úmidas (Martof 1953, Dole 1965, Stewart 1985, Sinsch 1988, Cree 1989, Winokur & Hillyard 1992, Tracy *et al.* 1993, Tingley & Shine 2011) parecem ter sido amplamente selecionados entre os anuros no contexto da economia de água. Adicionalmente à seleção de micro-habitats de atividade, a procura por abrigos também representa uma importante via comportamental para economia de água (Zug & Zug 1979, Schwarzkopf & Alford 1996, Wells 2007). Em um estudo realizado com *R. marina*, por exemplo, foi observada uma preferência por abrigos diferentes conforme as estações do ano (Seebacher & Alford 2002), sendo que nas estações mais secas predominou o uso de troncos de árvores como abrigo, uma das alternativas de abrigos com menores temperaturas durante esta estação. Nas estações mais úmidas, os indivíduos usaram a vegetação mais densa como abrigo preferencial, que, entre os abrigos, teve as temperaturas mais altas durante esta estação (Seebacher & Alford 2002). Estes resultados corroboram o estudo de Malvin & Wood (1991), onde indivíduos desta mesma espécie tendem a buscar microambientes com temperaturas mais amenas em condições mais secas em testes realizados em laboratório. Além disso, o estudo realizado por Tingley & Shine (2011) mostrou que os indivíduos de *R. marina* minimizam os riscos de desidratação se movendo somente quando as condições hídricas permitem. Esta movimentação ocorre diariamente durante as chuvas, juntamente à preferência pela movimentação em linha reta em busca de corpos de água permanentes. Com o cessar das chuvas, indivíduos que se encontram longe de corpos de água param de se locomover e somente indivíduos próximos a esses corpos mantêm locomoção diária significativa (Tingley & Shine 2011).

Em lagartos, a correlação entre taxas de perda de água por evaporação e a disponibilidade hídrica do ambiente é muito clara, sendo que espécies que habitam áreas mais xéricas apresentam menores taxas de desidratação quando comparadas a espécies que habitam

áreas mais métricas (Bentley & Schmidt-Nielsen 1966, Prange & Schmidt-Nielsen 1969, Elick & Sealander 1972, Hillman *et al.* 1979). Entretanto, para os anfíbios, a maior parte dos estudos não encontrou nenhuma relação entre a perda de água e o ambiente (Littleford *et al.* 1947, Thorson 1955, Ray 1958, Schmid 1965, Spight 1968, Claussen 1969, Heatwole *et al.* 1969), enquanto poucos autores demonstraram que espécies que vivem em ambientes aquáticos ou mais métricos, apresentam uma maior taxa de desidratação quando comparados a espécies de ambientes terrestres ou mais xéricos (Cohen 1952, Warburg 1965, Gehlbach *et al.* 1969). Essa dificuldade em se encontrar algum padrão pode estar ligada, em parte, ao baixo número de espécies comparadas em cada estudo e/ou à falta de controle para as relações filogenéticas entre elas. Adicionalmente, a compilação dos dados desses diferentes estudos é muito difícil, uma vez que as taxas de evaporação foram avaliadas em condições muito variáveis, dificultando assim uma análise comparativa dos dados (Warburg 1971, McNab 2002).

A manutenção do volume e concentração osmótica dos fluidos corpóreos relativamente constantes é fundamental para a homeostase (McNab 2002), portanto, além de evitar a perda de água, a capacidade de absorver água do ambiente também é de vital importância na manutenção do balanço hídrico (Shoemaker *et al.* 1992). Nos anuros, a captação de água do ambiente se dá principalmente através da mancha pélvica, uma região especializada da pele ventral caracterizada por alta permeabilidade e rica vascularização (Roth 1973, Boutilier *et al.* 1992). Com a desidratação, o hormônio arginina vasotocina (AVT) é liberado pela neuro-hipófise, causando o aumento da permeabilidade tanto da pele, principalmente na mancha pélvica, quanto da parede da bexiga urinária, que funciona como um órgão de armazenamento de água. O AVT também age nos rins diminuindo a taxa de filtração glomerular (Bentley 1966, Yorio & Bentley 1977). Assim, a diminuição da pressão oncótica do fluido intersticial, dada pela entrada de água através da pele da mancha pélvica, associada à redução de pressão

hidrostática capilar devido ao efeito vasodilatador do AVT, favorece o fluxo de água do espaço intersticial diretamente para o sangue além de manter um gradiente osmótico favorável à absorção de água pela mancha pélvica (Word & Hillman 2005).

O movimento de água através de epitélios ocorre principalmente por via transcelular (Guo *et al.* 2003, Orce *et al.* 2004), através de estruturas características chamadas aquaporinas (Agre *et al.* 1993). Nos anuros encontramos seis tipos de aquaporinas, sendo as do tipo 1, 2, 3 e 5 também encontradas em mamíferos, enquanto as do tipo 1a e 2a são exclusivas desse grupo (Suzuki *et al.* 2007). Entre elas, as aquaporinas do tipo 1 são expressas nos endotélios capilares de diversos tecidos, incluindo a mancha pélvica e bexiga urinária, provavelmente mediando o movimento de água tanto da bexiga para o restante do corpo quanto do interstício da mancha pélvica para a circulação sanguínea (Hasegawa *et al.* 2003, Suzuki *et al.* 2007). Já as do tipo 1a e 2a são expressas caracteristicamente nas células epiteliais da mancha pélvica e da bexiga urinária, respectivamente (Hasegawa *et al.* 2005, Suzuki *et al.* 2007). No modelo descrito para *Hyla japonica*, o AVT, liberado quando o animal está desidratado, se liga a um receptor na membrana basolateral das células epiteliais da mancha pélvica ativando uma cascata de sinalização intracelular, aumentando tanto a permeabilidade da mancha pélvica quanto a da bexiga urinária. Em curto prazo, essa sinalização intracelular promove a translocação de vesículas citoplasmáticas, que armazenam aquaporinas do tipo 2a, para a membrana apical da célula, aumentando a densidade dessas aquaporinas na membrana. Em longo prazo, estimula a transcrição de RNAm para essas aquaporinas (Suzuki *et al.* 2007).

Assim como o observado nos estudos envolvendo as taxas de desidratação, a correlação das taxas de reidratação com o hábitat também aponta para direções variadas (McNab 2002). Alguns estudos sugerem que as taxas de reidratação são maiores em espécies de hábito terrestre ou que vivem em ambientes mais áridos quando comparadas a espécies de hábito aquático ou que vivem em ambientes mais úmidos (Cohen 1952, Main & Bentley 1964,

Schmid 1965, Dumas 1966, Spight 1967, Warburg 1971, Christensen 1974, van Berkum *et al.* 1982). Outros autores não encontraram nenhum tipo de correlação entre as taxas de reidratação e a disponibilidade hídrica ambiental (Thorson 1955, Bentley *et al.* 1958, Gehlbach *et al.* 1969, Claussen 1969, McClanahan & Baldwin 1969, Fair 1970). Um fator que pode estar influenciando nessa divergência de resultados é o pequeno número de espécies utilizadas nesses estudos, ou ainda a pequena diferença entre os habitats comparados.

Quando a reidratação não é suficiente para suprir as perdas de água e os estoques da bexiga urinária são esvaziados, a única forma de sobrevivência dos anfíbios é através da tolerância à desidratação (Shoemaker *et al.* 1992). A habilidade de tolerar a perda de água é muito variável entre os anuros, porém, encontra-se associada a alguns fatores como o hábito, onde espécies terrestres e fossoriais apresentam uma maior tolerância quando comparadas a espécies aquáticas (Thorson & Svihla 1943). Esta também está relacionada a diferenças de tamanho corpóreo, sejam essas ontogenéticas ou filogenéticas, onde espécimes menores toleram uma perda de água proporcionalmente maior que espécimes maiores (Geise & Linsenmair 1988).

A desidratação causa um declínio do volume plasmático com um concomitante aumento do hematócrito, da concentração de solutos plasmáticos e da pressão coloidosmótica (Hillman 1978, 1980, 1982, 1984, Hillman *et al.* 1987). Com isso, observa-se um aumento da resistência periférica, como resultado do aumento da viscosidade sanguínea e do grau de vasoconstrição, e conjunto com uma redução do débito cardíaco (Hillman 1978, 1987). Esse quadro de hiperosmolaridade, hipovolemia e hiperviscosidade do sangue pode resultar, em casos extremos de desidratação, na morte do indivíduo através da inabilidade de sustentar o metabolismo basal (Hillman 1987).

A tolerância à desidratação é geralmente definida como a porcentagem de massa corpórea perdida na qual os animais perdem a capacidade de ajuste postural quando colocados

com o dorso em contato com um substrato. Sabe-se também que a desidratação afeta claramente a capacidade de contração muscular, locomoção e outras atividades aeróbicas (Beuchat *et al.* 1984, Gatten 1987, Gatten & Clark 1989, Hillman 1982, 1984, 1987, McClanahan 1964, Moore & Gatten 1989). Adicionalmente, anuros com maior massa ventricular em relação ao tamanho corpóreo tendem a ser mais tolerantes à desidratação do que anuros com menores ventrículos. Possivelmente, o maior volume sistólico decorrente da maior massa ventricular relativa permite uma maior manutenção do débito cardíaco em estado desidratado (Hillman *et al.* 2000, Wells 2007). Como a capacidade aeróbia de anuros também parece estar limitada pelo débito cardíaco (Withers & Hillman 1988), esta correlação também sugere que espécies que apresentam maior desempenho de exercício vocal e/ou locomotor aerobiamente sustentado (Pough *et al.* 1992) apresentariam uma maior vantagem na exploração de ambientes caracterizados por maior desafio hídrico em comparação a espécies aerobiamente menos ativas (Hillman *et al.* 2000).

Como a locomoção representa um aspecto fundamental para diversos comportamentos de claro valor adaptativo, tais como captura de alimentos, fuga de predadores, dispersão pós-metamórfica e busca de parceiros reprodutivos, a tolerância à desidratação estimada através do seu efeito sobre a habilidade locomotora representa uma forte correlação ecológica para estes animais (Dole *et al.* 1985, Rose *et al.* 1986, Moore & Gatten 1989). Assim, diversos estudos têm avaliado os efeitos do nível de hidratação, bem como efeitos sinérgicos entre desidratação e temperatura, sobre o desempenho locomotor em anuros. Estes têm mostrando que, em geral, o desempenho de animais com maiores níveis de hidratação aumenta proporcionalmente ao aumento da temperatura, enquanto o desempenho máximo de animais desidratados muda em direção a temperaturas mais baixas (Preest & Pough 1989, Beuchat *et al.* 1984, Rogowitz *et al.* 1999, Titon *et al.* 2010). Entre esses, podemos observar ainda um padrão geral em que espécies encontradas em ambientes mais quentes e xéricos apresentam

uma menor sensibilidade da locomoção à desidratação em temperaturas mais altas quando comparadas a espécies de ambientes mais úmidos e florestados (Beuchat *et al.* 1984, Rogowitz *et al.* 1999, Titon *et al.* 2010).

Biomass brasileiros como modelo no estudo da evolução do balanço hídrico em anuros

O Brasil é um país com uma enorme área territorial, abarcando biomas muito distintos quanto às suas características climáticas, e abrigado ainda uma anurofauna rica e em muitos casos com um alto grau de endemismo. O Cerrado, por exemplo, é um dos maiores domínios vegetacionais do Brasil, e foi classificado recentemente entre os 25 hotspots terrestres mais importantes do mundo (Myers *et al.* 2000). Nas décadas passadas, esse bioma foi extremamente perturbado, sendo possivelmente o trecho de savana tropical mais ameaçado do mundo (Ratter *et al.* 1998, Silva & Bates 2002). Embora este bioma apresente características próprias quando comparadas às de outros biomas, uma grande variação geográfica pode ser encontrada dentro de seu domínio. A precipitação anual pode variar de 600mm a 800mm, com uma estação seca que pode durar entre sete a oito meses no limite com a Caatinga e de 2.000mm a 2.200mm, com seca inferior a três meses na interface com a Amazônia. (Adámoli *et al.* 1986, Assad & Evangelista 1994).

A Mata Atlântica, por outro lado, abriga cerca 322 espécies de anuros, sendo 300 destas endêmicas (Duellman 1999). Este bioma cobria originalmente 12% do território nacional, mas sua área se encontra ameaçadoramente reduzida pela ação humana a menos de 5% da cobertura original, distribuída em pequenos fragmentos. (SOS Mata Atlântica & INPE 1993, SOS Mata Atlântica 1998). Assim como o Cerrado, a Mata Atlântica também apresenta características peculiares a diferentes localidades, com temperaturas médias de 18°C e um clima quente e úmido com uma precipitação anual variando entre 2000mm a mais de 4000mm

e ausência de estação seca na Floresta Atlântica Ombrófila, mas com a presença de uma estação mais seca entre Abril e Setembro na Floresta Atlântica Semidecídua (Walsh 1996, Morellato *et al.* 2000, Oliveira-Filho & Fontes 2000).

O domínio das Caatingas abrange cerca de 9% do território nacional, sendo composto pelo ambiente semiárido brasileiro e caracterizado por altas temperaturas (médias entre 26°C e 28°C) e nível de precipitação baixo (de 300mm a 800mm anuais) e imprevisível, podendo apresentar períodos de secas contínuas de até mais de 2 anos (Souza Reis 1976, INMET 1990, Rodrigues 2000). Porém, apesar de características abióticas tão extremas quando comparadas as de outros biomas brasileiros, apresenta uma herpetofauna relativamente vasta, contando com cerca de 50 espécies de anuros (Rodrigues 2000).

Assim, as características contrastantes desses biomas e a grande variação interespecífica das respostas fisiológicas dos anfíbios frente aos desafios hídricos representam um sistema ideal para estudos comparativos das relações entre aspectos do balanço hídrico e distribuição geográfica em anuros, contribuindo para o conhecimento sobre a fauna desses biomas e os argumentos para a sua conservação. Entretanto, é importante não se perder de vista que padrões de distribuição podem não representar apenas o reflexo de restrições e adaptações fisiológicas às características abióticas, mas também de uma complexa interação destas com aspectos comportamentais e de história de vida, bem como do histórico das diferentes regiões, das linhagens que as habitam e de suas interações ecológicas (Duellman 1999).

Apresentação e estruturação da tese

Os estudos discutidos até aqui trazem vários indícios de possíveis padrões de variação interespecífica de caracteres fisiológicos associados ao balanço hídrico e a distribuição geográfica das espécies. Porém, nenhum desses estudos comparativos traz um grande número de espécies ou algum tipo de controle filogenético das diferenças encontradas. Quando o

fazem, exploram somente as relações da diversidade fisiológica com o hábito das espécies, e não com aspectos climáticos derivados de sua distribuição geográfica. Adicionalmente, como já mencionado, a grande diversidade de métodos aplicados dificulta uma análise conjunta dos achados dos diferentes estudos. Assim, o passo inicial de um estudo mais completo teve início com o projeto realizado durante o mestrado, o qual contou com 17 espécies de diferentes grupos habitando áreas de Cerrado e Mata Atlântica (Titon 2010).

As análises iniciais dos dados do Mestrado não mostraram diferenças nos parâmetros fisiológicos relacionados ao balanço hídrico quando as espécies destes dois biomas foram comparadas. Porém, esta análise inicial foi caracterizada por uma grande dificuldade gerada pela categorização de habitat. Entre estas espécies, existiam muitas que se distribuíam entre os dois biomas, poucas com uma distribuição geográfica restrita a um deles, e outras com uma distribuição ainda mais ampla que os limites dos biomas incluídos no estudo. Adicionalmente, a inclusão de diferentes grupos filogenéticos de anuros aparentou mascarar possíveis correlações, uma vez que certa sobreposição entre filogenia e o hábito das diferentes espécies foi observada. Assim, surgiu a ideia de focar os esforços para a tese de doutorado em um grupo filogenético específico, os Bufonídeos, e de adicionar a este estudo a investigação dos efeitos da temperatura sobre a locomoção, por se tratar de outro fator importante na determinação de padrões de distribuição de riqueza de espécies (Hawkins *et al.* 2003, Currie *et al.* 2004, Buckley & Jetz 2007).

No decorrer da coleta de dados do doutorado, novas propostas filogenéticas com estimativa de tempos de divergência para grandes grupos de anuros foram publicadas (Maciel *et al.* 2010, Pyron 2014). Além disso, investimentos foram realizados no sentido de caracterizar as áreas de distribuição geográfica das espécies estudadas de forma quantitativa, através da extração de informações climáticas associadas a estas distribuições. Essas novidades, associadas à complementação de alguns dados fisiológicos para Bufonídeos que

ocorrem na Mata Atlântica e no Cerrado, permitiram uma análise mais sólida dos dados incluídos originalmente na dissertação de mestrado, resultando no Capítulo 1 da presente tese. Adicionalmente, a inclusão de espécies de Bufonídeos que ocorrem em um ambiente xérico, as Caatingas, em oposição às demais espécies que ocorrem no Cerrado e na Mata Atlântica, permitiu a investigação de possíveis padrões evolutivos de variáveis relacionadas ao balanço hídrico e aos efeitos da temperatura dentro do grupo dos Bufonídeos. Esses padrões serão apresentados e discutidos no Capítulo 2.

Referências Bibliográficas

- Adámoli J, Macedo J, Azevedo LG, Madeira Neto J (1986). Caracterização da região dos cerrados *In*: Goedert WJ (ed). Solos dos cerrados tecnologias e estratégias de manejo. Nobel, São Paulo. Pp 33-74.
- Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S (1993). Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol* 265:F463-F476.
- Assad ED, Evangelista BA (1994). Análise freqüencial da precipitação pluviométrica. *In*: Assad ED (ed). Chuvas nos Cerrados: análise e espacialização. Brasília. Pp. 25-42.
- Barbeau TR, Lillywhite HB (2005). Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hyloid tree frogs of Florida. *J Exp Biol* 208:2147-2156.
- Bentley PJ, Schmidt-Nielsen K (1966). Cutaneous water loss in reptiles. *Science* 151:1547-49.
- Bentley PJ, (1966). The physiology of the urinary bladder of Amphibia. *Biol Rev* 41:275-316.
- Bentley PJ, Lee AK, Main AR (1958). Comparison of dehydration and hydration of two genera of frogs (*Heleioporus* and *Neobatrachus*) that live in areas of varying aridity. *J Exp Biol* 35:667-684.

- Blaylock LA, Ruibal R, Platt-Aloia K (1976). Skin structure and wiping behavior of Phyllomedusinae frogs. *Copeia* 1976:283-295.
- Boutilier RG, Stiffler DF, Toews DP (1992). Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians. *In*: Feder ME, Burggren WW (eds). *Environmental Physiology of the Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago. Pp 81-124.
- Buckley L, Jetz BW (2007). Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. *Proc R Soc B* 274:1167-1173.
- Christensen CU (1974). Effect of arterial perfusion on net water flux and active sodium transport across the isolated skin of *Bufo bufo bufo* (L.). *J Comp Physiol* 93:93-104.
- Christian K, Parry D (1997). Reduced rates of water loss and chemical properties of skin secretions of the frogs *Litoria caerulea* and *Cyclorana australis*. *Aust J Zool* 45:13-20.
- Chuong C M, Nickoloff BJ, Elias PM, Goldsmith LA, Macher E, Maderson PA, Sundberg JP, Tagami H, Plonka PM, Thestrup-Pedersen K, Bernard BA, Schröder JM, Dotto P, Chang CM, Williams ML, Feingold KR, King LE, Kligman AM, Rees JL, Christophers E (2002). What is the 'true' function of skin? *Experimental Dermatology* 11:159-187.
- Claussen DL (1969). Studies on water loss and rehydration in anurans. *Physiol Zool* 42:1-14.
- Cohen NW (1952). Comparative rates of dehydration and hydration in some California salamanders. *Ecology* 33:462-79.
- Cree A (1989). Relationship between environmental conditions and nocturnal activity of the terrestrial frog, *Leiopelma archeyi*. *J Herpetol* 23:61-68.
- Currie D J, Mittelbach GG, Cornell HV, Field R, Guégan JF, Hawkins BA, Kaufman DM, Kerr JT, Oberdorff T, O'Brien E, Turner JRG (2004). Predictions and tests of climate-based hypotheses of broad-scale variation in taxonomic richness. *Ecol Lett* 7:1121-1134.

- Dole JW (1965). Spatial relations in natural populations of the leopard frog, *Rana pipiens* Schreber in northern Michigan. *Am Midl Nat* 74:464-78.
- Dole JW, Rose BB, Baxter CF (1985). Hyperosmotic saline environment alters feeding behavior in the western toad, *Bufo boreas*. *Copeia* 1985:645-648.
- Drewes, RC, Hillman SS, Putnam RW, Sokol OM (1977). Water, nitrogen and ion balance in the African treefrog *Chiromantis petersi* Boulenger (Anura: Rhacophoridae), with comments on the structure of the integument. *J Comp Physiol* 116:257-67.
- Duellman WE (1999). Distribution patterns of amphibians in South America. *In*: Duellman WE (ed). *Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective*. The John Hopkins University Press, Baltimore. Pp 255-328.
- Dumas PC (1966). Studies of the *Rana* species complex in the Pacific Northwest. *Copeia* 1966:60-74.
- Elick GE, Sealander JA (1972). Comparative water loss in relation to habitat selection in small colubrid snakes. *Am Midl Nat* 88:429-439.
- Fair, JW (1970). Comparative rates of rehydration from soil in two species of toads, *Bufo boreas* and *Bufo punctatus*. *Comp Biochem Physiol* 34:281-87.
- Gatten Jr RE (1987). Activity metabolism of anuran amphibians: tolerance to dehydration. *Physiol Zool* 60:576-85.
- Gatten Jr RE, Clark RM (1989). Locomotor performance of hydrated and dehydrated frogs: Recovery following exhaustive exercise. *Copeia* 1989:451-55.
- Gehlbach FR, Kimmel JR, Weems WA (1969). Aggregations and body water relations in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) from the Grand Canyon rims, Arizona. *Physiol Zool* 42:173-82.
- Geise W, Linsenmair KE (1988). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. IV. Ecological significance of

- water economy with comments on thermoregulation and energy allocation. *Oecologia* 77:327-338.
- Guo P, Hillyard SD, Fu BM (2003). A two-barrier compartment model for volume flow across amphibian skin. *Am J Physiol-Reg I* 285:R1384-R13894.
- Haddad CFB (1995). Comunicação em anuros. *An Etol* 13:116-132.
- Hasegawa T, Tanii H, Suzuki M, Tanaka S (2003). Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin- dependent water-channel aquaporins, AQP-h2
- Hasegawa T, Suzuki M, Tanaka S (2005). Immunocytochemical studies on translocation of phosphorylated aquaporin-h2 protein in granular cells of the frog urinary bladder before and after stimulation with vasotocin. *Cell Tissue Res* 322:407-515.
- Hawkins BA, Field R, Cornell HV, Currie DJ, Guégan JF, Kaufman DM, Kerr JT, Mittelbach GG, Oberdorff T, O'Brien EM, Porter EE, Turner JRG (2003). Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology* 84:3105-3117.
- Heatwole HF, Torres F, Austin SB, Heatwole A (1969). Studies on anuran water balance. I. Dynamics of evaporative water loss by the coqui, *Eleutherodactylus portoricensis*. *Comp Biochem Physiol* 28:245–269.
- Hillman SS (1978). The roles of oxygen delivery and electrolyte levels in the dehydrational death of *Xenopus laevis*. *J Comp Physiol B* 128:169-175.
- Hillman SS (1980). The effect of anemia on metabolic performance in the frog, *Rana pipiens*. *J Exp Zool* 211:107-111.
- Hillman SS (1982). The effects of in vivo and in vitro hyperosmolality on skeletal muscle performance in the amphibians *Rana pipiens* and *Scaphiopus couchii*. *Comp Biochem Physiol A* 73:709-712.
- Hillman SS (1984). Inotropic influence of dehydration and hyperosmolal solutions on amphibian cardiac muscle. *J Comp Physiol B* 154:325-328.

- Hillman SS (1987). Dehydrational effects on cardiovascular and metabolic capacity in two amphibians. *Physiol Zool* 60:608-613.
- Hillman SS, Gorman GC, Thomas R (1979). Water loss in *Anolis* lizards: Evidence for acclimation and intraspecific differences along a habitat gradient. *Comp Biochem Physiol A* 62:491-494.
- Hillman SS, Zygmunt A, Baustian M (1987). Transcapillary fluid forces during dehydration in two amphibians. *Physiol Zool* 60:339-45.
- Hillman SS, Withers PC, Drewes RC (2000). Correlation of ventricle mass and dehydration tolerance in amphibians. *Herpetologica* 56:413-420.
- INMET (1990). Normas Climatológicas 1961–1990. INMET, Brasília, Brazil.
- Jared C, Antoniazzi MM, Navas CA, Katchburian E, Freymuller E, Tambourgi DV, Rodrigues MT (2005). Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*. *J Zool Lond* 265:1-8.
- Kobelt F, Linsenmair KE (1986). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. I. The skin of *Hyperolius viridiflavus nitidulus* in wet and dry season conditions. *Oecologia* 68:533-541.
- Lee AK, Mercer EH (1967). Cocoon surrounding desert-dwelling frogs. *Science* 157:87-88.
- Lillywhite HB, Mittal AK (1999). Amphibian skin and the aquatic-terrestrial transition: constraints and compromises related to water exchange. *In*: Mittal AK, Eddy FB, Datta-Munshi JS (eds). *Water/Air Transition in Biology*. Oxford and IBH, New Delhi. Pp 131-144.
- Lillywhite HB (2006). Water relations of tetrapod integument. *J Exp Biol* 209:202-226.
- Lillywhite HB, Mittal AK, Garg TK, Agrawal N (1997). Integumentary structure and its relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *J Zool Lond* 243:675-687.

- Littleford RA, Keller WF, Phillips NW (1947). Studies on the vital limits of water loss in the plethodontid salamanders. *Ecology* 28:440-447.
- Maciel NM, Collevatti RG, Colli GR, Schwartz EF (2010). Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Mol Phylogenet Evol* 57:787-797.
- Maderson PFA, Alibardi L (2000). The development of the sauropsid integument: A contribution to the problem of the origin and evolution of feathers. *Am Zool* 40:513-529.
- Maderson PFA (2003). Mammalian skin evolution: a reevaluation. *Exp Dermatol* 12:233-236.
- Main AR, Bentley PJ (1964). Water relations of Australian burrowing frogs and tree frogs. *Ecology* 45:379-382.
- Malvin GM, Wood SC (1991). Behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*: Effects of air humidity. *J Exp Biol* 258(3): 322-326.
- Martof BS (1953). Territoriality in the green frog, *Rana clamitans*. *Ecology* 34:165-75.
- Matoltsy AG, Bereiter-Hahn J (1986). Introduction. *In: Biology of the Integument - 2 - Vertebrates*. Bereiter-Hahn J, Matoltsy AG, Richards KS (eds). Springer-Verlag, Berlin. Pp. 1-7.
- McClanahan LL (1964). Osmotic tolerance of the muscles of two desert inhabiting toads, *Bufo cognatus* and *Scaphiopus couchi*. *Comp Biochem Physiol* 12:501-8.
- McClanahan LL, Baldwin R (1969). Rate of water uptake through the integument of the desert toad *Bufo punctatus*. *Comp Biochem Physiol* 28:381-89.
- McClanahan LL, Shoemaker VH, Ruibal R (1976). Structure and function of the cocoon of a ceratophryd frog. *Copeia* 1976:176-185.
- McClanahan LL, Stinner JN, Shoemaker VH (1978). Skin lipids, water loss, and energy metabolism in a South American tree frog (*Phyllomedusa sauvagei*). *Physiol Zool* 51:179-87.

- McClanahan LL, Ruibal R, Shoemaker VH (1983). Rate of cocoon formation and its physiological correlates in a ceratophryd frog. *Physiol Zool* 56:430-435.
- McLaughlin PJ, Dayhoff MO (1969). Evolution of species and proteins. *In*: Dayhoff MO (ed). *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Vol. 4. National Biomedical Research Foundatio, Washington, DC. Pp. 39.
- McNab BK (2002). *The Physiological Ecology of Vertebrates: A View From Energetics*. Cornell University Press, New York. 576 pp.
- Menon GK, Menon J (2000). Avian epidermal lipids: Functional considerations and relationship to feathering. *Am Zool* 40:540-552.
- Moore FR, Gatten Jr RE (1989). Locomotor performance of hydrated, dehydrated and osmotically stressed anuran amphibians. *Herpetologica* 45:101-110.
- Morellato LPC, Talora DC, Takahasi A, Bencke CC, Romera EC, Zipparro VB (2000). Phenology of Atlantic Rain Forest Trees: A Comparative Study. *Biotropica* 32(4b):811-823.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403:853-858.
- Navas CA, Jared C, Antoniazzi MM (2002). Water economy in the casque-headed tree-frog *Corythomantis greening* (Hylidae): role of behaviour, skin and skull skin co-ossification. *J Zool* 257:525-532.
- Navas CA, Antoniazzi MM, Carvalho J E, Suzuki H, Jared C (2007). Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosus* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. *Comp Biochem Physiol* 147:647-657.
- Oliveira-Filho O, Fontes MAL (2000). Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* 32:793-810.

- Orce G, Castillo G, Chanampa Y, Bellomio A (2004). Permeability to water in a tight epithelium: possible modulating action of gap junctions. *Can J Physiol Pharm* 82:417-421.
- Pough FH, Magnusson WE, Ryan MJ, Wells KD, Taigen TL (1992). Behavioral energetic. *In*: Feder ME, Burggren WW (eds.). *Environmental Physiology of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago. Pp. 395-436.
- Prange HD, Schmidt-Nielsen K (1969). Evaporative water loss in snakes. *Comp Biochem Physiol* 28:973-975.
- Preest MR, Pough FH (1989). Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. *Func Ecol* 3:693-699.
- Pyron RA (2014). Biogeographic analysis reveals ancient continental vicariance and recent oceanic dispersal in amphibians. *Syst Biol* 0(0):1-19.
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S (1998). The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann Bot* 80:223-230.
- Ray C (1958). Vital limits and rates of dessication in salamanders. *Ecology* 39:75-83.
- Trefaut-Rodrigues M (2000). A fauna de répteis e anfíbios das Caatingas. Paper Presented at the Conference “Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga”. Petrolina, Brazil, pp. 1–12.
- Rogowitz GL, Cortes-Rivera M, Nieves-Puigdoller K (1999). Water loss, cutaneous resistance, and effects of dehydration on locomotion of *Eleutherodactylus* frogs. *J Comp Physiol B* 169:179-186.
- Rose BB, Baxter CF, Dole JW, Tachiki KH, Baldwin RA (1986). Abnormal feeding behavior of western toads (*Bufo boreas*) kept in a hyperosmotic environment. I. A quantitative

- behavioral analysis as related to cerebral aminoacid concentration. *Pharmacol Biochem Be.* 24:1315-1321.
- Roth JJ (1973). Vascular supply to the ventral pelvic region of anurans as related to water balance. *J Morphol* 140:443-460.
- Ruibal R, Hillman SS (1981). Cocoon structure and function in the burrowing hyliid frog, *Pternohyla fodiens*. *J Herpetol* 15:403-408.
- Ruibal R, Shoemaker VH (1984). Osteoderms in anurans. *J Herpetol* 18:313-328.
- Schmid WD (1965). Some aspects of the water economies of nine species of amphibians. *Ecology* 46:261-269.
- Schwarzkopf L, Alford RA (1996). Dessication and shelter-site use in a tropical amphibian: comparing toads with physical models. *Funct Ecol* 10:193-200.
- Seebacher F, Alford RS (2002). Shelter microhabitats determine body temperature and dehydration rates of a terrestrial amphibian (*Bufo marinus*). *J Herpetol* 36:69-75.
- Seibert EA, Lillywhite HB, Wassersug RJ (1974). Cranial coossification in frogs: relationship to rate of evaporative water loss. *Physiol Zool* 47:261-265.
- Shoemaker VH, Hillman SS, Hillyard SD, Jackson DC, McClanahan LL, Withers PC, Wygoda ML (1992). Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. *In: Feder ME, Burggren WW (eds.). Environmental Physiology of Amphibians.* University of Chicago Press, Chicago. Pp. 125-150.
- Silva JM, Bates JM (2002). Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a Tropical savanna hotspot. *BioScience* 52:225-233.
- Sinsch U (1988). Seasonal changes in the migratory behaviour of the toad *Bufo bufo*: Direction and magnitude of movements. *Oecologia* 76:390-398.
- SOS Mata Atlântica, INPE (1993). Evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica. Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo, Brasil.

- SOS Mata Atlântica (1998). Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, Brasil.
- Souza Reis ACD (1976). Climate of Caatinga. An Acad Bras Cienc 48:325-335.
- Spight TM (1967). The water economy of salamanders: Water uptake after dehydration. Comp Biochem Physiol 20:767-71.
- Spight TM (1968). The water economy of salamanders: evaporative water loss. Physiol Zool 41:195-203.
- Stewart MM (1985) Arboreal habitat use and parachuting by a subtropical forest frog. J Herpetol 19:391-401.
- Stille WT (1952). The nocturnal amphibian fauna of the southern Lake Michigan beach. Ecology 33:149-62.
- Suzuki M, Hasegawa T, Ogushi Y, Tanaka S (2007). Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: A Review. Comp Biochem Physiol A 148:72–81.
- Thorson TB, Svihla A (1943). Correlation of the habitats of amphibians with their ability to survive the loss of body water. Ecology. 24:374-381.
- Thorson TB (1955). The relationship of water economy to terrestriality in amphibians. Physiol Zool 36:100-116.
- Tingley R, Shine R (2011). Desiccation risk drives the spatial ecology of an invasive anuran (*Rhinella marina*) in the Australian semi-desert. PLoS One 6(10):e25979.
- Titon BJ (2010). Balanço Hídrico e Desempenho Locomotor em Espécies de Anuros de Mata Atlântica e Cerrado. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

- Titon Jr B, Navas CA, Jim J, Gomes FR (2010). Water balance and locomotor performance in three species of neotropical toads that differ in geographical distribution. *Comp Biochem Physiol A* 156:129-135.
- Tracy RC, Christian KA, O'Connor MP, Tracy CE (1993). Behavioral thermoregulation by *Bufo americanus*: the importance of the hydric environment. *Herpetol.* 49:375-382.
- van Berkum FH, Pough FH, Stewart MM, Brussard, PF (1982). Altitudinal and interspecific differences in the rehydration abilities of Puerto Rican frogs (*Eleutherodactylus*). *Physiol Zool* 55:130-136.
- Walsh RPD (1996). The climate. *In*: Richards PW(Ed.). The tropical rain forest: an ecological study. Cambridge University Press, Cambridge, England. Pp. 159-205.
- Warburg MR (1965). Studies on the water economy of some Australian frogs. *Aust J Zool* 13:317-330.
- Warburg MR (1971). On the water economy of Israel amphibians: The anurans. *Comp Biochem Physiol A* 40:911-924.
- Wells KD (2007). Water Relations. *In*: Wells KD (ed.). The Ecology and Behaviour of Amphibians. The University of Chicago Press, Chicago. Pp. 82-121.
- Winokur RM, Hillyard SD (1992). Pelvic cutaneous musculature in toads of the genus *Bufo*. *Copeia* 1992:760-69.
- Withers PC, Hillman SS (1988). A steady-state model of maximal oxygen and carbon dioxide transport in anuran amphibians *J Appl Physiol* 64:860-868.
- Withers PC (1995). Cocoon formation and the structure in the aestivating Australian desert frogs, *Neobatrachus* and *Cyclorana*. *Aust J Zool* 43:429-441.
- Withers PC (1998). Evaporative water loss and the role of cocoon formation in Australian frogs. *Aust J Zool* 46:405-418.

- Withers PC, Hillman SS, Drewes RC, Sokal OM (1982). Water loss and nitrogen excretion in sharpnosed reed frogs (*Hyperolius nasutus*. Anura, Hyperoliidae). J Exp Biol 97:335-343.
- Withers PC, Hillman SS, Drewes RC (1984). Evaporative water loss and skin lipids of anuran amphibians. J Exp Zool 232:11-17.
- Word JM, Hillman SS (2005). Osmotically absorbed water preferentially enters the cutaneous capillaries of the pelvic patch in the toad *Bufo marinus*. Physiol Biochem Zool 78(1):40-47.
- Wygodá ML (1984). Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. Physiol Zool 57:329-337.
- Yorio T, Bentley PJ (1977). Asymmetrical permeability of the integument of tree frogs (Hylidae). J Exp Biol 67:197-204.
- Young JE, Christian KA, Donnellan S, Tracy CR, Parry D (2005). Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. Physiol Biochem Zool 78(5):847-856.
- Zug GR, Zug PB (1979). The marine toad, *Bufo marinus*: A natural history resume of native populations. Smithsonian Contrib Zool 284:1-58.

CAPÍTULO I

**Relações entre balanço hídrico e variáveis climáticas associadas à
distribuição geográfica em anuros.**

**Relationship between water balance and climatic variables associated with
geographical distribution of anurans.**

Braz Titon Junior¹ e Fernando Ribeiro Gomes¹

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo: A riqueza de espécies de anfíbios cresce em direção ao equador, particularmente em florestas tropicais úmidas. Essa relação entre a riqueza de espécies de anfíbios e a disponibilidade hídrica ambiental tem sido relacionada com a sua alta taxa de perda de água por evaporação, expondo esses animais a um alto risco de desidratação em ambientes terrestres. Portanto, alguns aspectos do balanço hídrico dos anuros como a resistência à perda de água por evaporação (RPAE), a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação (SDLD), e as taxas de reidratação (TR) devem variar juntamente com as características climáticas associadas às diferenças interespecíficas de distribuição geográfica. Foi realizado um estudo comparativo de características associadas ao balanço hídrico (RPAE, SDLD e TR) em 17 espécies de anuros cuja distribuição geográfica abrange Mata Atlântica e Cerrado em diferentes proporções. As hipóteses foram de que espécies que vivem em áreas mais quentes e secas (como o Cerrado) devem apresentar menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, maiores resistências à perda de água por evaporação e maiores taxas de reidratação quando comparadas espécies de ambientes mais úmidos (como a Mata Atlântica). As regressões filogenéticas mostraram uma relação alométrica tanto da RPAE quanto da TR com a massa corpórea, porém, em direções opostas. Adicionalmente, espécies que habitam áreas caracterizadas por temperaturas mais altas e sazonalmente mais uniformes e um nível de precipitação mais baixo e sazonalmente mais concentrado, como o Cerrado, apresentaram maiores TR e maior SDLD que as espécies com distribuição geográfica mais restrita a ambiente mais úmidos como a Mata Atlântica. Esses resultados sugerem a existência de padrões adaptativos do balanço hídrico de anfíbios às características abióticas do ambiente.

Palavras chave: anfíbios, resistência à perda de água por evaporação, desempenho locomotor, taxas de reidratação, clima, ocorrência em diferentes ambientes.

Abstract: Amphibian species richness increases towards the equator, particularly at humid tropical forests. This relationship between amphibian species richness and environmental water availability has been tentatively associated to their high rates of evaporative water loss, exposing these animals to a high risk of dehydration in the terrestrial environment. In this way, several aspects of anuran water balance, such as resistance to evaporative water loss (REWL), sensitivity of locomotor performance to dehydration (SLPD), and rates of water uptake (RWU) might covariate with climatic characteristics associated to interspecific differences in geographic distribution. We conducted a comparative study of characteristics associated to water balance (REWL, SLPD, and RWU) in 17 species of anurans whose geographical distribution encompass the Brazilian Atlantic forest and the Brazilian savannah area, the Cerrado, in different proportions. The hypotheses tested were that species living in warmer and dryer areas (such as the Cerrado) would show lower sensitivity of locomotor performance to dehydration, increased resistance to evaporative water loss and higher rates of water uptake than species from more mesic areas (such as the Atlantic forest). Phylogenetic regressions have shown allometric relations of REWL and RWU with body mass in opposite directions. Additionally, species inhabiting areas characterized by higher and more seasonally uniform temperatures, and lower and more seasonally concentrated precipitation, such as the Cerrado, had higher RWU and SLPD than species with geographical distribution more restricted to mesic environments, such as the Atlantic forest. These results suggest the existence of patterns of adaptations of anuran water balance to abiotic environmental characteristics.

Keywords: amphibia, resistance to evaporative water loss, locomotor performance, rates of rehydration, climate, environmental occurrence.

Introdução

A riqueza de espécies de anfíbios aumenta em direção ao Equador, com grandes concentrações em florestas tropicais úmidas como a Bacia Amazônica e a Mata Atlântica, sendo a disponibilidade hídrica e a temperatura os fatores mais importantes na determinação deste padrão de distribuição da riqueza de espécies (Buckley & Jetz 2007). Na literatura é frequentemente sugerido que a causa dessa associação entre os padrões de riqueza de espécies em anfíbios com a disponibilidade hídrica é a alta permeabilidade da pele característica desse grupo, a qual também representa um importante órgão de trocas gasosas. Essa alta permeabilidade da maioria das espécies de anfíbios pode levar a altas taxas de perda de água, o que expõe esses animais a um alto risco de desidratação em ambientes terrestres (Hillyard *et al.* 1998, McNab 2002).

Nos anfíbios, a desidratação afeta tanto o desempenho locomotor sustentado quanto o de alta intensidade reduzindo assim a habilidade de executar importantes padrões comportamentais como a captura de presas, fuga de predadores e a busca de parceiros sexuais (Moore & Gatten 1989). Adicionalmente a desidratação e a temperatura corpórea apresentam efeitos sinérgicos sobre a locomoção (Preest & Pough 1989). O desempenho locomotor tanto de sapos (*Anaxyrus americanus*) completamente hidratados quanto levemente desidratados aumenta com o aumento da temperatura, porém, o desempenho máximo muda em direção às temperaturas mais baixas nos animais desidratados (Preest & Pough 1989). Alguns estudos comparando poucas espécies apontam ainda para um padrão interespecífico do efeito sinérgico da temperatura e desidratação, sendo que espécies encontradas em ambientes mais quentes e secos apresentam uma sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação mais baixa em temperaturas mais altas quando comparadas a espécies de ambientes mais úmidos e florestados (Beuchat *et al.* 1984, Rogowitz *et al.* 1999, Titon *et al.* 2010).

Poucos estudos comparativos envolvendo o balanço hídrico em anfíbios têm sido feito com um grande número de espécies, tendo estes estudos relacionado os parâmetros fisiológicos somente ao hábito das espécies, e não ao habitat onde são encontradas (Wygoda 1984, Young *et al.* 2005, Tracy *et al.* 2014). Estes estudos têm demonstrado que espécies de anfíbios de hábito arborícola apresentam uma maior resistência à perda de água por evaporação e, conseqüentemente, menores taxas de perda de água quando comparadas à espécies de hábito não arborícola (Wygoda 1984, Young *et al.* 2005). Além disso, o hábito e as estações do ano interagem na determinação da variação interespecífica do estado de hidratação em campo, sugerindo que a tolerância voluntária à desidratação varia de acordo com o hábito das espécies em anfíbios australianos (Tracy *et al.* 2014). Quando ativas durante a estação úmida, as espécies terrícolas apresentam um estado de hidratação menor que as espécies arborícolas e anfíbias, enquanto que estas apresentam um menor nível de hidratação quando nos refúgios naturais selecionados durante a estação seca se comparadas às espécies terrícolas e arborícolas (Tracy *et al.* 2014). Adicionalmente, quando desidratados, os anuros captam água através da mancha pélvica, uma região especializada da pele ventral caracterizada por grande permeabilidade e uma rica vascularização (Boutilier *et al.* 1992). Quanto às taxas de reidratação, alguns autores têm encontrado maiores valores para espécies terrícolas ou encontradas em ambientes mais áridos quando comparadas, respectivamente, a espécies com hábito aquático ou encontradas em ambientes mais méxicos (Bentley *et al.* 1958, Warburg 1972, Christensen 1974, van Berkum *et al.* 1982). Outros estudos demonstraram ainda que, quando comparadas a espécies encontradas em ambientes mais méxicos, as espécies que habitam regiões áridas apresentam uma maior vascularização da mancha pélvica e um maior fluxo celular sanguíneo nesta região quando em contato com água após a desidratação (Roth 1973, Viborg & Rosenkilde 2004, Viborg & Hillyard 2005, Viborg *et al.* 2006, Suzuki *et al.* 2007). Porém, esses padrões são baseados em estudos realizados com

poucas espécies, o que impede a dissociação entre os papéis da diversificação ecológica e filogenética ao moldar a evolução das taxas de reidratação.

Assim, o objetivo desse estudo foi investigar a evolução de caracteres do balanço hídrico em anuros, e suas possíveis relações com as características climáticas associadas à distribuição geográfica das espécies. Para isso, foi adotada uma abordagem comparativa incluindo espécies de anuros que ocorrem em regiões com características climáticas diferenciadas. Mais especificamente, foram comparadas espécies de anuros cuja distribuição geográfica engloba a Mata Atlântica e o Cerrado em diferentes proporções. As hipóteses testadas foram as de que espécies que habitam áreas mais quentes e secas (como o Cerrado) devam apresentar uma menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, uma maior resistência à perda de água por evaporação e maiores taxas de reidratação a partir de água livre quando comparadas a espécies que vivem em ambiente mais úmidos (como a Mata Atlântica).

Materiais e Métodos

Coleta e manutenção dos animais

Machos de 17 espécies de anuros foram coletados em diferentes localidades do Brasil. *Dendropsophus microps* (N=7), *Scinax hayii* (N=10), *Hypsiboas polytaenius* (N=9), *H. faber* (N=10), *H. bischoffi* (N=8) e *S. crospedospillus* (N=2) foram coletados na Estação Biológica de Boracéia, Salesópolis, SP (23°39'13.99"S; 45°53'22.41"W), entre 20 e 23 de janeiro de 2009. *Hypsiboas albopunctatus* (N=9), *D. minutus* (N=10) e *Leptodactylus podicipinus* (N=7) foram coletados na Estação Ecológica de Assis, Assis, SP (22°34'19.88"S; 50°24'32.82"W), entre 05 e 08 de março 2009. *Leptodactylus notoaktites* (N=3), *Physalaemus olfersii* (N=7), *P. spiniger* (N=8), *Proceratophrys boiei* (N=10), e *S. rizibilis* (N=10) foram coletados no Parque Estadual Intervales, Ribeirão Grande, SP (24°16'24.55"S; 48°25'2.27"W), entre 14 e 17 de

novembro de 2009. *Rhinella ornata* (N=9) foi coletado em uma lagoa artificial na Universidade de São Paulo, SP (23°33'51.6"S; 46°43'48.1"W) entre 23 e 24 de outubro de 2012. *Rhinella schneideri* (N=9) foi coletado na Zona Rural do Município de Luiz Antônio, SP (47°39'16"S; 21°33'05"W) entre 25 e 27 de fevereiro de 2013, e *R. icterica* (N=10) foi coletado na Zona Rural do Município de São Luiz do Paraitinga, SP (23°10'06"S; 45°17'07"W) entre 05 e 10 de novembro de 2013. As localidades de coleta em Assis e Luiz Antônio estão dentro de uma área de Cerrado, enquanto as demais localidades se encontram sob o domínio da Mata Atlântica. Após coletados, os animais foram levados para o laboratório na Universidade de São Paulo, onde foram mantidos em potes plásticos individuais contendo algum tipo de abrigo e água livre, e expostos ao ciclo natural de claro e escuro e de temperatura. Os animais foram alimentados uma vez por semana com baratas. Os animais foram coletados sob a licença de captura e transporte do “Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis” (IBAMA, processos números 17377-1 e 29896-1) e os procedimentos de coleta e uso de material biológico foram executados de acordo com as normas da “Comissão de Ética na Experimentação Animal”, processo número 62/08-CEEA, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Instituto de Biociências e da “Comissão de Ética no Uso de Animais”, processo número 120/2010-CEUA, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Os trabalhos de campo realizados na Estação Ecológica de Assis e no Parque Estadual Intervales foram executados sob autorização da “Coordenadoria de informações técnicas, documentação e pesquisa ambiental” (COTEC, processo número 260108-000.000.002.011/0 2008), Instituto Florestal, Secretaria do Meio Ambiente. Para as demais localidades não foram necessárias autorizações específicas.

Sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação

O desempenho locomotor foi avaliado dentro de uma sala climatizada (FITOTRON 011-Eletrolab) a 25°C, 40% de umidade relativa e cinco níveis de hidratação consecutivos (100, 90, 80, 75 e 70% da massa corpórea padrão). Antes do teste, os animais foram mantidos dentro de potes plásticos (0,13m × 0,13m × 0,11m) com água durante uma hora na temperatura do teste. Eles foram então secos com papel toalha, suas bexigas urinárias foram esvaziadas através de uma leve pressão na região pélvica e tiveram sua massa corpórea medida (± 0.0001 g). Essa massa foi considerada como massa corpórea padrão (nível de hidratação de 100%). Os animais foram estimulados a saltar por seis vezes consecutivas no chão da sala climatizada através de leves toques. As distancias saltadas foram marcadas no chão e medidas (± 1 cm), sendo a distância saltada mais longa usada como uma estimativa de desempenho máximo. Os animais foram então desidratados e o teste de desempenho locomotor foi repetido cada vez que o indivíduo chegava em um dos níveis de hidratação esperados. As taxas de desidratação foram controladas a fim de manter um intervalo de pelo menos 60 minutos entre os testes de locomoção. Ventiladores elétricos foram utilizados para acelerar a desidratação quando necessário. Testes consecutivos foram realizados até que os indivíduos atingissem 75% ou 70% de sua massa corpórea padrão de acordo com sua condição geral e responsividade ao estímulo. Como os bufonídeos são caracterizados por uma capacidade locomotora mais aeróbica quando comparados às demais espécies (Titon *et al.* 2010, Bennett & Licht 1973, 1974), o desempenho locomotor das espécies do gênero *Rhinella* foi estimada como a distância percorrida em uma pista circular (1,5m de diâmetro) durante 10 minutos em cada nível de hidratação. Para esse grupo, os testes consecutivos de desempenho em diferentes níveis de hidratação foram realizados em dias diferentes, resultando em uma taxa de desidratação de 10% por dia até 80% e de 5% por dia até atingir 75% e 70% da massa corpórea padrão. Para cada indivíduo foram construídos gráficos contendo nível de hidratação

no eixo das abscissas e desempenho locomotor (corrigido pelo comprimento rostro-cloacal) no eixo das ordenadas. Assim, a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação (SDLD) foi considerada como o nível de hidratação no qual o desempenho locomotor atinge 70% do valor máximo sendo obtida a partir da interpolação desse gráfico (Beuchat *et al.* 1984, Titon *et al.* 2010).

Resistência à perda de água por evaporação

Antes das medidas, os animais foram mantidos dentro de potes plásticos (0,13m × 0,13m × 0,11m) com água durante uma hora na temperatura do teste. Eles foram então secos com papel toalha, suas bexigas urinárias foram esvaziadas através de uma leve pressão na região pélvica e tiveram sua massa corpórea medida ($\pm 0.01\text{g}$). Após esse procedimento os animais foram colocados individualmente em câmaras de acrílico de acordo com o seu tamanho (1700cm³ para as espécies maiores e 140cm³ para as menores). Um sistema de ar aberto foi utilizado para medir as taxas de perda de água por evaporação. Um fluxo de ar de 23cm³.s⁻¹ para a câmara maior e 5cm³.s⁻¹ para a menor foi gerado por uma bomba de ar acoplada a um fluxímetro de massa (SS-3 Subampler – Sable Systems). O ar bombeado para dentro das câmaras foi mantido com uma umidade relativa de 20% através de um controlador de umidade relativa (RH/Dewpoint Controller – Sable Systems). Para cada medida o fluxo de ar passou por três câmaras: uma câmara vazia, uma câmara contendo um modelo de ágar 3% com tamanho e formato adequado para cada espécie e uma câmara contendo o animal. O ar que deixa cada uma dessas três câmaras foi então encaminhado, por um direcionador de fluxo (RM8 – Intelligent Multiplexer – Sable Systems), para um analisador de densidade de vapor de água (RH – 300 RH/Dewpoint Analyzer – Sable Systems). Uma interface (UI-2 Data Acquisition Interface – Sable Systems) conectada a um computador permitiu o registro contínuo de dados. Somente os dados correspondentes a

períodos onde o animal manteve a postura de conservação de água, identificado pela constância dos registros de vapor de água, foram utilizados nos cálculos. Após atingir pelo menos 20 minutos de registro contínuo, as câmaras foram abertas e a temperatura de superfície tanto do animal quanto do modelo de ágar foram medidas através de um termômetro de infravermelho (TR-300, Equitherm).

As taxas de perda de água por evaporação foram calculadas a partir da fórmula:

$$TD = F_a DVA_a - F_v DVA_v$$

Onde TD representa a taxa de perda de água por evaporação absoluta ($\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$); F_a e F_v representam o fluxo de ar ($\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), respectivamente na câmara contendo o animal e na câmara vazia; e DVA_a e DVA_v representam a densidade do vapor de água, ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), do ar que deixa respectivamente a câmara contendo o animal e a câmara vazia. O cálculo da taxa de perda de água por evaporação por área de exposição foi realizado dividindo-se a taxa de perda de água por evaporação absoluta por dois terços da superfície corpórea total dos animais, que segundo Withers e colaboradores (1982), é a porção que se mantém exposta enquanto os animais se encontram na postura de conservação de água. A área de superfície total foi considerada a partir de McClanahan & Baldwin (1969):

$$SA = 9,9M^{0,56}$$

Onde SA representa a área de superfície total (cm^2), e M representa a massa corpórea do animal (g). A resistência total à perda de água por evaporação foi calculada através da fórmula:

$$R = (DVA_s - DVA_a) / TD_a$$

Onde R representa a resistência à perda de água por evaporação ($\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$); DVA_s representa a densidade do vapor de água saturado ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) na superfície da pele do animal ou do modelo de ágar; DVA_a representa a densidade do vapor de água ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) do ar que deixa a câmara contendo o animal ou o modelo de ágar; e por fim, TD_a representa a taxa de perda de

água por evaporação por área de exposição ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). A resistência a perda de água calculada para o animal e para o modelo de ágar representam, respectivamente, a resistência total à perda de água por evaporação e a resistência da camada limítrofe de ar na superfície. Ao subtrair a resistência da camada limítrofe da resistência total à perda de água por evaporação, foi obtida a resistência da pele à perda de água por evaporação (RPAE).

Taxas de reidratação

Os animais com níveis de hidratação próximos a 70%, provenientes do protocolo de desidratação descrito anteriormente, foram colocados em recipientes de tamanho compatível com a massa dos indivíduos e contendo água de torneira filtrada em um nível suficiente para que os animais mantivessem somente a região ventral em contato com a água. Em intervalos de 2 minutos, esses animais eram retirados da água, secos com papel absorvente e pesados (0,01 g) novamente, por seis vezes consecutivas. A taxa de reidratação absoluta ($\mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$) foi estimada a partir da regressão do ganho de massa corpórea pelo tempo. Para a obtenção da taxa de reidratação por área, foi considerado um terço da área corpórea total, o que representa a região ventral que está exposta à água durante a reidratação.

Dados Climáticos e ocorrência das espécies

As coordenadas geográficas de pontos de ocorrência das espécies foram obtidas na base de dados digital do projeto SpeciesLink (<http://splink.cria.org.br/>). Para cada coordenada geográfica foram obtidos dados médios entre os anos 1950 e 2000 de oito variáveis climáticas: temperatura média anual, temperatura máxima do mês mais quente do ano, temperatura mínima do mês mais frio do ano, sazonalidade da temperatura, precipitação anual acumulada, precipitação acumulada do mês mais chuvoso, precipitação acumulada do mês menos chuvoso e sazonalidade da precipitação. Os dados climáticos foram extraídos da base

de dados digital Wordclim (<http://www.worldclim.org>) com uma resolução de 1 km² (Hijmans *et al.* 2005) através do software DIVA-GIS (Hijmans *et al.* 2001) versão 7.5.0.0.

Relações filogenéticas

Uma árvore filogenética com proposta de tempo de divergência foi compilada a partir de Maciel *et al.* (2010) e Pyron (2014) para as 17 espécies incluídas no presente estudo (Figura 1). As propostas filogenéticas usadas foram baseadas primariamente em dados moleculares. Nos poucos casos onde foram utilizados dados morfológicos, estes provavelmente não se encontram relacionados com as variáveis fisiológicas consideradas no presente estudo. Desta forma, confiamos na independência entre os dados coletados no presente estudo e aqueles utilizados para a construção da hipótese filogenética utilizada em sua análise. Adicionalmente, não houve divergências entre as topologias das propostas filogenéticas usadas para a nossa compilação. Como a quantidade de espécies que existiam dados foram diferentes para cada variável fisiológica, as árvores utilizadas nas análises filogenéticas tinham 16 espécies para RPAE e 13 espécies para TR e SDLD.

Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas para todas as variáveis fisiológicas e climáticas por espécie e estes dados foram posteriormente transformados em Log₁₀ para as análises subsequentes. As médias das oito variáveis climáticas para os pontos de ocorrência de cada espécie foram utilizadas em uma análise de componentes principais (PCA) e os scores desses componentes com eigenvalues maiores que 1.0 foram salvos para análises posteriores. Novamente, como nem todas as espécies tinham todos os dados das variáveis fisiológicas, duas PCAs foram feitas: uma contendo as variáveis climáticas para as 16 espécies que apresentavam dados de RPAE; e outra com as variáveis climáticas para as 13 espécies que

apresentavam dados de TR e SDLD. Foram realizadas regressões filogenéticas para investigar possíveis efeitos da massa corpórea sobre as variáveis fisiológicas estudadas (Revell 2009). Posteriormente, estes dados corrigidos filogeneticamente para a massa corpórea foram incorporados como variáveis dependentes em regressões filogenéticas nas quais os scores dos componentes principais das variáveis climáticas entraram como fatores (Pagel 1992). Consequentemente, os modelos utilizados foram: $SDLD \sim C1 + C2$; $RPAE \sim C1 + C2$; $TR \sim C1 + C2$. As análises descritivas e a análise de componentes principais foram realizadas através do software SPSS for Windows version 13.0. A árvore filogenética utilizada foi compilada através do software Mesquite version 2.75 (build 564) e as correções filogenéticas para massa corpórea e as regressões filogenéticas foram realizadas com o software R versão 3.0.2 (2013-09-25) com RStudio (versão 0.98.501).

Resultados

Na Tabela 1 encontramos a estatística descritiva das variáveis fenotípicas na forma de média $\pm$ desvio padrão. A estatística descritiva das variáveis climáticas extraídas dos pontos de ocorrência de cada espécie relacionadas com temperatura (temperatura média anual, temperatura máxima do mês mais quente do ano, temperatura mínima do mês mais frio do ano e sazonalidade da temperatura) e com níveis de precipitação (precipitação anual acumulada, precipitação acumulada do mês mais chuvoso, precipitação acumulada do mês menos chuvoso e sazonalidade da precipitação) está representada, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3, como média $\pm$ desvio padrão.

Relações entre as variáveis climáticas

As análises de componentes principais realizadas para as variáveis climáticas retiveram dois componentes, os quais foram iguais para o conjunto de dados para 16 ou 13

espécies (Tabela 4). O componente 1 explicou 66,36% e 75,68% do total da variação observada para os conjuntos de 16 e 13 espécies, respectivamente, e representa uma associação direta entre a temperatura média anual, a temperatura máxima do mês mais quente do ano, a temperatura mínima do mês mais frio do ano e a sazonalidade da precipitação, e uma associação inversa dessas variáveis com a sazonalidade da temperatura, a precipitação anual acumulada e a precipitação acumulada do mês menos chuvoso. O componente 2 explicou 19,87% e 18,99% do total da variação observada para os conjuntos de 16 e 13 espécies, respectivamente, e está associado a precipitação acumulada do mês mais chuvoso.

Alometria e relações entre as variáveis fisiológicas e o clima

A massa corpórea teve um efeito significativo e em direções opostas sobre a RPAE ($RPAE = 0,608M^{0,185}$, $p = 0,021$) e a TR ($TR = 1,538M^{0,327}$, $p = 0,004$), porém, não teve nenhum efeito sobre a SDLD ($SDLD = 1,909M^{-0,005}$, $p = 0,584$).

Tanto a SDLD quanto a TR apresentaram relação com a variável climática composta 1, proveniente da PCA com as variáveis climáticas (Tabela 5). Já a variação na RPAE não mostrou nenhuma associação com as variáveis climáticas compostas (Tabela 5). Além disso, é possível observar duas nuvens de dados distintas na análise da regressão filogenética entre os scores do componente 1 da PCA com as variáveis climáticas e os valores ajustados tanto da SDLD quanto da TR (Figura 2). Essas duas nuvens de dados correspondem à espécies cujo indivíduos foram coletados em locais de domínio da Mata Atlântica e de Cerrado, respectivamente.

Discussão

Esse é o primeiro estudo a reportar padrões de relações interespecíficas entre diferentes variáveis associadas ao balanço hídrico e variáveis climáticas associadas à distribuição

geográfica de anuros, baseado em um grande número de espécies e análises filogeneticamente controladas. As análises interespecíficas mostraram que algumas variáveis relacionadas ao balanço hídrico em anuros, particularmente RPAE e TR, apresentaram relações alométricas com a massa corpórea. Adicionalmente, a relação da variação interespecífica em TR e SDDL com as variáveis climáticas associadas à distribuição geográfica sugerem um padrão de adaptação do balanço hídrico de anuros às condições abióticas.

Tanto a RPAE quanto a TR mostraram uma relação com a variação interespecífica na massa corpórea, porém, em direções opostas. Outros estudos já mostraram que as taxas de perda de água por evaporação tem uma relação inversa com a massa corpórea (Schmid 1965, Withers *et al.* 1982, Wygoda 1984). Este resultado tem sido interpretado como uma consequência da variação alométrica na relação superfície/volume, já que anuros menores têm uma maior superfície relativa de perda de água. Adicionalmente, uma maior tolerância à perda de água por evaporação em animais menores já foi interpretada como uma adaptação associada a essa desvantagem na relação superfície/volume (Geise & Linsenmair 1988). Assim, nossos resultados sugerem que uma maior RPAE pode compensar, ainda que parcialmente, o aumento das taxas de perda de água associada à evolução de menores massas corpóreas em anuros. Esse resultado diverge do encontrado em estudos anteriores, que não encontraram uma relação entre a variação interespecífica da RPAE e da massa corpórea em anuros (Buttemer & Thomas 2003, Young *et al.* 2005). Entretanto, esses estudos anteriores incluem espécies caracterizadas por RPAE muito elevadas e massas corpóreas relativamente baixas, e essas espécies podem, ao menos em parte, mascarar a função alométrica da RPAE. Já uma relação alométrica da TR com a massa corpórea já foi sugerida anteriormente para anuros (Viborg & Rosenkilde 2004, Viborg & Hillyard 2005, Viborg *et al.* 2006). De acordo com esses autores, o tempo gasto para se atingir um fluxo celular sanguíneo máximo na mancha pélvica aumenta com o aumento na massa corpórea. Por outro lado, a magnitude

desse fluxo parece estar relacionada com o ambiente, uma vez que espécies de ambientes mais xéricos apresentaram maior fluxo que espécies de ambientes mésicos apesar da diferença em massa corpórea (Viborg & Rosenkilde 2004, Viborg & Hillyard 2005, Viborg *et al.* 2006). Nossos resultados corroboram as associações entre TR e massa corpórea encontrada pelos estudos anteriores sob uma análise comparativa mais ampla e filogeneticamente corrigida. Essa associação da TR com a massa corpórea pode estar relacionada ao fato de que anuros caracterizados por maiores massas corpóreas apresentam uma baixa relação superfície/volume, o que poderia acarretar em uma mancha pélvica com menor área relativa. Entretanto, anuros de grande massa corpórea precisam de maior volume absoluto de água para reidratar-se. Portanto, nossos resultados sugerem que uma maior taxa de reidratação pode ter sido selecionada como uma compensação associada ao aumento do tamanho corpóreo. Os mecanismos que determinam essas diferenças nas taxas de reidratação de acordo com o tamanho corpóreo ainda precisam ser investigados, porém, podem estar associados a diferenças no grau de vascularização (Roth 1973) e na permeabilidade da mancha pélvica devido a densidade de aquaporinas (Tanii *et al.* 2002, Hasegawa *et al.* 2003, Ogushi *et al.* 2007).

Adicionalmente, foi encontrado um claro padrão de variação interespecífica tanto na TR quanto na SDLD com as variáveis climáticas extraídas dos pontos de ocorrência para as diferentes espécies incluídas nesta análise. As espécies com pontos de ocorrência abrangendo áreas caracterizadas por temperaturas mais altas e sazonalmente mais uniformes, e por menores níveis de precipitação e sazonalmente mais concentrados, apresentaram maiores TR e SDLD. Além disso, espécies com distribuição geográfica mais associada à Floresta Atlântica e ao Cerrado formaram duas nuvens de distribuição de dados distintas na regressão filogenética entre essas variáveis fisiológicas e o primeiro componente climático derivado dos pontos de ocorrência, reforçando o padrão evidenciado nas variáveis contínuas. Embora esses

dados mostrem que essas variáveis fisiológicas associadas ao balanço hídrico estão relacionadas de maneira consistente com a ocorrência das espécies nesses dois biomas, esse conjunto de dados não permite a verificação da contribuição de diferentes processos subjacentes à esta variação fenotípica (adaptação genética ou aclimatização). As duas nuvens de dados distintas associadas ao Cerrado e à Mata Atlântica contém dados de espécimes coletados respectivamente dentro desses dois biomas. A análise de populações de uma mesma espécie nos dois biomas, bem como a investigação da capacidade de aclimação dessas variáveis fisiológicas, devem trazer novos insights para essa discussão. Adicionalmente, a inclusão de espécies habitando ambientes caracterizados por uma restrição hídrica mais drástica, como regiões áridas e semiáridas, devem definir melhor possíveis padrões de adaptação do balanço hídrico em anuros.

Alguns autores já reportaram que espécies de anuros terrestres ou que habitam ambientes áridos apresentam maiores taxas de reidratação quando comparados à espécies semiaquáticas ou aquelas que ocorrem em ambientes mais úmidos (van Berkum *et al.* 1982, Viborg & Hillyard 2005, Viborg *et al.* 2006). Esses resultados condizem com as observações morfológicas que mostram que espécies que habitam ambientes xéricos apresentam uma região ventral mais vascularizada (Roth 1973). Esses resultados combinados sugerem um padrão de seleção direcional de indivíduos capazes de se hidratar mais rapidamente e mais eficientemente quando encontram uma fonte de água em ambientes nos quais esta representa um recurso limitado. Novamente, nossos resultados corroboram esses estudos anteriores através de uma abordagem evolutiva mais sólida. Por outro lado, estudos anteriores tem encontrado um padrão negativo de associação entre SDLD e a ocupação de ambientes abertos e com maior restrição hídrica (Beuchat *et al.* 1984, Rogowitz *et al.* 1999, Titon *et al.* 2010). Estes resultados sugerem que indivíduos que são capazes de manter um desempenho comportamental em menores estados de hidratação estão sofrendo uma seleção direcional em

ambientes com restrições hídricas. Entretanto, nossas análises encontraram um padrão oposto: espécies com distribuição geográfica mais associada à ambientes méxicos apresentaram menor SDLD do que espécies com distribuição geográfica abrangendo ambientes com maior restrição hídrica. Embora nossos resultados não corroborarem os estudos anteriores, acreditamos que este padrão oposto ao observado em outros estudos possa estar relacionado a diferenças metodológicas. O presente estudo foi conduzido com um número de espécies muito maior, distribuídas em diferentes grupos dentro dos anuros e incorporando análises com correções filogenéticas. Além disso, o presente estudo relacionou dados fisiológicos com dados climáticos médios das áreas de ocorrência, ao invés de associar essas variáveis fisiológicas com áreas de ocorrência nominalmente categorizadas de forma subjetiva. Assim, acreditamos que os nossos resultados são muito confiáveis e que esse padrão possa estar associado à seleção de padrões de atividades temporais nesses ambientes diferenciados. Em ambientes caracterizados por um nível de precipitação menor e sazonalmente mais concentrado, como o Cerrado, os indivíduos devem ser selecionados de forma a concentrar a reprodução e outras atividades, como forrageamento, nos períodos onde a probabilidade de chuvas é maior. Esse padrão de atividade concentrada em períodos chuvosos deve prevenir a seleção de sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação no Cerrado. Por outro lado, espécies que vivem em ambientes caracterizados por um maior nível de precipitação e sazonalmente mais bem distribuído podem manter uma atividade mais contínua, com algumas espécies apresentando atividade reprodutiva o ano todo ou ao menos uma atividade de forrageamento contínua (Bertoluci 1998, Brasileiro *et al.* 2005, Vasconcelos & Rossa-Feres 2005, Conte & Rossa-Feres 2006, Santos *et al.* 2007). Essa atividade, se sustentada em períodos com menor umidade relativa, pode permitir seleção direcional sobre SDLD na Mata Atlântica. Estas explicações são até então muito especulativas, sendo necessários mais estudos comparativos envolvendo duração de temporada reprodutiva em diferentes localidades para se

testar hipóteses deste gênero. Adicionalmente, estudos anteriores (Beuchat *et al.* 1984, Rogowitz *et al.* 1999, Titon *et al.* 2010) também diferem do presente por testar SDLD em diferentes temperaturas, e demonstraram que os padrões de adaptação e/ou aclimatização podem alterar as curvas de desempenho resultando em redução da SDLD em temperaturas próximas das temperaturas de atividade das espécies em campo. No nosso estudo nós testamos a SDLD somente em uma temperatura. Assim, é preciso considerar que espécies que ocorrem na Mata Atlântica e no Cerrado devam apresentar diferentes temperaturas ótimas onde os efeitos da desidratação são reduzidos, e que a análise comparativa da SDLD nessas temperaturas pode mudar os padrões descritos aqui.

Nossas análises não mostraram padrões de variação interespecífica da RPAE com as variáveis climáticas associadas com a distribuição geográfica, corroborando os resultados de outros estudos anteriores que tentaram relacionar variações da RPAE com diferenças quanto ao habitat (Littleford *et al.* 1947, Thorson 1955, Ray 1958, Schmid 1965, Spight 1968, Claussen 1969, Heatwole *et al.* 1969). Esses resultados não corroboram o pensamento largamente difundido de que uma alta permeabilidade da pele deva ser uma limitação direta à ocupação de ambientes com uma maior restrição hídrica, ou que indivíduos com uma alta RPAE que habitam esse tipo de ambiente estariam sendo selecionados. É possível ainda que ajustes comportamentais, como padrões de época reprodutiva e a escolha de microambientes durante a atividade, possam também contribuir para prevenir a seleção direcional da RPAE. Por outro lado, vários estudos tem encontrado um padrão consistente de associação interespecífica entre a RPAE e o hábito, sendo que espécies arborícolas apresentam maiores valores de RPAE do que espécies terrícolas ou semiaquáticas (Withers *et al.* 1984, Wygoda 1984, Young *et al.* 2005). Embora o presente estudo tenha um número relativamente grande de espécies, a variação interespecífica de hábito apresenta uma grande sobreposição com a filogenia, dificultando a avaliação de uma possível relação entre RPAE e hábito.

Concluindo, esta análise comparativa do balanço hídrico de anuros mostrou que a massa corpórea coevoluiu com a RPAE e com a TR em direções opostas. Adicionalmente, espécies que habitam áreas caracterizadas por temperaturas mais altas e sazonalmente mais uniformes e uma precipitação sazonalmente mais concentrada e em menor volume, como o Cerrado, apresentaram uma maior TR e SLDL quando comparadas a espécies com distribuição geográfica mais associada a ambientes méxicos como a Mata Atlântica. Esses resultados sugerem que a habilidade de se hidratar mais rapidamente constitui uma adaptação dos anuros a ambientes caracterizados por uma maior restrição sazonal na disponibilidade hídrica. Por outro lado, uma maior SLDL apresentada por anuros que habitam o Cerrado pode estar relacionada a uma restrição mais intensa das atividades às épocas de chuva, impedindo a ação da seleção sobre essa variável.

Referências Bibliográficas

- Bennett AF, Licht P (1973). Relative contributions of anaerobic and aerobic energy production during activity in Amphibia. *J Comp Physiol* 87:351-360.
- Bennett AF, Licht P (1974). Anaerobic metabolism during activity in amphibians. *Comp Biochem Physiol A* 48:319-327.
- Bentley PJ, Lee AK, Main AR (1958). Comparison of dehydration and hydration of two genera of frogs (*Heleioporus* and *Neobatrachus*) that live in areas of varying aridity. *J Exp Biol* 35:667-684.
- Bertoluci JA (1998). Annual patterns of breeding activity in Atlantic Rainforest anurans. *J Herpetol* 32:607-611.
- Beuchat CA, Pough FH, Stewart MM (1984). Response to simultaneous dehydration and thermal stress in three species of Puerto Rican frogs. *J Comp Physiol B* 154:579-585.

- Boutilier RG, Stiffler DF, Toews DP (1992). Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians. *In*: Feder ME, Burggren WW (eds). Environmental Physiology of the Amphibians. University of Chicago Press, Chicago. Pp 81-124.
- Brasileiro CA, Sawaya RJ, Kiefer MC, Martins (2005). Amphibians of an open Cerrado Fragment in Southeastern Brazil. *Biota Neotrop* v5(n2):BN00405022005.
- Buckley L, Jetz BW (2007). Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. *Proc R Soc B* 274:1167-1173.
- Buttemer WA, Thomas C (2003). Influence of temperature on evaporative water loss and cutaneous resistance to water vapour diffusion in the orange-thighed frog (*Litoria xanthomera*). *Aust J Zool* 51:111-118.
- Christensen CU (1974). Effect of arterial perfusion on net water flux and active sodium transport across the isolated skin of *Bufo bufo bufo* (L.). *J Comp Physiol* 93:93-104.
- Claussen DL (1969). Studies on water loss and rehydration in anurans. *Physiol Zool* 42:1-14.
- Conte CE, Rossa-Feres DC (2006). Diversidade e ocorrência temporal da anurofauna (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. *Rev Bras Zool* 23(1):162-175.
- Geise W, Linsenmair KE (1988). Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. IV. Ecological significance of water economy with comments on thermoregulation and energy allocation. *Oecologia* 77:327-338.
- Hasegawa T, Tanii H, Suzuki M, Tanaka S (2003). Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin- dependent water-channel aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3. *Endocrinology* 144(9):4087-4096.

- Heatwole HF, Torres F, Austin SB, Heatwole A (1969). Studies on anuran water balance. I. Dynamics of evaporative water loss by the coqui, *Eleutherodactylus portoricensis*. *Comp Biochem Physiol* 28:245–269.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 25:1965-1978.
- Hijmans RJ, Guarino L, Cruz M, Rojas E (2001). Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. *Plant Genet Resour Newsl* 127:15-19.
- Hillyard SD, Hoff KS, Propper CR (1998). The water absorption response: a behavioral assay for physiological processes in terrestrial amphibians. *Physiol Zool* 71:127-138.
- Littleford RA, Keller WF, Phillips NW (1947). Studies on the vital limits of water loss in the plethodontid salamanders. *Ecology* 28:440-447.
- Maciel NM, Collevatti RG, Colli GR, Schwartz EF (2010). Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Mol Phylogenet Evol* 57:787-797.
- McClanahan LL, Baldwin R (1969). Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. *Comp Biochem Physiol* 28:381–389.
- McNab BK (2002). *The Physiological Ecology of Vertebrates: A View From Energetics*. Cornell University Press, New York. 576 pp.
- Moore FR, Gatten Jr RE (1989). Locomotor performance of hydrated, dehydrated and osmotically stressed anuran amphibians. *Herpetologica* 45:101-110.
- Ogushi Y, Moshida H, Nakakura T, Suzuki M, Tanaka S (2007). Immunocytochemical and phylogenetic analyses of an arginine vasotocin-dependent aquaporin, AQP-h2K, specifically expressed in the kidney of the tree frog, *Hyla japonica*. *Endocrinology* 148(12):5891-5901.
- Pagel MD (1992). A method for the analysis of comparative data. *J Theor Biol* 156:431-442.

- Preest MR, Pough FH (1989). Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. *Func Ecol* 3:693-699.
- Pyron RA (2014). Biogeographic analysis reveals ancient continental vicariance and recent oceanic dispersal in amphibians. *Syst Biol* 0(0):1–19.
- Ray C (1958). Vital limits and rates of dessication in salamanders. *Ecology* 39:75-83.
- Revell LJ (2009). Size-correction and principal components for interspecific comparative studies. *Evolution* 63(12): 3258–3268.
- Rogowitz GL, Cortes-Rivera M, Nieves-Puigdoller K (1999). Water loss, cutaneous resistance, and effects of dehydration on locomotion of *Eleutherodactylus* frogs. *J Comp Physiol B* 169:179-186.
- Roth JJ (1973). Vascular supply to the ventral pelvic region of anurans as related to water balance. *J Morphol* 140:443-460.
- Santos TG, Rossa-Feres DC, Casatti L (2007). Diversidade e distribuição espaço-temporal de anuros em região com pronunciada estação seca no sudeste do Brasil. *Iheringia Sér Zool* 97(1):37-49.
- Schmid WD (1965). Some aspects of the water economies of nine species of amphibians. *Ecology* 46:261-269.
- SpeciesLink (2014). Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: a Integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP). Accessed at: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt> in September 9th of 2014.
- Spight TM (1968). The water economy of salamanders: evaporative water loss. *Physiol Zool* 41:195-203.
- Suzuki M, Hasegawa T, Ogushi Y, Tanaka S (2007). Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: A Review. *Comp Biochem Physiol A* 148:72–81.

- Tanii H, Hasegawa T, Hirakawa N, Suzuki M, Tanaka S (2002). Molecular and cellular characterization of water-channel protein, AQP-h3, specifically expressed in frog pelvic skin. *J Memb Biol* 188:43-53.
- Thorson TB (1955). The relationship of water economy to terrestriality in amphibians. *Physiol Zool* 36:100-116.
- Titon Jr B, Navas CA, Jim J, Gomes FR (2010). Water balance and locomotor performance in three species of neotropical toads that differ in geographical distribution. *Comp Biochem Physiol A* 156:129-135.
- Tracy CR, Tixier T, Le Nöene C, Christian KA (2014). Field hydration state varies among tropical frog species with different habitat use. *Physiol Biochem Zool* 87(2):197-202.
- van Berkum FH, Pough FH, Stewart MM, Brussard, PF (1982). Altitudinal and interspecific differences in the rehydration abilities of Puerto Rican frogs (*Eleutherodactylus*). *Physiol Zool* 55:130-136.
- Vasconcelos TS, Rossa-Feres DC (2005). Diversidade, distribuição espacial e temporal de anfíbios anuros (amphibia, anura) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotrop* v5(n2):BN01705022005.
- Viborg AL, Hillyard SD (2005). Cutaneous blood flow and water absorption by dehydrated toads. *Physiol Biochem Zool* 78:394-404.
- Viborg AL, Rosenkilde P (2004). Water Potential in the skin blood perfusion in the ventral pelvic patch of toads. *Physiol Biochem Zool* 77(1):39-49.
- Viborg AL, Wang T, Hillyard SD (2006). Cardiovascular and behavioural changes during water absorption in toads, *Bufo alvarius* and *Bufo marinus*. *J Exp Biol* 209:834-844.
- Warburg MR (1972). Water economy and thermal balance of Israeli and Australian amphibians from xeric habitats. *Symp Zool Soc Lond* 31:79-111.

- Withers PC, Hillman SS, Drewes RC (1984). Evaporative water loss and skin lipids of anuran amphibians. *J Exp Zool* 232:11-17.
- Withers PC, Hillman SS, Drewes RC, Sokal OM (1982). Water loss and nitrogen excretion in sharpnosed reed frogs (*Hyperolius nasutus*. Anura, Hyperoliidae). *J Exp Biol* 97:335-343.
- WorldClim (2014). Global Climate Data. Accessed at: <http://www.worldclim.org/current> in September 9th of 2014.
- Wygoda ML (1984). Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. *Physiol Zool* 57:329-337.
- Young JE, Christian KA, Donnellan S, Tracy CR, Parry D (2005). Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. *Physiol Biochem Zool* 78(5):847-856.

Figuras:

Figura 1: Árvore filogenética compilada para as 17 espécies de anuros incluídas no presente estudo, com topologia e tempos de divergência baseados na literatura (Maciel *et al.* 2010, Pyron 2014).

Figura 2: Relações interespecíficas entre os valores ajustados de sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação (A) e da taxa de reidratação (B) filogeneticamente corrigidos pela massa corpórea para 13 espécies de anuros como uma função do score do componente 1 proveniente da PCA com as variáveis climáticas. As elipses formadas por linhas contínuas representam as espécies coletadas em localidade dentro dos domínios do Cerrado, enquanto as elipses formadas por linhas tracejadas representam as espécies coletadas dentro dos domínios da Mata Atlântica.

Tabelas:

Tabela 1: Média $\pm$ desvio padrão das variáveis fenotípicas coletadas para 17 espécies de anuros.

Espécie	N	Massa (g)	RPAE (s.cm ⁻¹)	TR (μg.s ⁻¹)	SDLD (%)
<i>Dendropsophus microps</i>	7	0,55 $\pm$ 0,03	9,23 $\pm$ 0,93	27,80 $\pm$ 4,38	76,5 $\pm$ 4,3
<i>Dendropsophus minutus</i>	10	0,50 $\pm$ 0,03	-	56,59 $\pm$ 19,82	83,5 $\pm$ 4,0
<i>Scinax rizibilis</i>	10	0,72 $\pm$ 0,07	3,76 $\pm$ 1,44	-	-
<i>Scinax crospedospilus</i>	2	1,25 $\pm$ 0,01	3,13 $\pm$ 0,01	-	-
<i>Scinax hayii</i>	10	3,51 $\pm$ 0,41	4,42 $\pm$ 0,74	57,45 $\pm$ 12,84	83,8 $\pm$ 3,6
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	9	5,86 $\pm$ 0,91	2,54 $\pm$ 0,72	65,62 $\pm$ 20,04	83,7 $\pm$ 5,8
<i>Hypsiboas faber</i>	10	38,25 $\pm$ 5,09	3,34 $\pm$ 0,63	95,42 $\pm$ 22,10	76,9 $\pm$ 2,1
<i>Hypsiboas bischoffi</i>	8	3,50 $\pm$ 0,49	5,60 $\pm$ 1,57	91,61 $\pm$ 22,10	74,0 $\pm$ 1,6
<i>Hypsiboas polytaenius</i>	10	1,12 $\pm$ 0,11	5,46 $\pm$ 1,86	55,23 $\pm$ 20,50	78,5 $\pm$ 2,1
<i>Proceratophrys boiei</i>	10	11,96 $\pm$ 1,87	2,35 $\pm$ 0,39	128,36 $\pm$ 25,17	77,1 $\pm$ 1,6
<i>Leptodactylus notoaktites</i>	3	12,09 $\pm$ 1,13	2,53 $\pm$ 0,60	-	-
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	7	4,46 $\pm$ 1,57	1,70 $\pm$ 0,35	33,26 $\pm$ 6,74	84,1 $\pm$ 3,5
<i>Physalaemus olfersii</i>	7	2,96 $\pm$ 0,65	2,85 $\pm$ 0,46	20,41 $\pm$ 4,70	81,2 $\pm$ 4,6
<i>Physalaemus spiniger</i>	8	0,50 $\pm$ 0,08	2,63 $\pm$ 0,62	-	-
<i>Rhinella ornata</i>	9	15,20 $\pm$ 3,00	4,43 $\pm$ 0,51	76,18 $\pm$ 23,80	81,7 $\pm$ 2,1
<i>Rhinella icterica</i>	10	94,85 $\pm$ 21,20	1,16 $\pm$ 0,28	182,80 $\pm$ 56,09	81,3 $\pm$ 4,0
<i>Rhinella schneideri</i>	9	78,48 $\pm$ 21,35	1,96 $\pm$ 0,71	223,55 $\pm$ 56,77	79,2 $\pm$ 2,4

N: número de indivíduos utilizados na coleta de dados; **RPAE**: resistência da pele à perda de água por evaporação; **TR**: taxa de reidratação; **SDLD**: sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação.

Tabela 2: Média $\pm$ desvio padrão das variáveis climáticas relacionadas à temperatura extraídas dos pontos de ocorrência de 17 espécies de anuros.

Espécie	N	TM (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	ST (°C)
<i>Dendropsophus microps</i>	55	18,1 $\pm$ 2,2	26,5 $\pm$ 2,2	8,6 $\pm$ 2,7	2,7 $\pm$ 0,4
<i>Dendropsophus minutus</i>	579	21,9 $\pm$ 2,9	30,2 $\pm$ 2,7	12,2 $\pm$ 3,4	1,9 $\pm$ 0,9
<i>Scinax rizibilis</i>	39	18,8 $\pm$ 2,0	27,6 $\pm$ 2,0	9,1 $\pm$ 2,1	2,9 $\pm$ 0,3
<i>Scinax crospedospilus</i>	31	18,8 $\pm$ 2,1	26,8 $\pm$ 2,2	9,2 $\pm$ 2,4	2,4 $\pm$ 0,3
<i>Scinax hayii</i>	76	19,1 $\pm$ 2,3	26,9 $\pm$ 2,4	9,7 $\pm$ 2,9	2,4 $\pm$ 0,3
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	540	21,7 $\pm$ 2,3	29,8 $\pm$ 2,3	11,5 $\pm$ 2,5	2,0 $\pm$ 0,6
<i>Hypsiboas faber</i>	169	20,1 $\pm$ 2,3	28,5 $\pm$ 2,0	10,8 $\pm$ 3,2	2,5 $\pm$ 0,5
<i>Hypsiboas bischoffi</i>	59	17,9 $\pm$ 1,9	26,6 $\pm$ 1,8	8,3 $\pm$ 2,1	2,9 $\pm$ 0,3
<i>Hypsiboas polytaenius</i>	33	19,0 $\pm$ 2,2	26,9 $\pm$ 2,2	9,2 $\pm$ 2,9	2,2 $\pm$ 0,2
<i>Proceratophrys boiei</i>	121	18,6 $\pm$ 2,0	26,7 $\pm$ 2,1	9,2 $\pm$ 2,6	2,5 $\pm$ 0,4
<i>Leptodactylus notoaktites</i>	29	19,2 $\pm$ 2,1	28,0 $\pm$ 2,1	9,4 $\pm$ 2,2	3,0 $\pm$ 0,3
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	283	23,4 $\pm$ 1,6	31,3 $\pm$ 1,6	13,0 $\pm$ 2,6	1,9 $\pm$ 0,6
<i>Physalaemus olfersii</i>	77	18,1 $\pm$ 1,9	26,3 $\pm$ 2,2	8,6 $\pm$ 2,0	2,6 $\pm$ 0,3
<i>Physalaemus spiniger</i>	16	21,8 $\pm$ 0,9	30,3 $\pm$ 0,8	12,6 $\pm$ 1,4	3,0 $\pm$ 0,2
<i>Rhinella ornata</i>	113	20,2 $\pm$ 1,9	28,1 $\pm$ 2,0	10,7 $\pm$ 2,4	2,5 $\pm$ 0,3
<i>Rhinella icterica</i>	163	18,6 $\pm$ 2,2	27,0 $\pm$ 2,3	9,1 $\pm$ 2,4	2,7 $\pm$ 0,4
<i>Rhinella schneideri</i>	143	22,8 $\pm$ 1,9	30,7 $\pm$ 1,9	12,4 $\pm$ 2,3	2,0 $\pm$ 0,5

N: número de pontos de ocorrência obtidos para cada espécie; **TM:** temperatura média anual; **Tmax:** temperatura máxima do mês mais quente do ano; **Tmin:** temperatura mínima do mês mais frio do ano; **ST:** sazonalidade da temperatura. (considerada como o desvio padrão das temperaturas mensais médias).

Tabela 3: Média $\pm$ desvio padrão das variáveis climáticas relacionadas ao nível de precipitação extraídas dos pontos de ocorrência de 17 espécies de anuros.

Espécie	N	PA (mm)	Pmax (mm)	Pmin (mm)	SP (mm)
<i>Dendropsophus microps</i>	55	1586 $\pm$ 372	231 $\pm$ 52	58 $\pm$ 25	47 $\pm$ 15
<i>Dendropsophus minutus</i>	579	1489 $\pm$ 295	245 $\pm$ 54	32 $\pm$ 35	64 $\pm$ 24
<i>Scinax rizibilis</i>	39	1514 $\pm$ 330	213 $\pm$ 43	61 $\pm$ 19	42 $\pm$ 12
<i>Scinax crospedospilus</i>	31	1624 $\pm$ 420	255 $\pm$ 46	44 $\pm$ 25	59 $\pm$ 12
<i>Scinax hayii</i>	76	1765 $\pm$ 413	271 $\pm$ 44	51 $\pm$ 26	57 $\pm$ 13
<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	540	1411 $\pm$ 243	250 $\pm$ 47	22 $\pm$ 22	72 $\pm$ 17
<i>Hypsiboas faber</i>	169	1516 $\pm$ 353	222 $\pm$ 49	55 $\pm$ 33	49 $\pm$ 21
<i>Hypsiboas bischoffi</i>	59	1612 $\pm$ 358	217 $\pm$ 42	72 $\pm$ 32	39 $\pm$ 17
<i>Hypsiboas polytaenius</i>	33	1593 $\pm$ 362	273 $\pm$ 47	34 $\pm$ 27	68 $\pm$ 17
<i>Proceratophrys boiei</i>	121	1547 $\pm$ 272	245 $\pm$ 47	47 $\pm$ 20	56 $\pm$ 15
<i>Leptodactylus notoaktites</i>	29	1462 $\pm$ 202	212 $\pm$ 34	56 $\pm$ 17	45 $\pm$ 13
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	283	1345 $\pm$ 216	236 $\pm$ 35	18 $\pm$ 10	72 $\pm$ 11
<i>Physalaemus olfersii</i>	77	1614 $\pm$ 308	246 $\pm$ 47	53 $\pm$ 18	52 $\pm$ 11
<i>Physalaemus spiniger</i>	16	1856 $\pm$ 391	269 $\pm$ 66	69 $\pm$ 15	45 $\pm$ 5
<i>Rhinella ornata</i>	113	1640 $\pm$ 430	249 $\pm$ 45	50 $\pm$ 24	56 $\pm$ 11
<i>Rhinella icterica</i>	163	1653 $\pm$ 326	234 $\pm$ 50	65 $\pm$ 32	45 $\pm$ 19
<i>Rhinella schneideri</i>	143	1368 $\pm$ 225	237 $\pm$ 40	21 $\pm$ 14	69 $\pm$ 12

N: número de pontos de ocorrência obtidos para cada espécie; **PA:** precipitação anual acumulada; **Pmax:** precipitação acumulada do mês mais chuvoso; **Pmin:** precipitação acumulada do mês menos chuvoso; **SP:** sazonalidade da precipitação (considerado como o coeficiente de variação da precipitação média mensal).

Tabela 4: Fatores retidos na análise de componentes principais das variáveis ambientais extraídas dos pontos de ocorrência das espécies estudadas.

Variáveis Climáticas	16 espécies*		13 espécies *	
	C1	C2	C1	C2
TM	0,883	-0,062	0,976	-0,126
Tmax	0,812	-0,212	0,954	-0,256
Tmin	0,938	-0,192	0,948	-0,145
ST	-0,921	-0,135	-0,961	-0,112
PA	-0,677	0,593	-0,856	0,383
Pmax	0,239	0,966	0,169	0,982
Pmin	-0,960	-0,089	-0,969	-0,132
SP	0,839	0,440	0,818	0,525
Eigenvalues	5,309	1,590	6,054	1,519
% da variação explicada	66,36	19,87	75,68	18,99

TM: temperatura média anual; **Tmax:** temperatura máxima do mês mais quente do ano; **Tmin:** temperatura mínima do mês mais frio do ano; **ST:** sazonalidade da temperatura; **PA:** precipitação anual acumulada; **Pmax:** precipitação acumulada do mês mais chuvoso; **Pmin:** precipitação acumulada do mês menos chuvoso; **SP:** sazonalidade da precipitação; **C1:** componente 1; **C2:** componente 2; *: duas análises de componentes principais realizadas para o conjunto de 16 espécies e para o conjunto de 13 espécies, de acordo com as variáveis fisiológicas disponíveis. Os valores destacados em negrito representam os maiores pesos de cada variável.

Tabela 5: Resultado das regressões filogenéticas testando o efeito dos componentes climáticos sobre as variáveis fisiológicas corrigidas pela massa corpórea.

Variável	Modelo Evolutivo	Fator	Inclinação	P
SDLD	$\lambda = 0,124$	Intercepto	-0,002	0,684
		C1	0,010	0,043
		C2	0,006	0,193
RPAE	$\lambda = 0,175$	Intercepto	0,010	0,848
		C1	-0,045	0,361
		C2	-0,018	0,717
TR	$\lambda = 1,119$	Intercepto	-0,002	0,984
		C1	0,054	0,001
		C2	-0,035	0,308

SDLD: sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação; **RPAE:** resistência da pele à perda de água por evaporação; **TR:** taxa de reidratação; **C1:** componente 1; **C2:** componente 2. Os valores significativos ($P \leq 0,05$) estão destacados em negrito.

CAPÍTULO II

**Poderiam ser as diferenças em distribuição geográfica em sapos
associadas a variações fisiológicas?**

**Are the differences in geographical distribution of toads associated to
physiological variation?**

Braz Titon Junior¹ e Fernando Ribeiro Gomes¹

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo: A disponibilidade hídrica e a temperatura são os fatores mais consistentes na determinação da riqueza de espécies de anfíbios, a qual aumenta em direção ao equador e, particularmente, nas florestas tropicais úmidas. Esse padrão deve estar associado a características fisiológicas gerais dos anfíbios, tais como a manutenção de uma alta permeabilidade cutânea e a influência da temperatura e do nível de hidratação na execução de padrões comportamentais de relevância ecológica como forrageamento, busca de parceiros sexuais e fuga de predadores. Assim, foi realizado um estudo comparativo da resistência à perda de água por evaporação, taxas de reidratação a partir de água livre, e sensibilidade do desempenho locomotor à variações na temperatura e níveis de hidratação em cinco espécies de bufonídeos (*Rhinella granulosa*, *R. jimi*, *R. ornata*, *R. schneideri* e *R. icterica*) que habitam diferentes biomas brasileiros. As hipóteses testadas foram de que, quando comparadas a espécies que habitam ambientes mais mésicos, as espécies que vivem em áreas mais quentes e secas devam apresentar (1) maior resistência à perda de água por evaporação, (2) maiores taxas de absorção de água, (3) menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, e (4) menor sensibilidade do desempenho locomotor a temperaturas mais altas e maior sensibilidade do mesmo a temperaturas mais baixas. A análise comparativa mostrou uma relação alométrica positiva das taxas de reidratação com massa corpórea, sugerindo uma coevolução dessas variáveis. Adicionalmente, as hipóteses relacionadas ao desempenho locomotor foram corroboradas, sugerindo tanto uma adaptação da locomoção às variações da temperatura impostas pelo ambiente onde as espécies ocorrem, quanto às possíveis restrições hídricas do mesmo.

Palavras chave: *Rhinella*, resistência à perda de água por evaporação, desempenho locomotor, taxas de reidratação, temperatura, locais de ocorrência.

Abstract: Water availability and temperature are the most consistent factors determining amphibian species richness, which increases toward the equator and, particularly, at the wet tropical forests. This pattern might be associated to general physiological traits of amphibians, such as high cutaneous permeability and the influence of temperature and hydration level on the performance of ecologically relevant behavioral patterns like foraging, sexual partners seek and predator escape. In this way, a comparative study of resistance to evaporative water loss, rehydration rates and sensitivity of locomotor performance to variations on hydration level and temperature were performed for five species of bufonidae toads (*Rhinella granulosa*, *R. jimi*, *R. ornata*, *R. schneideri* and *R. icterica*) inhabiting different Brazilian biomes. The hypothesis tested were that, when compared to species inhabiting mesic environments, the species living at hot and dry areas would show (1) higher resistance to evaporative water loss, (2) higher rates of water uptake, (3) lower sensitivity of locomotor performance to dehydration and (4) lower sensitivity of locomotor performance at higher temperatures and higher sensitivity of locomotor performance at lower temperatures. This comparative analysis showed an allometric relation between rehydration rates and body mass, suggesting a coevolution between these two variables. Moreover, the hypotheses related to the locomotor performance were corroborated, suggesting adaptation of locomotor performance to both temperature variation imposed from the environment where they inhabit and its water restrictions.

Keywords: *Rhinella*, resistance to evaporative water loss, locomotor performance, rehydration rates, temperature, occurrence points.

Introdução

O padrão de distribuição da riqueza de espécies observado em endotérmicos é de aumento em direção ao equador, devido a restrições energéticas (Orme *et al.* 2005, Ceballos *et al.* 2005). Já para os anfíbios, apesar de um padrão de distribuição de riqueza de espécies muito similar, a disponibilidade hídrica e a temperatura são os fatores mais importantes na determinação do padrão (Buckley & Jetz 2007). Acredita-se que esta estreita relação entre a riqueza de espécies de anfíbios e a disponibilidade hídrica encontra-se associada ao seu tegumento, que por representar um importante órgão de trocas gasosas, apresenta uma alta permeabilidade expondo estes animais a um alto risco de desidratação em ambiente terrestre (Hillyard *et al.* 1998, McNab 2002). Adicionalmente, em ectotérmicos, a temperatura ambiental influencia taxas de uso e assimilação energética (Bennett 1990). Apesar de essa influência ser tamponada por comportamentos de termorregulação em ectotérmicos, para os anfíbios em particular, ela pode ser limitada pelo efeito de resfriamento causado pela perda evaporativa de água (Hutchinson & Dupe 1992, Buckley & Jetz 2007).

Tanto ajustes estruturais e fisiológicos quanto comportamentais podem interagir ao longo da história evolutiva de diferentes grupos na determinação da regulação do balanço hídrico e seu potencial de colonização (Rogowitz *et al.* 1999, Seebacher & Alford 2002, Young *et al.* 2005, Tingley & Shine 2011). A seleção de micro-habitats como abrigo, por exemplo, representa uma importante via comportamental para economia de água (Zug & Zug 1979, Schwarzkopf & Alford 1996, Tingley & Shine 2011). A grande flexibilidade no comportamento de busca por abrigos e os padrões de locomoção conforme a disponibilidade hídrica são algumas das principais vantagens do sucesso de *R. marina* na colonização de novos ambientes, incluindo ambientes áridos (Seebacher & Alford 2002, Tingley & Shine 2011). Outra característica comumente associada à ocupação de ambientes com menor disponibilidade hídrica é o aumento da resistência da pele à perda de água (Lillywhite 2006).

Estudos têm demonstrado padrões de variação interespecífica da resistência à perda evaporativa de água com hábito em anuros, sendo que as espécies arbóreas apresentam uma maior resistência à perda de água quando comparados a espécies terrestres e aquáticas (Wygoda 1984, Young *et al.* 2005). Adicionalmente, quando desidratados, os anuros captam água principalmente através da mancha pélvica, uma região especializada da pele ventral caracterizada por alta permeabilidade e rica vascularização (Boutilier *et al.* 1992). Alguns autores têm relatado taxas mais elevadas de reidratação em espécies terrestres quando comparados a espécies aquáticas, ou de ambientes áridos em oposição a ambientes mais úmidos (Bentley *et al.* 1958, Warburg 1972, Christensen 1974, van Berkum *et al.* 1982). Outros estudos mostraram também que, em comparação com anuros desidratados de ambientes úmidos, espécies que habitam áreas mais áridas têm níveis mais elevados de capilarização da mancha pélvica e maior fluxo sanguíneo nesta região (Roth 1973, Viborg & Rosenkilde 2004, Viborg & Hillyard 2005, Viborg *et al.* 2006, Suzuki *et al.* 2007).

Variações em temperatura e nível de hidratação afetam tanto o desempenho locomotor de alta intensidade e curta duração quanto de resistência em anfíbios, sendo o padrão geral a redução do desempenho com a queda em temperatura corpórea e com a desidratação (Moore & Gatten 1989, Bennett 1990, Rome *et al.* 1992). Tais efeitos podem acarretar em redução na habilidade de executar padrões comportamentais de clara relevância ecológica, tais como captura de presas, fuga de predadores e busca ativa de parceiros sexuais (Moore & Gatten 1989). Padrões de variação interpopulacional e interespecífica em sensibilidade térmica do desempenho locomotor condizentes com adaptação à manutenção de atividade a baixas temperaturas têm sido demonstrados através de comparações latitudinais (John-Alder *et al.* 1988, Wilson 2001) e altitudinais (Navas 1996), bem como padrões de adaptação do desempenho locomotor a altas temperaturas expressos ao longo da ontogenia (Navas *et al.* 2004). Preest & Pough (1989) mostraram ainda que a temperatura corpórea e a desidratação

têm efeito sinérgico sobre o desempenho locomotor em *Anaxyrus americanus*, sendo que o desempenho de animais completamente hidratados ou ligeiramente desidratados aumentou proporcionalmente ao aumento da temperatura, e o desempenho máximo de animais com maior nível de desidratação mudou em direção a temperaturas mais baixas (Preest & Pough 1989). Além disso, alguns estudos interespecíficos demonstraram que espécies mais comumente encontradas em áreas abertas e com maiores temperaturas apresentam menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação a temperaturas mais altas, quando comparadas a espécies filogeneticamente próximas, mas que habitam ambientes florestados e com temperaturas mais amenas (Beuchat *et al.* 1984, Titon *et al.* 2010).

Embora diversos aspectos do balanço hídrico e da sensibilidade do desempenho locomotor à variação térmica e de hidratação venham sendo associados com diversidade de distribuição geográfica, aspectos do microambiente e hábito, estas associações têm sido tratadas de forma relativamente isoladas na literatura. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar possíveis relações interespecíficas entre variação em características fisiológicas (resistência à perda de água por evaporação, taxas de reidratação a partir de água livre, e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação e a diferentes temperaturas) com diferenças climáticas associadas à distribuição geográfica, através de uma abordagem comparativa de bufonídeos encontrados em diferentes biomas. As hipóteses testadas foram as de que as espécies cuja distribuição geográfica é associada a ambientes com temperaturas mais altas e sazonalmente mais uniformes e nível de precipitação menor e sazonalmente mais concentrado, como Cerrado e Caatinga, quando comparadas à espécies cuja distribuição geográfica é associada a ambientes com temperaturas mais baixas e mais variáveis sazonalmente e uma precipitação maior e sazonalmente menos variável, como a Mata Atlântica, devem apresentar: 1) maior sensibilidade do desempenho locomotor em temperaturas mais baixas e menor sensibilidade a temperaturas mais altas; 2) menor

sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação; 3) maior resistência da pele à perda de água por evaporação; 4) maiores taxas de reidratação a partir de uma superfície de água livre.

Materiais e Métodos

Sítios de estudo e espécies incluídas

Foram coletados machos de cinco espécies de bufonídeos do gênero *Rhinella*, em quatro diferentes localidades no Brasil. Indivíduos de *Rhinella granulosa* e *R. jimi* foram coletados na Fazenda São Miguel, Angicos, RN (5°30'43"S; 36°36'18"W), entre os dias 6 e 18 de Outubro de 2011. Indivíduos de *R. ornata* foram coletados em um lago artificial ao lado do Departamento de Fisiologia do IB-USP (46°43'50"S; 23°33'53"W), no dia 23 de Outubro de 2012. Indivíduos de *R. schneideiri* foram coletados na zona rural próxima ao Município de Luiz Antônio (47°39'16"S; 21°33'05"W), entre os dias 25 e 27 de Fevereiro de 2013. Finalmente, indivíduos de *R. icterica* foram coletados na zona rural próxima ao Município de São Luiz do Paraitinga (23°10'06"S; 45°17'07"W), entre os dias 05 e 10 de Novembro de 2013. Os animais foram coletados através de busca ativa e coleta manual, sob a licença de captura e transporte do IBAMA (processo número 02010.003380/04-82).

Os animais foram mantidos em recipientes plásticos individuais, substrato úmido e algum tipo de refúgio. As tampas dos recipientes tinham uma tela para permitir a circulação de ar. A temperatura foi mantida entre 23°C e 25°C, com ciclo natural de claro/escuro, e os animais foram alimentados com larvas de tenébrio e baratas, conforme o seu tamanho. Os testes descritos a seguir tiveram início no dia seguinte à chegada dos animais no laboratório, sendo finalizados em até 21 dias após a chegada dos animais a fim de evitar possíveis efeitos de permanência em biotério. Os procedimentos de manutenção dos animais e coleta de dados

foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (processo número 120/2010-CEUA).

Resistência da pele à perda de água por evaporação

Animais 100% hidratados foram mantidos por duas horas em uma sala com temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) e acondicionados no interior de recipientes plásticos com um substrato úmido por duas horas antes do teste, para prevenir perda de água corpórea e garantir uma hidratação completa. Após este período, os indivíduos tiveram suas bexigas urinárias esvaziadas, sendo em seguida secos com papel absorvente, pesados (0,01 g) e colocados no interior de uma câmara de acrílico com entrada e saída de ar. Para as medidas de taxas de perda de água por evaporação, foi utilizado um sistema de fluxo aberto. Um fluxo de ar positivo constante ($10 \text{ cm}^3.\text{s}^{-1}$) foi gerado por um conjunto de bomba de ar associado a um fluxímetro de massa (SS-3 Subampler – Sable Systems) e mantido a uma umidade relativa entre 10 e 15% através de um filtro de sílica gel. O fluxo de ar foi então encaminhado para três câmaras distintas: uma câmara vazia; uma contendo o indivíduo experimental; e uma contendo um modelo de agar 3%. O ar que saía de cada uma das câmaras era encaminhado, através de um direcionador de fluxo (RM8 – Intelligent Multiplexer), para um analisador de vapor de água (RH – 300 RH/Dewpoint Analyzer – Sable Systems). Um sistema de interface (UI-2 Data Acquisition Interface – Sable Systems) acoplado a um computador permitiu registros contínuos de fluxo e densidade de vapor de água a cada segundo. Foram utilizados para os cálculos os registros de indivíduos que permaneceram na postura de conservação de água por 20 minutos consecutivos. Nos cálculos de perda de água por evaporação não foram diferenciadas as perdas pela pele e pelo trato respiratório, já que estudos anteriores demonstraram que esta última não é significativa em anuros (Spotila & Berman 1976, Bentley & Yorio 1979, Wygoda 1984).

As taxas de perda de água por evaporação foram calculadas a partir da formula:

$$TD = F_a DVA_a - F_v DVA_v$$

Onde TD representa a taxa de perda de água por evaporação absoluta ($\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$); F_a e F_v representam o fluxo de ar ($\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), respectivamente na câmara contendo o animal e na câmara vazia; e DVA_a e DVA_v representam a densidade do vapor de água, ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$), do ar que deixa respectivamente a câmara contendo o animal e a câmara vazia. O cálculo da taxa de perda de água por evaporação por área de exposição foi realizado dividindo-se a taxa de perda de água por evaporação absoluta por dois terços da superfície corpórea total dos animais, que segundo Withers e colaboradores (1982), é a porção que se mantém exposta enquanto os animais se encontram na postura de conservação de água. A área de superfície total foi considerada a partir de McClanahan & Baldwin (1969):

$$SA = 9,9M^{0,56}$$

Onde SA representa a área de superfície total (cm^2), e M representa a massa corpórea do animal (g).

A resistência à perda de água por evaporação é composta por dois componentes de resistência: a resistência da pele (R_i) e a resistência da camada de vapor de água na superfície da pele (R_b), resultando numa resistência total (R_t) (Spotila & Berman 1976, Wygoda 1984, 1988).

$$R_i = R_t - R_b$$

Para se determinar a resistência da pele foram utilizados os registros dos animais que mantiveram a postura de conservação de água, os quais fornecem os dados de resistência total (R_t). Os registros dos modelos de agar 3%, confeccionados para as diferentes espécies e mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente para as medidas de taxa de perda de água por evaporação, fornecem os dados de resistência da camada de vapor de água na superfície (R_b), já que o agar perde água como uma superfície de água livre (Spotila &

Berman 1976). Estes modelos de agar foram confeccionados a partir de contra-moldes de alginato feitos usando-se indivíduos das diferentes espécies. Ambas as resistências foram calculadas a partir da fórmula:

$$R = (DVA_s - DVA_a) / TD_a$$

Onde R representa a resistência à perda de água por evaporação (s.cm^{-1}); DVA_s representa a densidade do vapor de água saturado ($\mu\text{g.cm}^{-3}$) na superfície da pele do animal; DVA_a representa a densidade do vapor de água ($\mu\text{g.cm}^{-3}$) do ar que deixa a câmara contendo o animal ou o modelo de agar; e por fim, TD_a representa a taxa de perda de água por evaporação por área de exposição ($\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A densidade do vapor de água saturado foi calculada utilizando-se a lei dos gases ideais, a partir da temperatura da superfície da pele dos animais medida através do uso de termômetros infravermelhos digitais (TR-300, Equitherm) ao final de cada teste. Todo o sistema utilizado no registro foi mantido em uma Estufa Tipo Sala Climatizada/Fitotron (Eletrolab, modelo 011 com 4x2m) com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Sensibilidade do desempenho locomotor à temperatura

O desempenho locomotor dos animais foi medido em uma Estufa Tipo Sala Climatizada/Fitotron (Eletrolab, modelo 011 com 4x2m), em sete diferentes temperaturas ($\pm 1^{\circ}\text{C}$): 10°C , 15°C , 20°C , 25°C , 30°C , 35°C e 40°C . Anteriormente às medidas, os animais foram individualmente mantidos por 2 horas em recipientes plásticos com substrato úmido até que a temperatura da superfície corpórea atingisse a temperatura do teste. A manutenção de substrato úmido durante o período de ajuste inicial é fundamental para prevenir a perda de água corpórea antes do início do teste. Após este período, os animais tiveram suas bexigas urinárias esvaziadas e, em seguida, foram secos com papel absorvente e tiveram suas massas medidas ($\pm 0,01\text{g}$).

Em seguida, os animais foram estimulados a saltar em uma pista circular com 1,5m de diâmetro através de leves toques na região posterior do corpo, durante 10 min. As distâncias percorridas neste percurso foram medidas e divididas pelo comprimento rostro-cloacal do indivíduo. Estas medidas foram consideradas como desempenho locomotor do animal em cada uma das temperaturas. Para evitar algum efeito adicional de fadiga devido a repetições, cada indivíduo foi submetido a apenas um teste de locomoção por dia. Além disso, a ordem das temperaturas de teste foi aleatorizada entre as espécies, bem como a ordem dos indivíduos foi aleatorizada em cada dia de teste.

Para determinar a sensibilidade térmica do desempenho locomotor foi utilizado o coeficiente de temperatura, que determina a taxa de variação de um sistema biológico em consequência do aumento da temperatura de 10°C segundo a fórmula:

$$Q_{10} = \left(\frac{DL_2}{DL_1} \right)^{10/(T^{\circ}C_2 - T^{\circ}C_1)}$$

Onde Q_{10} é o coeficiente de temperatura; DL_1 é o desempenho locomotor na temperatura mais baixa; DL_2 é o desempenho locomotor na temperatura mais alta; $T^{\circ}C_1$ é a temperatura mais baixa; e $T^{\circ}C_2$ é a temperatura mais alta.

Sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação

Para avaliar a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, o protocolo de desempenho descrito no item anterior foi aplicado em uma mesma temperatura ($25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$) e cinco diferentes níveis de hidratação dos indivíduos (100%, 90%, 80%, 75% e 70%). Para tal, como anteriormente, os animais foram individualmente mantidos em recipientes plásticos com substrato úmido por duas horas antes do teste. Após este período, os animais tiveram suas bexigas urinárias esvaziadas e, em seguida, foram secos com papel absorvente e tiveram suas massas medidas ($\pm 0,01g$). Esta medida de massa foi considerada padrão, ou seja, com os

indivíduos 100% hidratados. Em seguida, os indivíduos foram submetidos ao protocolo de locomoção.

Após o teste de locomoção 100% hidratados, os animais foram individualmente retornados a seus recipientes de manutenção e privados de água, permitindo uma perda evaporativa de água natural. Os animais foram mantidos dentro da Estufa Tipo Sala Climatizada/Fitotron (Eletrolab, modelo 011 com 4x2m) com temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($40\% \pm 1\%$) constantes. Tal tratamento, adicionado à aplicação ocasional de panos úmidos sobre as telas das tampas, permitiu o ajuste das taxas de perda de água por evaporação para valores próximos a 10% da massa corpórea padrão por dia.

A redução da massa corpórea foi monitorada e, cada vez que os animais reduziam em 10% de sua massa corpórea padrão, o teste de desempenho locomotor era repetido até que eles alcançassem 80% da massa corpórea padrão. A partir deste ponto, os testes foram repetidos cada vez que os animais reduzissem 5% de sua massa corpórea padrão, porém mantendo o mesmo intervalo de aproximadamente 24 horas entre os testes. Para reduzir a taxa de perda de água, a aplicação de panos úmidos sobre a tela das tampas passou a ser mais intensa.

Para analisar a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, inicialmente os dados de distância percorrida foram relativizados para cada indivíduo, sendo a maior distancia, independentemente do nível de hidratação, considerada como o desempenho locomotor máximo. O desempenho locomotor referente aos demais níveis de hidratação foram relativizados como porcentagens do desempenho locomotor máximo. Em seguida, foi construído um gráfico para cada indivíduo onde os níveis de hidratação foram colocados no eixo das abscissas e as porcentagens do desempenho locomotor máximo correspondentes no eixo das ordenadas. Esses pontos foram então interligados empiricamente para a extrapolação

do valor do nível de hidratação cujo desempenho locomotor atingiu 70% do desempenho locomotor máximo para cada indivíduo (Beuchat *et al.* 1984, Titon *et al.* 2010).

Taxas de reidratação a partir de água livre

Os animais com níveis de hidratação próximos a 70%, provenientes do protocolo de desidratação descrito anteriormente, foram colocados em recipientes de tamanho compatível com a massa dos indivíduos e contendo água de torneira filtrada em um nível suficiente para que os animais mantivessem somente a região ventral em contato com a água. Em intervalos de 2 minutos, esses animais eram retirados da água, secos com papel absorvente e pesados (0,01 g) novamente, por sete vezes consecutivas. A taxa de reidratação absoluta ($\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$) foi estimada a partir da regressão do ganho de massa corpórea pelo tempo. Para a obtenção da taxa de reidratação por área, foi utilizada a formula proposta por McClanahan & Baldwin (1969), porém considerando-se um terço da área corpórea total, o que representa a região ventral que esta exposta à água durante a reidratação que segundo Withers e colaboradores (1982), é a porção que se mantém em contato com o substrato enquanto os animais se encontram na postura de conservação de água.

Dados climáticos e ocorrência das espécies

As coordenadas geográficas de pontos de ocorrência das espécies foram obtidas na base de dados digital do projeto SpeciesLink (<http://splink.cria.org.br/>). Para cada coordenada geográfica foram obtidos dados médios entre os anos 1950 e 2000 de oito variáveis climáticas: temperatura média anual, temperatura máxima do mês mais quente do ano, temperatura mínima do mês mais frio do ano, sazonalidade da temperatura, precipitação anual acumulada, precipitação acumulada do mês mais chuvoso, precipitação acumulada do mês menos chuvoso e sazonalidade da precipitação. Os dados climáticos foram extraídos da base

de dados digital Wordclim (<http://www.worldclim.org>) com uma resolução de 1 km² (Hijmans *et al.* 2005) através do software DIVA-GIS (Hijmans *et al.* 2001) versão 7.5.0.0.

Relações filogenéticas

Uma árvore filogenética com proposta de tempo de divergência foi compilada a partir de Maciel *et al.* (2010) para as espécies incluídas no presente estudo (Figura 1). A proposta filogenética de Maciel *et al.* (2010) foi baseada em dados moleculares e morfológicos, porém, estes últimos provavelmente não se encontram relacionados com as variáveis fisiológicas consideradas no presente estudo. Desta forma, confiamos na independência entre os dados coletados no presente estudo e aqueles utilizados para a construção da hipótese filogenética utilizada em sua análise.

Análise estatística

A estatística descritiva foi realizada para todas as variáveis fisiológicas e climáticas por espécie. Os dados foram então transformados em Log₁₀ para posteriores análises. As diferenças interespecíficas de massa corpórea e das variáveis fisiológicas, bem como da sensibilidade térmica em cada intervalo de temperatura testado, foram avaliadas através de uma série de ANOVAs tendo espécies como fator, seguidas de testes *a posteriori* de pares de médias com ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas. Adicionalmente, foram realizadas ANOVAs para medidas repetidas para avaliar as diferenças intraespecíficas na sensibilidade térmica do desempenho locomotor em cada faixa de temperatura testada. Uma análise de componentes principais foi realizada utilizando-se os parâmetros climáticos médios entre os pontos de ocorrência para cada espécie. Foram realizadas regressões filogenéticas para investigar possíveis efeitos da massa corpórea sobre as variáveis fisiológicas estudadas (Revell 2009). Posteriormente, estes dados corrigidos filogeneticamente para a massa

corpórea e foram incorporados como variáveis dependentes em regressões filogenéticas nas quais os scores dos componentes principais das variáveis climáticas entraram como fatores (Pagel 1992). As análises descritivas, as ANOVAs, os testes *a posteriori* de pares de médias com ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas e a análise de componentes principais foram realizadas através do software SPSS for Windows version 13.0. A árvore filogenética utilizada foi compilada através do software Mesquite version 2.75 (build 564) e as correções filogenéticas para massa corpórea e as regressões filogenéticas foram realizadas com o software R versão 3.0.2 (2013-09-25) com RStudio (versão 0.98.501).

Resultados

Variáveis Fisiológicas

A Tabela 1 traz as médias $\pm$ erro padrão das massas corpóreas, resistência à perda de água por evaporação e taxas de reidratação a partir de água livre para as diferentes espécies. Observamos uma diferença interespecífica quanto à massa corpórea ($F_{4,48}=140,291$, $P<0,001$), sendo que *R. granulosa* apresentou a menor massa corpórea ($P<0,001$), seguido por *R. ornata*, cuja massa foi maior do que a observada para *R. granulosa*, porém, menor do que as das demais espécies ($P<0,001$). Finalmente, *R. jimi*, *R. schneideri* e *R. icterica* tiveram as maiores massas corpóreas ($P<0,001$) sem diferir entre si ($P=1,000$). Existe ainda um efeito significativo de espécie para a resistência à perda de água por evaporação ($F_{4,48}=25,374$, $P<0,001$), sendo o maior valor observado para *R. ornata* ($P\leq 0,002$), não diferindo apenas de *R. granulosa* ($P=0,381$), que por sua vez só teve um valor maior do que o observado para *R. schneideri* e *R. icterica* ($P\leq 0,003$). Por fim, os menores valores de resistência a perda de água por evaporação foram observados para *R. icterica* ($P\leq 0,026$). As taxas de reidratação a partir de água livre também diferiram entre espécies ($F_{4,39}=76,019$, $P<0,001$). Assim como na massa corpórea, *R. granulosa* apresentou os menores valores ($P<0,001$), seguido por *R. ornata*, cuja

taxa de reidratação foi maior do que a observada para *R. granulosa*, porém, menor do que as das demais espécies ($P < 0,001$). Finalmente, *R. jimi*, *R. schneideri* e *R. icterica* tiveram as maiores taxas de reidratação ($P < 0,001$) e não diferiram entre si ($P \geq 0,993$).

Em uma primeira tentativa de testes de desempenho locomotor a 40°C para *R. ornata*, metade dos indivíduos (5 indivíduos) morreram quando foram mantidos por 2 horas nesta temperatura previamente ao teste. Sendo assim, descartamos os outros cinco indivíduos por não sabermos de possíveis danos, a médio-longo prazo causados pela exposição à alta temperatura para indivíduos desta espécie. Coletamos então novos indivíduos, e decidimos não realizar testes de desempenho locomotor a 40°C com *R. ornata*. Dado o observado com *R. ornata*, para as demais espécies, os dados de desempenho locomotor a 40°C foram coletados apenas após o término da coleta de dados de sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação e das taxas de reidratação. Dado que alguns indivíduos das outras espécies também não sobreviveram à desidratação mais intensa, seu N a 40°C também foi reduzido quando comparado às demais temperaturas. Adicionalmente, apenas dois e três indivíduos de *R. granulosa* e *R. jimi*, respectivamente, se locomoveram a 10°C, tornando assim o desempenho virtualmente igual a zero para estas espécies. Assim, tanto para a ANOVA interespecífica quanto para as regressões filogenéticas relativas à sensibilidade térmica da locomoção, foi utilizada somente a faixa de temperatura compreendida entre 15°C e 35°C, por ser a faixa onde existem dados para todas as espécies.

Nas Figuras 2 e 3 encontramos, respectivamente, as médias $\pm$ erro padrão do desempenho locomotor sustentado corrigido pelo comprimento rostro-cloacal em diferentes níveis de hidratação e o mesmo parâmetro em diferentes temperaturas. A Tabela 1 traz ainda as médias $\pm$ erro padrão da sensibilidade térmica da locomoção e da sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação para as diferentes espécies. Quanto à sensibilidade térmica da locomoção entre 15°C e 35°C, as espécies diferiram entre si ($F_{4,44}=63,785$,

$P < 0,001$), sendo que *R. granulosa* apresentou o maior valor de Q_{10} ($P < 0,001$), seguido de *R. jimi* ($P < 0,001$). *Rhinella schneideri* vem em terceiro lugar, porém não difere significativamente de *R. ornata* ($P = 1,000$), que vem em quarto lugar, diferindo apenas de *R. granulosa* e *R. jimi* ($P < 0,001$). Finalmente, *R. icterica* apresenta a menor sensibilidade térmica, não diferindo significativamente de *R. ornata* ($P = 0,135$). Houve ainda uma diferença significativa entre as espécies quanto à sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação ($F_{4,36} = 11,685$, $P < 0,001$), sendo que os menores valores observados para *R. granulosa* e para *R. jimi* ($P \leq 0,001$), enquanto os maiores valores foram observados para *R. ornata* e *R. icterica* ($P \leq 0,001$). *R. schneideri* apresentou valores intermediários de sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, sem diferir significativamente das demais espécies ($P \geq 0,069$).

Na Figura 4, encontramos a sensibilidade térmica em cada faixa de temperatura testada para as cinco espécies de Bufonídeos. Uma ANOVA intraespecífica apontou diferenças estatísticas da dependência térmica da locomoção entre as faixas de temperatura testadas para todas as espécies ($P < 0,001$). Já uma ANOVA interespecífica apontou diferenças da sensibilidade térmica entre as espécies nas faixas de temperatura entre 10°C e 15°C, 15°C e 20°C, 20°C e 25°C e entre 30°C e 35°C ($P \leq 0,015$). Tanto entre 25°C e 30°C quanto entre 35°C e 40°C, não se observa uma diferença da sensibilidade térmica do desempenho locomotor entre as espécies ($P \geq 0,155$). Porém, é importante ressaltar que esta análise entre 35°C e 40°C só foi realizada com *R. granulosa*, *R. jimi* e *R. schneideri*. Entre 10°C e 15°C, *R. jimi* apresentou maior sensibilidade térmica do desempenho locomotor ($P \leq 0,012$), seguida de *R. granulosa* ($P \leq 0,011$). Entre 15°C e 20°C, *R. granulosa* apresentou maior sensibilidade térmica do desempenho locomotor ($P \leq 0,003$), seguida de *R. jimi* ($P \leq 0,050$). *Rhinella ornata*, *R. schneideri* e *R. icterica* apresentaram valores mais baixos de sensibilidade térmica da locomoção que as demais espécies entre 10°C e 15°C e entre 15°C e 20°C, não diferindo entre si ($P \geq 0,126$). Entre 20°C e 25°C este padrão permanece, com *R. granulosa* e *R. jimi*

apresentando valores mais altos que as demais espécies ($P \leq 0,044$) e não diferentes entre si ($P = 0,105$), enquanto *R. ornata*, *R. schneideri* e *R. icterica* apresentaram os valores mais baixos, não diferindo entre si ($P = 1,000$). Entre 30°C e 35°C, a sensibilidade térmica do desempenho locomotor foi maior para *R. granulosa* que para *R. ornata* ($P \leq 0,028$) e *R. icterica* ($P \leq 0,032$), não diferindo das demais espécies ($P \geq 0,353$).

Variáveis climáticas

Na Tabela 2 e 3 encontram-se respectivamente as médias $\pm$ erro padrão das variáveis climáticas relacionadas à temperatura (temperatura anual média, temperatura média do mês mais quente, temperatura média do mês mais frio e a sazonalidade da temperatura) e à pluviosidade (precipitação anual acumulada, precipitação acumulada do mês mais chuvoso, precipitação acumulada do mês mais seco e a sazonalidade da precipitação).

Relações entre as variáveis climáticas

A análise de componentes principais reteve apenas um componente (Tabela 4) o qual explica 87,18% da variação total dos dados e representa uma relação direta entre temperatura média anual, temperatura máxima do mês mais quente do ano, temperatura mínima do mês mais frio do ano e sazonalidade da precipitação e uma relação inversa dessas variáveis com a sazonalidade da temperatura, precipitação anual acumulada, precipitação acumulada do mês mais chuvoso e a precipitação acumulada do mês menos chuvoso.

Alometria e relações entre as variáveis fisiológicas e o clima

Houve um efeito significativo da massa corpórea sobre as taxas de reidratação a partir de água livre ($TRAL = 1.039M^{0.674}$, $p < 0.001$) não havendo efeito sobre as demais variáveis

fisiológicas ($RPAE=0.904M^{-0.372}$, $p=0.189$; $SDLD=1.890M^{-0.003}$, $p=0.927$; $Q10=0.529M^{-0.090}$, $p=0.613$).

O componente retido na análise de componentes principais feita com os dados climáticos teve efeitos significativos, e em direções opostas, sobre a sensibilidade do desempenho locomotor a desidratação e sobre a sensibilidade térmica da locomoção, porém, não apresentou efeito significativo sobre as demais variáveis fisiológicas (Tabela 5).

Discussão

Os resultados mostram diferenças interespecíficas em todos os parâmetros estudados, sendo que parte desta variação corrobora as hipóteses inicialmente formuladas. A variação interespecífica na sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação e na sensibilidade térmica da locomoção guardam relações, em sentidos opostos, com as características climáticas associadas à distribuição geográfica destas cinco espécies de Bufonídeos. Este resultado corrobora as hipóteses iniciais de que espécies cuja distribuição geográfica é associada a ambientes com temperaturas mais altas e sazonalmente mais uniformes e nível de precipitação menor e sazonalmente mais concentrado, como a Caatinga, apresentam uma maior sensibilidade do desempenho locomotor em temperaturas mais baixas e menor sensibilidade com o aumento da temperatura, e uma menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, quando comparadas à espécie cuja distribuição geográfica é associada a ambientes com temperaturas mais baixas e mais variáveis sazonalmente e uma precipitação maior e sazonalmente menos variável, como a Floresta Atlântica. Esses padrões sugerem uma adaptação da locomoção às variações da temperatura impostas pelo ambiente, bem como às possíveis restrições hídricas do mesmo. Já a variação interespecífica em taxa de reidratação está diretamente relacionada com a massa corpórea, porém, não se encontra relacionada com as características ambientais das áreas de ocorrência das espécies, enquanto a

resistência à perda de água por evaporação não mostrou relações significativas com as variáveis estudadas.

Assim como ocorreu no presente estudo, uma análise comparativa abrangendo 13 espécies de anuros de diferentes famílias mostrou que a associação entre taxa de reidratação e massa corpórea permanece forte mesmo após correção filogenética. Estes resultados, em conjunto, sugerem que a relação alométrica positiva das taxas de reidratação pode representar uma adaptação associada ao déficit proporcionado pela baixa relação superfície/volume apresentada por espécies maiores, uma vez que estas necessitam absolutamente de mais água, porém, apresentam uma mancha pélvica relativamente menor (Capítulo I). De forma congruente, em Bufonídeos, o tempo gasto para atingir fluxo sanguíneo máximo na região da mancha pélvica é dependente da massa corpórea (Viborg & Hillyard 2005, Viborg *et al.* 2006). Já a relação entre as taxas de reidratação e as características ambientais dos locais de ocorrência das espécies não foi corroborada no presente estudo, diferentemente de padrões anteriormente descritos (Viborg & Hillyard 2005, Viborg *et al.* 2006, Capítulo I). Em um estudo realizado com outras espécies de Bufonídeos, a magnitude do fluxo de células sanguíneas na mancha pélvica foi maior em espécies encontradas em ambientes mais áridos quando comparada a espécies encontradas em ambientes mais méxicos (Viborg & Hillyard 2005, Viborg *et al.* 2006). Adicionalmente, as taxas de reidratação em anuros pertencentes a diferentes grupos filogenéticos foram maiores em espécies encontradas em ambientes caracterizados por temperaturas mais altas e sazonalmente mais uniformes e níveis de precipitações mais baixos e sazonalmente mais concentrados, quando comparados às de espécies encontradas em ambientes caracterizados por médias de temperaturas mais baixas e sazonalmente mais variáveis e uma precipitação em maior nível e sazonalmente mais bem distribuída (Capítulo I). O número relativamente baixo de espécies no presente estudo poderia

ser considerado um fator determinante da ausência de padrões entre as taxas de reidratação e características climáticas da ocupação ambiental.

A variação interespecífica em resistência da pele à perda de água por evaporação não apresentou uma relação significativa com a massa corpórea, assim como o observado em alguns estudos (Buttemer & Thomas 2003, Young *et al.* 2005). Outros estudos, porém, já demonstraram uma relação alométrica negativa entre essas variáveis, sugerindo que devido à relação superfície/volume, animais menores apresentam relativamente maiores taxas de desidratação e, portanto, uma maior pressão seletiva associada ao aumento da resistência à perda de água (Schmid 1965, Wygoda 1984, Withers *et al.* 1982, Capítulo I). No presente estudo, observamos uma grande sobreposição entre as relações filogenéticas e a variação em massa corpórea para as espécies estudadas. Este fator poderia, em certo nível, estar contribuindo para a ausência de relação entre a resistência à perda de água por evaporação e a massa corpórea. Além disso, os estudos citados que encontraram essa relação alométrica foram realizados com um grande número de espécies. Assim, a inclusão de um maior número de espécies poderia evidenciar melhor essa relação. Adicionalmente, a resistência da pele à perda de água por evaporação também não apresentou uma correlação significativa com as variáveis ambientais relacionadas à distribuição geográfica, corroborando outros estudos que também não encontraram tal relação (Littleford *et al.* 1947, Schmid 1965, Heatwole *et al.* 1969, Capítulo I). A relação mais comumente encontrada na literatura é entre a resistência a perda de água por evaporação e o hábito das espécies, evidenciando maiores valores para espécies de hábito arbóreo quando comparadas a terrestres e semiaquáticas (Wygoda 1984, Young *et al.* 2005).

A relação entre dependência térmica do desempenho locomotor e as características climáticas associadas à distribuição geográfica das espécies foi significativa, corroborando nossa hipótese inicial. Assim, as espécies coletadas no semiárido do Nordeste (*R. granulosa* e

R. jimi), que experimentam uma baixa variação térmica sazonal e médias de temperaturas mais altas, apresentam uma maior dependência térmica do desempenho locomotor, principalmente nas temperaturas mais baixas testadas, quando comparadas às espécies coletadas na Floresta Atlântica e no Cerrado no Sudeste, que experimentam uma variação sazonal maior da temperaturas, com valores médios inferiores. Esse padrão é semelhante ao observado por John-Alder e colaboradores (1988), em que espécies de anuros de maiores latitudes, e que se reproduzem durante as estações mais frias, apresentaram maior desempenho de salto a baixas temperaturas quando comparadas a espécies de latitudes mais baixas, e que se reproduzem durante estações mais quentes. Wilson (2001) também encontrou esse mesmo padrão ao comparar diferentes populações de *Limnodynastes peronii* provindas de diferentes latitudes na Austrália. Adicionalmente, os recém-metamorfoseados de populações de clima mais frio apresentaram maior desempenho a baixas temperaturas quando comparados aos de populações de climas mais amenos mesmo quando criados em laboratório, sob as mesmas condições de temperatura (Wilson 2001). Segundo o mesmo autor, esses resultados sugerem que as diferenças interpopulacionais observadas em *Limnodynastes peronii* devem ser, ao menos em parte, geneticamente determinadas. Por fim, comparando espécies tropicais de diferentes altitudes, Navas (1996) demonstrou que aquelas provenientes de altitudes mais elevadas e que experimentam temperaturas mais baixas apresentam uma maior taxa de consumo de oxigênio durante o exercício e um maior escopo metabólico a baixas temperaturas, quando comparadas a espécies congêneres de baixas altitudes e que experimentam temperaturas mais amenas. Assim, os resultados obtidos no presente estudo corroboram a ocorrência de um padrão de adaptação da locomoção a variações na temperatura em anuros, embora a contribuição de aspectos genéticos e de plasticidade fenotípica para o padrão encontrado permaneça por ser testada.

Adicionalmente, a relação da sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação com as características climáticas dos locais de ocorrência também foi significativa, corroborando a hipótese inicial. Espécies com uma distribuição geográfica associada a áreas caracterizadas por médias de temperaturas mais baixas e sazonalmente mais variáveis, e um maior nível de precipitação sazonalmente mais bem distribuída, apresentaram uma maior sensibilidade da locomoção a desidratação quando comparadas a espécies cuja distribuição abrange regiões caracterizadas por temperaturas maiores e sazonalmente mais uniformes e com menor nível de precipitação sazonalmente mais concentrada. Estes resultados corroboram ainda o estudo realizado por Titon e colaboradores (2010) com Bufonídeos brasileiros, incluindo agora espécies coletadas em um ambiente mais extremo, a Caatinga. Por outro lado, este resultado diverge do encontrado no Capítulo I, onde espécies com distribuição geográfica associada ao Cerrado apresentaram uma sensibilidade da locomoção à desidratação maior do que a observada por espécies com distribuição associada à Mata Atlântica. Segundo os autores, esse resultado poderia sugerir uma baixa ação seletiva sobre a sensibilidade da locomoção à desidratação nas espécies do cerrado, associada a uma maior concentração das suas atividades na época de maior precipitação, quando comparados aos anuros de Floresta Atlântica (Capítulo I). A inclusão de espécies de um ambiente comparativamente mais extremo, a Caatinga, caracterizada por chuvas raras e imprevisíveis, pode ter invertido essa relação no presente estudo, uma vez que os anuros deste bioma possivelmente se encontram sob uma forte seleção direcional de baixa sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação.

Assim, a análise comparativa realizada mostrou uma relação alométrica positiva das taxas de reidratação com a massa corpórea, sugerindo um padrão de coevolução destas variáveis. Adicionalmente, espécies de bufonídeos que habitam ambientes com temperaturas mais altas e sazonalmente mais uniformes e nível de precipitação menor e sazonalmente mais

concentrado, apresentam uma maior sensibilidade do desempenho locomotor em temperaturas mais baixas e menor sensibilidade com o aumento da temperatura, além de uma menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, quando comparadas à espécie cuja distribuição geográfica é associada a ambientes com temperaturas mais baixas e mais variáveis sazonalmente e uma precipitação maior e sazonalmente menos variável. Esses resultados sugerem tanto uma adaptação da locomoção às variações da temperatura impostas pelo ambiente onde as espécies ocorrem, bem como às possíveis restrições hídricas do mesmo.

Referências Bibliográficas

- Bennett AF (1990). Thermal-dependence of locomotor capacity. *Am J Physiol* 259:R253-R258.
- Bentley PJ, Yorio T (1979). Do frogs drink? *J Exp Biol* 79:41-44.
- Bentley PJ, Lee AK, Main AR (1958). Comparison of dehydration and hydration of two genera of frogs (*Heleioporus* and *Neobatrachus*) that live in areas of varying aridity. *J Exp Biol* 35:667-684.
- Beuchat CA, Pough FH, Stewart MM (1984). Response to simultaneous dehydration and thermal stress in three species of Puerto Rican frogs. *J Comp Physiol B* 154:579-585.
- Boutilier RG, Stiffler DF, Toews DP (1992). Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians. *In*: Feder ME, Burggren WW (eds). *Environmental Physiology of the Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago. Pp 81-124.
- Buckley L, Jetz BW (2007). Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. *Proc R Soc B* 274:1167-1173.

- Buttemer WA, Thomas C (2003). Influence of temperature on evaporative water loss and cutaneous resistance to water vapour diffusion in the orange-thighed frog (*Litoria xanthomera*). Aust J Zool 51:111-118.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Soberon J, Salazar I, Fay JP (2005) Global mammal conservation: what must we manage? Science 309:603-607.
- Christensen CU (1974). Effect of arterial perfusion on net water flux and active sodium transport across the isolated skin of *Bufo bufo bufo* (L.). J Comp Physiol 93:93-104.
- Heatwole HF, Torres F, Austin SB, Heatwole A (1969). Studies on anuran water balance. I. Dynamics of evaporative water loss by the coqui, *Eleutherodactylus portoricensis*. Comp Biochem Physiol 28:245–269.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Int J Climatol 25:1965-1978.
- Hijmans RJ, Guarino L, Cruz M, Rojas E (2001). Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. Plant Genet Resour Newsl 127:15-19.
- Hillyard SD, Hoff KS, Propper CR (1998). The water absorption response: a behavioral assay for physiological processes in terrestrial amphibians. Physiol Zool 71:127-138.
- Hutchinson VH, Dupe RK (1992). Thermoregulation. In: Feder ME, Burggren WW (eds). Environmental Physiology of the Amphibians. University of Chicago Press, Chicago. Pp. 206–249.
- John-Alder HB, Morin PJ, Lawler S (1988). Thermal physiology, phenology, and distribution of tree frogs. Am Nat 132:506-520.
- Lillywhite HB (2006). Water relations of tetrapod integument. J Exp Biol 209:202-226.
- Littleford RA, Keller WF, Phillips NW (1947). Studies on the vital limits of water loss in the plethodontid salamanders. Ecology 28:440-447.

- Maciel NM, Collevatti RG, Colli GR, Schwartz EF (2010). Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Mol Phylogenet Evol* 57:787-797.
- McClanahan LL, Baldwin R (1969). Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. *Comp Biochem Physiol* 28:381–389.
- McNab BK (2002). *The Physiological Ecology of Vertebrates: A View From Energetics*. Cornell University Press, New York. 576 pp.
- Moore FR, Gatten Jr RE (1989). Locomotor performance of hydrated, dehydrated and osmotically stressed anuran amphibians. *Herpetologica* 45:101-110.
- Navas CA (1996). Thermal dependency of field locomotor and vocal performance of high-elevation anurans in the tropical Andes. *J Herpetol* 30:478-487.
- Navas CA, Antoniazzi MM, Jared C (2004). A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. *Int Congr Ser* 1275:298-305.
- Orme CDL *et al.* (2005) Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature* 436:1016-1019.
- Pagel MD (1992). A method for the analysis of comparative data. *J Theor Biol* 156:431-442.
- Preest MR, Pough FH (1989). Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. *Func Ecol* 3:693-699.
- Revell LJ (2009). Size-correction and principal components for interspecific comparative studies. *Evolution* 63(12): 3258–3268.
- Rogowitz GL, Cortes-Rivera M, Nieves-Puigdoller K (1999). Water loss, cutaneous resistance, and effects of dehydration on locomotion of *Eleutherodactylus* frogs. *J Comp Physiol B* 169:179-186.

- Rome LC, Stevens ED, John-Alder HB (1992). The influence of temperature and thermal acclimation on physiological function. *In*: Feder ME, Burggren WW (eds). Environmental Physiology of the Amphibians. University of Chicago Press, Chicago. Pp 183-205.
- Roth JJ (1973). Vascular supply to the ventral pelvic region of anurans as related to water balance. *J Morphol* 140:443-460.
- Schmid WD (1965). Some aspects of the water economies of nine species of amphibians. *Ecology* 46:261-269.
- Schwarzkopf L, Alford RA (1996). Dessication and shelter-site use in a tropical amphibian: comparing toads with physical models. *Funct Ecol* 10:193-200.
- Seebacher F, Alford RS (2002). Shelter microhabitats determine body temperature and dehydration rates of a terrestrial amphibian (*Bufo marinus*). *J Herpetol* 36:69-75.
- SpeciesLink (2014). Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas: a Integração do Species Analyst e do SinBiota (FAPESP). Accessed at: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt> in September 9th of 2014.
- Spotila JR, Berman EN (1976). Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. *Comp Biochem Physiol A* 55:407-412.
- Suzuki M, Hasegawa T, Ogushi Y, Tanaka S (2007). Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: A Review. *Comp Biochem Physiol A* 148:72–81.
- Tingley R, Shine R (2011). Desiccation risk drives the spatial ecology of an invasive anuran (*Rhinella marina*) in the Australian semi-desert. *PLoS One* 6(10):e25979.
- Titon Jr B, Navas CA, Jim J, Gomes FR (2010). Water balance and locomotor performance in three species of neotropical toads that differ in geographical distribution. *Comp Biochem Physiol A* 156:129-135.

- van Berkum FH, Pough FH, Stewart MM, Brussard, PF (1982). Altitudinal and interspecific differences in the rehydration abilities of Puerto Rican frogs (*Eleutherodactylus*). *Physiol Zool* 55:130-136.
- Viborg AL, Hillyard SD (2005). Cutaneous blood flow and water absorption by dehydrated toads. *Physiol Biochem Zool* 78:394-404.
- Viborg AL, Rosenkilde P (2004). Water Potential in the skin blood perfusion in the ventral pelvic patch of toads. *Physiol Biochem Zool* 77(1):39-49.
- Viborg AL, Wang T, Hillyard SD (2006). Cardiovascular and behavioural changes during water absorption in toads, *Bufo alvarius* and *Bufo marinus*. *J Exp Biol* 209:834-844.
- Warburg MR (1972). Water economy and thermal balance of Israeli and Australian amphibia from xeric habitats. *Symp Zool Soc Lond* 31:79-111.
- Wilson RS (2001). Geographic variation in thermal sensitivity of jumping performance in the frog *Limnodynastes peronni*. *J Exp Biol* 204:4227-4236.
- Withers PC, Hillman SS, Drewes RC, Sokal OM (1982). Water loss and nitrogen excretion in sharpnosed reed frogs (*Hyperolius nasutus*. Anura, Hyperoliidae). *J Exp Biol* 97:335-343.
- WorldClim (2014). Global Climate Data. Accessed at: <http://www.worldclim.org/current> in September 9th of 2014.
- Wygoda ML (1984). Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. *Physiol Zool* 57:329-337.
- Wygoda M (1988). Adaptive control of water loss resistance in na arboreal frog. *Herpetologica* 44:251-257.
- Young JE, Christian KA, Donnellan S, Tracy CR, Parry D (2005). Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. *Physiol Biochem Zool* 78(5):847-856.

Zug GR, Zug PB (1979). The marine toad, *Bufo marinus*: A natural history resume of native populations. Smithsonian Contrib Zool 284:1-58.

Figuras:

Figura 1: Árvore filogenética com estimativa de tempo de divergência compilada a partir de Maciel *et al.* (2010).

Figura 2: Desempenho locomotor corrigido pelo comprimento rostro-cloacal em diferentes níveis de hidratação. As barras de erro verticais refletem os erros padrões da média do desempenho locomotor para, respectivamente, 8, 8, 9, 9 e 10 indivíduos de *R. granulosa*, *R. jimi*, *R. ornata*, *R. schneideri* e *R. icterica*.

Figura 3: Desempenho locomotor corrigido pelo comprimento rostro-cloacal em diferentes temperaturas. As barras de erro verticais representam os erros padrões da média do desempenho locomotor para, respectivamente, 8, 12, 10, 9 e 10 indivíduos de *R. granulosa*, *R. jimi*, *R. ornata*, *R. schneideri* e *R. ictérica*, exceto nos dados referentes à 40°C, cujos números de indivíduos são respectivamente 5, 12 e 4 para *R. granulosa*, *R. jimi* e *R. schneideri*.

Figura 4: Sensibilidade térmica em cada faixa de temperatura testada. As barras de erro verticais representam os erros padrões da média da sensibilidade térmica do desempenho locomotor para, respectivamente, 8, 12, 10, 9 e 10 indivíduos de *R. granulosa*, *R. jimi*, *R. ornata*, *R. schneideri* e *R. ictérica*, exceto no intervalo entre 35°C e 40°C, cujos números de indivíduos são respectivamente 5, 12 e 4 para *R. granulosa*, *R. jimi* e *R. schneideri* e no intervalo entre 10°C e 15°C, cujos números de indivíduos são respectivamente 2 e 3 para *R. granulosa* e *R. jimi*.

Tabelas:

Tabela1: Média $\pm$ erro padrão da massa corpórea, resistência à perda de água por evaporação, taxa de reidratação a partir de água livre, sensibilidade térmica da locomoção e sensibilidade do desempenho locomotor a desidratação para *R. granulosa*, *R. jimi*, *R. ornata*, *R. schneideri* e *R. icterica*.

Espécie	Massa (g)	RPAE (s.cm ⁻¹)	TRAL (μg.cm ⁻² .s ⁻¹)	Q10	SDLD (%)
<i>R. granulosa</i>	5,26 $\pm$ 0,47 12 (A)	3,45 $\pm$ 0,37 12 (AB)	31,97 $\pm$ 2,93 8 (A)	3,85 $\pm$ 0,22 8 (A)	73,6 $\pm$ 1,5 8 (A)
<i>R. jimi</i>	110,03 $\pm$ 7,95 12 (B)	2,66 $\pm$ 0,30 12 (AC)	209,52 $\pm$ 10,06 8 (B)	2,65 $\pm$ 0,15 12 (B)	74,9 $\pm$ 1,0 8 (A)
<i>R. ornata</i>	15,20 $\pm$ 0,95 10 (C)	4,43 $\pm$ 0,16 10 (B)	76,18 $\pm$ 7,93 9 (C)	1,93 $\pm$ 0,04 10 (C)	81,7 $\pm$ 0,7 9 (B)
<i>R. schneideri</i>	78,48 $\pm$ 7,12 9 (B)	1,96 $\pm$ 0,24 9 (C)	223,55 $\pm$ 18,92 9 (B)	2,01 $\pm$ 0,02 9 (CD)	78,1 $\pm$ 0,2 9 (AB)
<i>R. icterica</i>	94,85 $\pm$ 6,70 10 (B)	1,16 $\pm$ 0,09 10 (D)	182,80 $\pm$ 17,74 10 (B)	1,68 $\pm$ 0,03 10 (CE)	81,3 $\pm$ 1,3 10 (B)

RPAE: resistência à perda de água por evaporação; **TRAL:** taxas de reidratação a partir de água livre; **Q10:** sensibilidade térmica da locomoção; **SDLD:** sensibilidade do desempenho locomotor a desidratação; os números menores abaixo das médias $\pm$ erro padrão representam o número de indivíduos usados na análise e as letras maiúsculas entre parênteses representam as diferenças interespecíficas em uma ANOVA com espécie incluída como fator, sendo que letras diferentes representam uma diferença com $P \leq 0,050$.

Tabela2: Média $\pm$ erro padrão das variáveis climáticas relacionadas com a temperatura extraída dos pontos de ocorrência das espécies estudadas.

Espécie	N	TM	Tmax	Tmin	ST
<i>R. granulosa</i>	32	24.2 $\pm$ 0.32	30.8 $\pm$ 0.42	17.6 $\pm$ 0.42	1.2 $\pm$ 0.04
<i>R. jimi</i>	132	24.0 $\pm$ 0.18	30.3 $\pm$ 0.20	17.8 $\pm$ 0.22	1.3 $\pm$ 0.03
<i>R. ornata</i>	113	20.2 $\pm$ 0.18	28.1 $\pm$ 0.19	10.7 $\pm$ 0.23	2.5 $\pm$ 0.03
<i>R. schneideri</i>	143	22.8 $\pm$ 0.16	30.7 $\pm$ 0.16	12.4 $\pm$ 0.19	2.0 $\pm$ 0.04
<i>R. icterica</i>	163	18.6 $\pm$ 0.17	27.0 $\pm$ 0.18	9.1 $\pm$ 0.19	2.7 $\pm$ 0.03

N: número de pontos de ocorrência dos quais os dados climáticos foram extraídos; **TM:** temperatura anual média; **Tmax:** temperatura média do mês mais quente do ano; **Tmin:** temperatura média do mês mais frio do ano; **ST:** sazonalidade da temperatura.

Tabela3: Média $\pm$ erro padrão das variáveis climáticas relacionadas com a precipitação extraída dos pontos de ocorrência das espécies estudadas.

Espécie	N	PA	Pmax	Pmin	SP
<i>R. granulosa</i>	32	1039 $\pm$ 83	187 $\pm$ 12	23 $\pm$ 6	77 $\pm$ 6
<i>R. jimi</i>	132	1106 $\pm$ 41	199 $\pm$ 7	27 $\pm$ 2	71 $\pm$ 3
<i>R. ornata</i>	113	1640 $\pm$ 39	249 $\pm$ 4	50 $\pm$ 2	56 $\pm$ 1
<i>R. schneideri</i>	143	1368 $\pm$ 18	237 $\pm$ 3	21 $\pm$ 1	69 $\pm$ 1
<i>R. icterica</i>	163	1653 $\pm$ 26	234 $\pm$ 4	65 $\pm$ 3	45 $\pm$ 2

N: número de pontos de ocorrência dos quais os dados climáticos foram extraídos; **PA:** precipitação anual acumulada; **Pmax:** precipitação acumulada do mês mais chuvoso; **Pmin:** precipitação acumulada do mês mais seco; **SP:** sazonalidade da precipitação.

Tabela4: Fatores retidos na análise de componentes principais das variáveis ambientais extraídas dos pontos de ocorrência das espécies estudadas.

Variável climática	Componente1
Temperatura média anual	-0.992
Temperatura máxima do mês mais quente do ano	-0.940
Temperatura mínima do mês mais frio do ano	-0.979
Sazonalidade da temperatura	0.976
Precipitação anual acumulada	0.967
Precipitação acumulada do mês mais chuvoso	0.812
Precipitação acumulada do mês mais seco	0.970
Sazonalidade da precipitação	-0.813
Eigenvalues	6.974
% da variação	87.18

Tabela 5: Resultados das regressões filogenéticas testando o efeito do componente climático sobre as variáveis fisiológicas corrigidas pela massa corpórea.

Variável fisiológica	Fator	Inclinação	P
RPAE	Intercepto	-0.042	0.851
	Componente 1	-0.163	0.084
TRAL	Intercepto	0.003	0.959
	Componente 1	-0.018	0.652
SDLD	Intercepto	0.009	0.000
	Componente 1	0.025	0.001
Q10	Intercepto	-0.052	0.000
	Componente 1	-0.137	0.003

RPAE: resistência à perda de água por evaporação; **TRAL:** taxas de reidratação a partir de água livre; **Q10:** sensibilidade térmica da locomoção; **SDLD:** sensibilidade do desempenho locomotor a desidratação.

CONCLUSÕES

Existe uma relação alométrica tanto da resistência à perda de água por evaporação quanto das taxas de reidratação com a massa corpórea em anuros, porém, em direções opostas. Tais relações estão provavelmente associadas ao potencial efeito da relação superfície/volume sobre o balanço hídrico. Animais menores apresentam áreas de superfície relativamente maiores, logo, maior superfície de perda de água, sendo uma maior resistência à perda de água provavelmente adaptativa nestas condições. Já animais maiores apresentam áreas de superfície relativamente menores, logo, menor área de mancha pélvica. Entretanto, como necessitam absolutamente de mais água para reidratar-se, uma maior taxa de absorção de água por área de mancha pélvica poderia representar uma adaptação nestas condições. Vale ressaltar que os mecanismos fisiológicos envolvidos tanto no aumento da resistência a perda de água por evaporação quanto no aumento das taxas de reidratação a partir de água livre não podem ser inferidos a partir dos dados coletados e analisados pelo presente estudo.

Anuros de ambientes caracterizados por temperaturas mais altas e sazonalmente constantes e uma menor quantidade de chuvas sazonalmente concentradas, apresentaram maiores taxas de reidratação que anuros encontrados em regiões com temperaturas sazonalmente mais variáveis e chuvas abundantes e sazonalmente bem distribuídas. Tal padrão pôde ser observado quando comparados anuros de diferentes grupos filogenéticos e cuja área de distribuição engloba a Floresta Atlântica e o Cerrado, sugerindo que altas taxas de reidratação representam uma adaptação a ambientes com menor disponibilidade hídrica.

Interessantes padrões de adaptação da locomoção às condições hídricas dos locais de ocorrência das espécies foram encontrados, porém, a direção destas relações parece depender tanto do grupo filogenético estudado quanto dos biomas amostrados. Quando analisamos anuros de diversos grupos filogenéticos, que habitam regiões caracterizadas por temperaturas mais altas e sazonalmente constantes e chuvas sazonalmente mais concentradas, como o Cerrado, estes apresentaram uma maior sensibilidade do desempenho locomotor à

desidratação quando comparados a anuros que habitam ambientes caracterizados por temperaturas sazonalmente mais variadas e um regime de chuvas relativamente constante e abundante, como a Mata Atlântica. Apesar do Cerrado apresentar, de forma geral, menor disponibilidade hídrica quando comparado à Mata Atlântica, esta característica não parece ter constituído uma pressão seletiva para a diminuição da sensibilidade de anuros à desidratação neste tipo de ambiente. Já no caso dos Bufonídeos, foi observada uma relação inversa à descrita anteriormente, sendo a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação muito menor em espécies que habitam ambientes caracterizados por temperaturas altas o ano todo e chuvas escassas e sazonalmente muito concentradas (ou até inexistentes em alguns anos) como a Caatinga. Esse resultado sugere que os bufonídeos que habitam áreas mais xéricas devem estar sob maior ação de pressões seletivas sobre as menores sensibilidades do desempenho locomotor à desidratação.

Espécies de bufonídeos que habitam ambientes com temperaturas mais altas e sazonalmente uniformes e nível de precipitação menor e sazonalmente mais concentrado, apresentam uma maior sensibilidade do desempenho locomotor em temperaturas mais baixas, além de menor sensibilidade deste a temperaturas mais altas, quando comparadas à espécie cuja distribuição geográfica é associada a ambientes com temperaturas mais amenas e mais variáveis sazonalmente e uma precipitação maior e sazonalmente mais constante. Estes resultados sugerem um padrão de adaptação da locomoção a variações na temperatura ambiental em Bufonídeos.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEA/IB/038/2010
Ref. 2010.1.1736.41.0

São Paulo, 08 de dezembro de 2010.

Prezado Senhor

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IB, em reunião realizada no dia 07/12/2010, **APROVOU** o Projeto “Balanço hídrico e desempenho locomotor em Bufonídeos que habitam biomas hídrica e termicamente contrastantes” – **Protocolo 120/2010**, de sua responsabilidade (Colaborador: Braz Titon Junior).

Atenciosamente.

Profa. Dra. Eleonora Trajano

Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais
Vertebrados em Experimentação do IB

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. FERNANDO RIBEIRO GOMES
Departamento de Fisiologia do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-090 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - <http://www.ib.usp.br>

Anexo 1: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - para o projeto: “Balanço hídrico e desempenho locomotor em Bufonídeos que habitam biomas hídrica e termicamente contrastantes.”