Juan Manuel Carvajalino Fernandez

Tolerância ao congelamento em algumas espécies
de anuros de América do Sul: mecanismos e
estratégias

Freeze tolerance in some frogs of South America:
mechanisms and strategies

São Paulo

2017

Juan Manuel Carvajalino Fernandez

Tolerância ao congelamento em algumas espécies
de anuros de América do Sul: mecanismos e
estratégias

Freeze tolerance in some frogs of South America:
mechanisms and strategies

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Carlos Arturo Navas
Iannini

São Paulo

2017

Carvajalino-Fernández, Juan Manuel
Tolerância ao congelamento em algumas
espécies de anuros de América do Sul:
Mecanismos e estratégias
124 f.

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

1. Anfíbios 2. Crioproteção 3. Baixas
Temperaturas 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. Dr. Carlos Arturo Navas Iannini
Orientador

Introdução Geral

Um dos elementos mais conservados na radiação evolutiva dos anuros é a presença de uma pele úmida e permeável, associada à percepção, trocas de gases, secreção e absorção de água (Navas, 2003; Hillman *et al.*, 2009). A versatilidade da pele dos anuros está associada a taxas de evaporação relativamente altas, o que tem implicações para a termorregulação fisiológico-comportamental. Enquanto que anfíbios hidratados podem evitar o superaquecimento via evaporação de água, a evaporação não é compatível com a elevação significativa da temperatura corpórea através do comportamento (Brattstrom, 1979; Feder and Burggren, 1992). As restrições no contexto da termorregulação, junto com uma pele úmida que favorece a nucleação de cristais de gelo que poderiam ser consideradas fatores limitantes na colonização de ambientes frios. Contudo, os anfíbios são um grupo de enorme sucesso ecológico nesse tipo de ambientes, inclusive com espécies de hábitos noturnos que são expostas a rigor climático compatível com o congelamento (Navas, 1996; Carvajalino-Fernández *et al.*, 2011).

Risco de congelamento para os anfíbios em América do Sul e a sua relação com a biodiversidade

Os limites geográficos que marcam o risco de congelamento podem ser considerados como fatores limitantes da biodiversidade de anfíbios, uma vez que o risco de congelamento está associado à especialização fisiológica. Dependendo da regularidade (diário, mensal ou anual) e previsibilidade dos eventos de congelamento, a sobrevivência das populações depende de

diferentes mecanismos fisiológicos relacionados com evitar ou tolerar o congelamento de fluidos.

No continente sul-americano o risco de congelamento varia no tempo e no espaço, mas é geralmente favorecido pelos gradientes altitudinais, em maior ou menor grau dependendo da latitude. Neste continente o risco pode ser marcante no dia a dia, como no caso dos sistemas Alto-Andinos tropicais, onde em ecossistemas de Páramos (altas montanhas tropicais Andinas, acima da linha de árvores) o risco é constante durante muitas noites no ano (Carvajalino-Fernández *et al.*, 2011). Um contexto parecido é o encontrado em locais de altitude na Floresta Atlântica do Sul do Brasil, onde regiões de serra como a Serra do Caraça (MG), Serra da Mandiqueira (SP) e na região de Boraceia (SP), são regiões onde se tem registros de congelamento durante períodos curtos do ano; com variação no risco de ano para ano (Heyer *et al.*, 1988,1990; Canelas and Bertoluci, 2007). Por outro lado, já no sul do continente encontramos diversos ecossistemas Patagônicos, como a “Estepa” ou lacunas Patagônicas de florestas alto andinas, onde o risco de congelamento é constante todos os anos durante três meses contínuos (Zagarese *et al.*, 2000; Logares and Ubeda, 2006; AGRIFOR, 2009).

Estratégias fisiológicas atreladas a sobreviver ao congelamento em anuros

Evitar o congelamento e tolerar o congelamento, são as duas estratégias fisiológicas, reportadas em anfíbios, para sobreviver ao congelamento (Storey and Storey, 1996b). As duas se apresentam quando a temperatura corporal dos animais é menor a zero graus centígrados, mas a tolerância ao congelamento está presente quando tal queda na temperatura

corporal conduz a um congelamento interno de fluidos sem afetar a supervivência do indivíduo (Fig. 1). O impedimento do congelamento é viabilizado quando os fluidos corporais do organismo chegam a um estado de super-resfriamento, através de um aumento na concentração de moléculas de baixo peso molecular em diferentes tecidos, desencadeando uma função crioprotetora (Costanzo *et al.*, 1993). Por outro lado evitar o congelamento inclui além da produção de agentes crioprotetores de propriedades coligativas (como glicose e glicerol), outros agentes que promovem o congelamento organizado de tecidos (como proteínas), cuja função depende mais das características das moléculas (Storey, 1997; Costanzo and Lee, 2013).

Figura 1. Curva termográfica do processo físico durante as estratégias de evitar ou tolerar ao congelamento (Figura 8.11 em Willmer *et al.*, 2005).

Tolerância ao congelamento de anfíbios

A tolerância ao congelamento em anuros tem sido estudada durante os últimos 25 anos, mas só em poucas espécies de anuros neárticos como *Hyla crucifer*, *Hyla versicolor*, *Pseudacris triseriata* e *Lithobates sylvaticus* (Storey and Storey, 1992), e na espécie neozelandesa *Litoria ewingii* (Rexer-Huber *et al.*, 2011). Forte ênfase tem sido dada aos mecanismos de tolerância, que têm sido estudados em níveis organizmais, celulares e moleculares, com foco principal na espécie Norte Americana que alcança a maior distribuição latitudinal, a *L. sylvaticus* (Storey and Storey, 1990, 1992; Storey, 2004). Esta espécie sobrevive o inverno a temperaturas abaixo de zero grau por meio de estratégias fisiológicas consideradas adaptativas e que, no final, favorecem o congelamento seletivo da água corporal, podendo atingir em total até 65% dos líquidos do corpo, mas não formando cristais nos órgãos principais nem no interior do organismo (Storey, 1984; Costanzo *et al.*, 2013; Fig. 2).

Figura 2. Esquematização da tolerância ao congelamento no nível de órgãos no anuro *Litobates sylvaticus* (Ken Storey, <http://kenstoreylab.com>).

Na maioria das espécies neárticas tolerantes ao congelamento, existem padrões de sazonalidade na produção de crioprotetores e graus de tolerância ao congelamento maiores durante o inverno (Storey and Storey, 1986; Layne and Lee, 1989). No caso das espécies *L. sylvaticus* ou *P. tricerata*, encontram-se grandes acúmulo de glicogênio no fígado durante o outono para ter reservas para a produção de glicose durante o inverno (Costanzo *et al.*, 1993a; Devireddy *et al.*, 1999; Jenkins and Swanson, 2005). Neste período ocorre depressão metabólica que inclui diminuição ou recesso da taxa metabólica, da circulação sanguínea e da respiração, características que são recuperadas durante o começo da primavera (Storey and Storey, 1992a). Também existem evidências de mecanismos de proteção durante o ano inteiro, como a produção continuada de proteínas crioprotetoras em *L. sylvaticus* (Wolanczyk *et al.*, 1990b), ou níveis de glicose alto durante o ano todo (permanecendo maior durante o inverno) em populações com distribuições extremas na latitude norte (Larson *et al.*, 2014). Nestes casos não se tem registro de dados de depressão metabólica, sendo que pode não existir. Um exemplo é o que ocorre em peixes antárticos que apresentam atividade contínua devido aos altos níveis de lipídeos para manter a fluidez de membrana, proteínas anticongelantes e altos níveis constantes de álcoois como glicerol (DeVries, 1983).

Agentes crioprotetores na tolerância ao congelamento em anuros

Vários agentes crioprotetores são reportados na literatura, sendo os principais a glicose, o glicerol, as proteínas e outros menos estudados como o colesterol e os triglicerídeos. Em geral estas moléculas são alocadas em diferentes tecidos, desencadeando uma função crioprotetora (Costanzo *et al.*,

1993a; Layne, 1999; Edwards *et al.*, 2004; Jenkins and Swanson, 2005). A produção e as funções dos crioprotetores podem variar dependendo das características das moléculas. Na literatura o glicerol e a glicose são os crioprotetores mais estudados (Layne and Lee, 1989; Costanzo *et al.*, 1993a; Storey, 1997). O glicerol é um dos crioprotetores mais pesquisados em insetos de altas latitudes, sendo que em anuros foi encontrado apenas com função de crioproteção em *Pseudacris regilla* (Croes and Thomas, 2000), *Litoria ewingii* (Rexer-Huber, 2011) e *Hyla versicolor* (Layne and Stapleton, 2008). Como mencionado, a principal via metabólica para a produção do glicerol são as reservas de glicogênio, mas a sua produção também pode ser via hidrólises de triglicérides (Davenport, 1992). A glicose é o crioprotetor mais estudado em anfíbios, sendo já bem estabelecido os processos de produção, de mobilização e de funcionalidade desta molécula em relação à tolerância ao congelamento.

Para explicar o papel da glicose durante o processo de congelamento em anfíbios como em *L. sylvatica*, assume-se que durante uma exposição em temperaturas congelantes a glicose entra nas células rapidamente por difusão facilitada, enquanto que grande parte do fluido intracelular sai da célula, formando um novo equilíbrio osmótico com a hiperglicemia extracelular (Costanzo *et al.*, 2013). O aumento da glicose no sangue é o resultado de uma resposta enzimática desencadeada por uma estimulação cerebral em função do congelamento, mesmo quando ele acontece experimentalmente só em um setor da pele do anuro (Storey and Storey, 1985; Storey, 1987; Layne and Lee, 1989). O aumento da glicose é detectável em 5 minutos, mas atinge a máxima proteção para o corpo depois de 24 horas (Costanzo and Lee, 1993; Costanzo *et al.*, 1993a; Costanzo and Lee, 1993; Costanzo *et al.*, 1993). Diretamente a

glicose atua em duas etapas: 1. Abaixando o ponto congelamento, devido às propriedades coligativas dependentes da concentração (Manzur, 1985; Storey and Storey, 1985); 2. Altos conteúdos desta molécula facilita a desidratação dos órgãos durante o congelamento, o que evita danos tissulares e fornece água para criar uma camada no lúmen peritoneal que quando se congela ajuda a evitar flutuações de temperaturas ambientais baixa em órgãos primordiais como o fígado, o coração ou os rins (Churchill and Storey, 1993; Lee and Costanzo, 1998a).

Na tolerância ao congelamento, também existem as proteínas anticongelantes, que são ligadas a partes específicas do lúmen celular, como o interior da membrana plasmática, evitando-se o congelamento e a perda excessiva do líquido intracelular pela ação do aumento da glicose ou glicerol, ajudando manter a viabilidade celular (Fig. 3). O acúmulo e a mobilização dos crioprotetores nos tecidos e órgãos dos animais tolerantes ao congelamento dependem em grande parte da interação das membranas plasmáticas com o seu meio, sendo a fluidez da membrana um dos pontos relevantes para conseguir um balanço correto entre os crioprotetores que se encontram fora e dentro da membrana, na busca de uma estabilidade da osmorregulação. O colesterol é um crioprotetor que além de propriedades anticongelantes de natureza coligativas, apresenta propriedades coligativas relacionadas com a promoção da fluidez da membrana e modulação da inserção de proteínas intermembranas (Wang, 1989; Lee *et al.*, 2008; Ikonen, 2008). Mudanças na composição de membranas em compensação às alterações ambientais são vistas como respostas primárias em animais ectotérmicos impostos a desafios climáticos, como os eventos de congelamento (Farkas *et al.*, 2000; Hochachka and Somero, 2002).

Figura 3. Esquematização da tolerância ao congelamento no nível celular no anuro *Litobathes sylvaticus* (Ken Storey, <http://kenstoreylab.com>).

Tolerância ao congelamento em anuros da América do Sul

Não existe informação sobre tolerância ao congelamento em anfíbios sul-americanos. O que é conhecido nos induz a acreditar que esta estratégia fisiológica está presente em vários anuros, dentro de contextos ecológicos significativos aos riscos de baixas temperaturas no continente (Logares and Ubeda, 2006; Carvajalino-Fernández *et al.*, 2011). Sabe-se que alguns anfíbios de hábitos terrestres e noturnos presentes em altas montanhas tropicais e subtropicais estão expostos a temperaturas baixas, chegando potencialmente a ter risco de congelamento. (Navas, 1996a; Navas, 2003; Carvajalino-Fernández *et al.*, 2011). Apesar destas condições de frio extremo, estes anuros mantêm atividade ao longo do ano (Navas, 1996b; Navas, 1996c; Navas *et al.*, 2008), sugerindo que estes animais apresentam algum tipo de proteção contínua às baixas temperaturas (Carvajalino-Fernández *et al.*, 2011). Por outro lado, neste continente também existem espécies altamente

sazonais, que possuem atividade apenas nos meses mais quentes do ano e processos de dormência e depressão metabólica nos meses mais frios (Storey and Storey, 1996b; Carvajalino-Fernández *et al.*, 2013). Deste modo, a sazonalidade, as características circanuais e as circadianas podem ser particulares para cada espécie ou população e estas características podem repercutir na resistência às condições ambientais extremas, como o congelamento (Layne and Lee, 1989; Bicego-Nahas *et al.*, 2001; Chang and Hou, 2005).

Conforme mencionado e referenciado, os estudos de tolerância ao congelamento não tem sido de grande interesse no nosso continente, mesmo que o entendimento de aspectos sobre a fisiologia atrelada a processos de congelamento pode ser um potencial elemento modulador da distribuição de espécies ao longo de gradientes de latitude e altitude (Navas *et al.*, 2013). Consideramos que este trabalho de doutorado contribui tanto para aumentar o entendimento dos mecanismos fisiológicos de anfíbios atrelados à sua sobrevivência em ambientes congelantes em geral, assim como dar uma visão geral de como se apresenta a tolerância ao congelamento em anuros em alguns ambientes frios da América do sul.

Três abordagens dentro desta tese foram realizadas para somar ao conhecimento de como os anfíbios sobrevivem ao congelamento. Inicialmente tratamos de descrever se anuros de climas frios na América do Sul podem estar em risco de congelamento mesmo dentro de refúgios termais. Já definido que o risco de congelamento é real, a segunda abordagem foi determinar a sobrevivência ao congelamento e possíveis mecanismos fisiológicos atrelados. Finalmente, direcionou-se a determinar possíveis relações monofiléticas entre as espécies tolerantes ao congelamento.

Conclusões Gerais

- O risco de congelamento é uma realidade em diversos microhabitats usados por anfíbios na América do Sul. Este risco varia no nível de frequência e duração, dependendo tanto de fatores macroclimáticos como a altitude e a latitude da zona de estudo, e de fatores microclimáticos como o tipo de microhabitat.
- A detecção de risco de congelamento em diferentes microhabitats é possível usando sensores remotos, desde que esse microhabitat seja distribuído homogeneamente em mais de 500 m². Tal fato torna a detecção inviável em alguns locais, concluindo que o registro manual das temperaturas é ainda a melhor ferramenta para definir o risco de congelamento no nível de microhabitats.
- Microhabitats como os encontrados embaixo de pedras pequenas ou sobre plantas (bromélias) amenizam a exposição a temperaturas extremas, oferecendo a possibilidade de termorregulação oportunista. Nossos registros demonstram que, mesmo nestes microhabitats, o risco ao congelamento se mantém, conduzindo a ideia de que anfíbios destes locais possuem adaptações fisiológicas que permitem superar a pressão seletiva do ambiente.
- A maioria das espécies estudadas é capaz de sobreviver ao congelamento em nível de horas, o que é convergente com o possível risco a baixas temperaturas encontrado em locais frios habitados por anuros na América do Sul.
- O impacto da exposição ao frio é variável entre as espécies, podendo ter recuperação instantânea como em *S. hayii*, e demorar mais de 24 horas como alguns indivíduos de *M. morerai*.

- Os níveis de sobrevivência ou de recuperação depois da exposição ao congelamento, não relacionam-se com o local de coleta dos animais ou com um sinal filogenético (nível de família). A ausência de ligação entre o ambiente atual e a história evolutiva das espécies converge no fato de encontrar uma alta riqueza de espécies anuros nos ambientes congelantes, ou referi uma baixa representatividade do número de espécies; o que incentiva a aumentar o número de modelos biológicos a pesquisar.
- A tolerância ao congelamento foi registrada em *D. microps*, *H. polytaenius*, *P. bufoninum*, *S. duartei*, and *S. hayii*. Este fato não exclui que as espécies *A. gargola*, *B. gouveai*, *H. latistriatus* and *M. moreirae*, não sejam tolerantes ao congelamento, mas possivelmente o tempo de exposição ao tratamento não foi o suficiente para elas apresentar modulação de crioprotetores ou formar gelo corporal.
- Os agentes crioprotetores e as suas mudanças frente ao tratamento de congelamento foram distintos entre as espécies, reafirmando a grande diversidade fisiológica de mecanismos de crioproteção dentro de vários tipos de risco de congelamento (Infrequente, ocasional e sazonal) na América do Sul.
- O caráter convergente na estratégia de tolerância ao congelamento em anuros foi confirmado, acrescentando novas espécies e famílias da América do Sul e da Nova Zelândia nas análises filogenéticas. Propomos que a existência da tolerância ao congelamento em vários grupos de anfíbios deve-se a processos de adaptação ao frio e consequentemente seleção natural para colonizar ambientes pouco explorados por outras espécies de anfíbios não resistentes à exposição a temperaturas congelantes.

Resumo geral

Os limites geográficos que marcam o risco de congelamento são determinantes na biodiversidade de anfíbios. Os mecanismos fisiológicos envolvidos na preparação e reação aos eventos de temperatura extrema são específicos e dependem da previsibilidade e repetitividade destes eventos. Na América do Sul, existem regiões com risco de congelamento para os anfíbios, contudo pouco se conhece da tolerância ao congelamento em espécies endêmicas deste continente. O doutorado foi elaborado em locais com reportes de congelamento na Argentina e o Brasil, usando como modelo as espécies *Alsodes gargola*, *Bokermanohyla gouveai*, *Dendrosophus minutus*, *D. microps*, *Hypsiboas latistriatus*, *H. polytaenius*, *Melanophryniscus moreirae*, *Pleurodema bufoninum*, *Ologygon brieni*, *Scinax duartei* e *S. hayii*, avaliando exposição potencial ao congelamento em refúgios termais, sobrevivência a temperatura congelante, mudanças em moléculas com função crioprotetora (colesterol, glicose, proteínas, triglicérides, ureia) e crescimento de gelo corporal. Dentro deste contexto, a minha hipótese geral foi que existem anfíbios que sobrevivem ao congelamento na América do sul e que estas espécies apresentam mecanismos de resposta fisiológica que deveriam variar entre espécies em um evento de congelamento controlado. No decorrer do doutorado esta hipótese foi corroborada, encontrando sobrevivência a temperatura congelantes nas espécies *A. gargola*, *B. gouveai*, *D. microps*, *H. latistriatus*, *H. polytaenius*, *M. moreirae*, *P. bufoninum*, *S. duartei* e *S. hayii*, sendo que existe uma ampla variedade de estratégias fisiológicas para fazer frente às baixas temperaturas. Entre as espécies anteriormente reportadas,

definiu-se que *D. microps*, *H. polytaenius*, *P. bufoninum*, *S. duartei* e *S. hayii*, são tolerantes ao congelamento devido a que apresentarem tanto acúmulo de crioprotectores como crescimento de gelo corporal durante a exposição a baixas temperaturas. Por outro lado usando análises filogenéticas, conseguiu-se reforçar a hipótese que a tolerância ao congelamento é convergente ao longo da história evolutiva dos anfíbios, acontecendo independentemente em vários clados. As novas descobertas sobre a riqueza fisiológica no nível de adaptações frente ao congelamento em América do Sul são apenas pequenas amostras do que potencialmente pode ser achada pensando na biodiversidade existente neste continente, logo a presente tese, é só um incentivo para futuros trabalhos na área.

Abstract

The geographical boundaries that mark the risk of freezing are determinants for amphibian biodiversity. The physiological mechanisms involved in the preparation and reaction to extreme temperature events are specific and depend on the predictability and repeatability of these events. In South America, there are regions with freezing risk for amphibians, however little is known about the freezing tolerance in endemic species to this continent. The present doctoral dissertation was prepared in places with freezing reports in Argentina and Brazil, using as biological models the species *Alsodes gargola*, *Bokermanohyla gouveai*, *Dendrosophus minutus*, *D. microps*, *Hypsiboas latistriatus*, *H. polytaenius*, *Melanophryniscus moreirae*, *Pleurodema bufoninum*, *Oligoglossus brienii*, *Scinax duartei* and *S. hayii*, evaluating potential exposure to freezing in thermal refuges, survival to freezing temperature, changes in cryoprotectant molecules (cholesterol, glucose, proteins, triglycerides, urea) and body ice growth. Within this context, my general hypothesis was that there are amphibians that survive freezing in South America and that these species present physiological mechanisms that should vary among species in a controlled freezing event. In the course of my doctorate, this hypothesis was confirmed, finding survival to freezing temperature in the species *A. gargola*, *B. gouveai*, *D. microps*, *H. latistriatus*, *H. polytaenius*, *M. moreirae*, *P. bufoninum*, *S. duartei* and *S. hayii*, being a wide variety of physiological strategies to protect the animals to the low temperatures. Among the previously reported species, *D. microps*, *H. polytaenius*, *P. bufoninum*, *S. duartei*, *S. hayii*, were defined as freezing tolerant because they exhibit both accumulation of

cryoprotectants and body ice growth during freeze exposure. On the other hand using phylogenetic analyzes, it was possible to reinforce the hypotheses that the freezing tolerance strategy is convergent throughout the evolutionary history of the amphibians, happening independently in several clades. The new findings about physiological richness at the level of adaptations to freezing in South America are only small samples of what can be found within the biodiversity existing on this continent, so the present thesis is only an incentive for future work in the area.

Referências Bibliográficas

- Bertoluci J, Rodrigues MT (2002) Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, Southeastern Brazil. *AmphibiaReptilia* 23: 161-167.
- Bertoluci J, Rodrigues MT (2002) Utilização de habitats reprodutivos e micro-habitats de vocalização em uma taxocenose de anuros (Amphibia) da Mata Atlântica do sudeste do Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo* 42(11): 287-297.
- Bertoluci J, Cruz CAG (2010) *Scinax duartei*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010.
- Bícego-Nahas KC, Gargaglioni LH, Branco LG (2001) Seasonal changes in the preferred body temperature, cardiovascular, and respiratory responses to hypoxia in the toad, *Bufo paracnemis*. *J Exp Zool* 289:359–65. doi: 10.1002/jez.1017
- Bokermann WCA (1967) Observações sobre *Melanophryniscus moreirae*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 39 (2):301-306.
- Brattstrom BH (1979) Amphibian Temperature Regulation Studies in the Field and Laboratory. 19:345–356.
- Canelas M a. S, Bertoluci J (2007) Anurans of the Serra do Caraça, southeastern Brazil: species composition and phenological patterns of calling activity. *Iheringia Série Zool* 97:21–26. doi: 10.1590/S0073-47212007000100004
- Carvajalino-Fernández J, Bonilla Gomez MA, Navas CA (2011) Freezing Risk in Tropical High-Elevation Anurans: An Assessment

- Based on the Andean Frog *Pristimantis nervicus* (Strobomantidae).
South Am J ... 6:73–78.
- Carvajalino-Fernández JM, Jeckel AM, Indicatti RP (2013)
Melanophryniscus moreirae (Amphibia, Anura, Bufonidae):
Dormancy and hibernacula use during cold season. *Herpetol Bras*
2:61–62.
- Cei JM (1980) Amphibians of Argentina. *Monitore zoologico italiano N.*
S. Monografia 2 : xii + 609 pp.
- Cei JM (1972) Herpetología patagónica. IV. Distribución geográfica y
diferenciación serológica poblacional de *Pleurodema bufonina*
(Bell). *Physis (Buenos aires)* 31: 423-430.
- Chang Y, Hou PL (2005) Thermal Acclimation of Metabolic Rate May
Be Seasonally Dependent in the Subtropical Anuran Latouche ' s
Frog. 78:947–955.
- Churchill T a, Storey KB (1993) Dehydration tolerance in wood frogs: a
new perspective on development of amphibian freeze tolerance. *Am*
J Physiol 265:R1324-32.
- Costanzo JP, do Amaral MCF, Rosendale AJ, Lee RE (2013)
Hibernation physiology, freezing adaptation and extreme freeze
tolerance in a northern population of the wood frog. *J Exp Biol*
216:3461–73. doi: 10.1242/jeb.089342
- Costanzo JP, Lee RE (2013) Avoidance and tolerance of freezing in
ectothermic vertebrates. *J Exp Biol* 216:1961–7. doi:
10.1242/jeb.070268
- Costanzo JP, Lee RE, Lortz PH (1993a) Glucose concentration regulates
freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *J. Exp. Biol.*
181:245–55.
- Costanzo JP, Lee RE, Lortz PH (1993b) Glucose concentration regulates

- freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *J Exp Biol* 181:245–55.
- Costanzo JP, Lee REJ (1993) Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. *Can J Zool* 71:71–75.
- Conte CE, Rossa-Feres DC (2006) Diversidade e ocorrência temporal da anurofauna (Amphibia, Anura) em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23(1): 162-175.
- Conte CE, Rossa-Feres DC (2007) Riqueza e distribuição espaço-temporal de anuros em um remanescente de Floresta de Araucária no sudeste do Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia* 24(4): 1025- 1037.
- Croes SA, Thomas RE (2000) Freeze Tolerance and Cryoprotectant Synthesis of the Pacific Tree Frog *Hyla regilla*. *Copeia* 2000:863–868. doi: 10.1643/0045-8511(2000)000[0863:FTACSO]2.0.CO;2
- Davenport J (John) (1992) *Animal life at low temperature*. Chapman & Hall
- Deiques CH, Stahnke LF, Reinke M and Schmitt P (2007) *Guia ilustrado dos anfíbios e répteis do Parque Nacional de Aparados da Serra, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Brasil*. Porto Alegre, USEB, 120 p.
- Devireddy R, Barratt P, Storey K, Bischof J (1999) Liver Freezing Response of the Freeze-Tolerant Wood Frog, *Rana sylvatica*, in the Presence and Absence of Glucose. *Cryobiology* 338:327–338.
- DeVries a L (1983) Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes. *Annu Rev Physiol* 45:245–60. doi: 10.1146/annurev.ph.45.030183.001333
- Edwards JR, Jenkins JL, Swanson DL (2004) Seasonal effects of dehydration on glucose mobilization in freeze-tolerant chorus frogs (*Pseudacris triseriata*) and freeze-intolerant toads (*Bufo woodhousii* and *B. cognatus*). *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301:521–31. doi:

10.1002/jez.a.81

Feder ME, Burggren WW (1992) Environmental physiology of the amphibians. University of Chicago Press

Fundação SOS Mata Atlântica and INPE. 2008. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2000-2005. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica e INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). 157 p.

Gonçalves da Cruz CA, Caramaschi U. 2010. *Hypsiboas polytaenius*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010. Downloaded on 03 April 2017.

Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA (2008) Anfíbios da Mata Atlântica: guia dos anfíbios anuros da Mata Atlântica. São Paulo: Editora Neotropica. 244 p.

Heyer WR, Rand AS, Gonçalves Da Cruz CA, et al (1990) Frogs of boracea. *Arq Zoolologia* 31:231–410.

Ikonen E (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:125–38. doi: 10.1038/nrm2336

Jenkins JL, Swanson DL (2005) Liver glycogen, glucose mobilization and freezing survival in chorus frogs, *Pseudacris triseriata*. *J Therm Biol* 30:485–494. doi: 10.1016/j.jtherbio.2005.05.008

Kwet A, Di-Bernardo M (1999) Pró-Mata - Anfíbios, Amphiben, Amphibians. Porto Alegre: Edipucrs. 107 p.

Larson DJ, Middle L, Vu H, et al (2014) Wood frog adaptations to overwintering in Alaska: new limits to freezing tolerance. *J Exp Biol* 217:2193–200. doi: 10.1242/jeb.101931

Layne JR (1999) Freeze tolerance and cryoprotectant mobilization in the

- gray treefrog (*Hyla versicolor*). *J Exp Zool* 283:221–225. doi: 10.1002/(SICI)1097-010X(19990215)283:3<221::AID-JEZ1>3.0.CO;2-Q
- Layne JR, Lee RE (1989) Seasonal variation in freeze tolerance and ice content of the tree frog *Hyla versicolor*. *J Exp Zool* 249:133–7. doi: 10.1002/jez.1402490203
- Lee D, Kwon B, Ramamoorthy A (2008) Freezing point depression of water in phospholipid membranes: a solid-state NMR study. *Langmuir* 24:13598–13604. doi: 10.1021/la8023698.
- Lee RE, Costanzo JP (1998) Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. *Annu Rev Physiol* 60:55–72. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.55
- Logares R (2003) ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE *ALSODES GARGOLA* GALLARDO 1970 (ANURA : LEPTODACTYLIDAE) EN AMBIENTES NORDPATAGÓNICOS DE TIPO ALPINO. Universidad del Comahue
- Logares R, Ubeda C (2006) First insights into the overwintering biology of *Alsodes gargola* frogs and tadpoles inhabiting harsh Andean-Patagonian alpine environments. *Amphibia-reptilia* 27:263–267.
- Lutz B (1952) New frogs from Itatiaia Mountain, Brazil. *Copeia*, 1952: 27–28.
- Magrini L, Carvalho-e-Silva SP, Bédaride AF, Giaretta AA (2011). Calls of five species of the *Scinax ruber* (Anura: Hylidae) clade from Brazil with comments of their taxonomy. *Zootaxa*, 3066: 37-51.
- Manzur P (1985) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:0–4.
- Navas C a (2003) Herpetological diversity along Andean elevational gradients: links with physiological ecology and evolutionary

- physiology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133:469–85.
- Navas C a. (1996a) Implications of microhabitat selection and patterns of activity on the thermal ecology of high elevation neotropical anurans. *Oecologia* 108:617–626. doi: 10.1007/BF00329034
- Navas C a. (1996b) The Effect of Temperature on the Vocal Activity of Tropical Anurans: A Comparison of High and Low-Elevation Species. *J Herpetol* 30:488. doi: 10.2307/1565691
- Navas C a. (1996c) Thermal Dependency of Field Locomotor and Vocal Performance of High-Elevation Anurans in the Tropical Andes. *J Herpetol* 30:478. doi: 10.2307/1565690
- Navas C a, Gomes FR, Carvalho JE (2008) Thermal relationships and exercise physiology in anuran amphibians: integration and evolutionary implications. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 151:344–62. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.07.003
- Navas CA, Carvajalino-Fernández JM, Saboyá-Acosta LP, et al (2013) The body temperature of active amphibians along a tropical elevation gradient: patterns of mean and variance and inference from environmental data. *Funct Ecol* n/a-n/a. doi: 10.1111/1365-2435.12106
- Navas CA, Úbeda CA, Logares R, Jara FG (2010) Thermal Tolerances in Tadpoles of Three species of paTagonian anurans. 5:89–96.
- Peixoto OL, Cruz CAG (1992) New species of *Hyla* from the “Serra da Mantiqueira, Itatiaia, Rio de Janeiro” state - (Amphibia, Anura, Hylidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 87(1): 197-200.
- Prado GM, Pombal Jr JP (2005) Distribuição espacial e temporal dos anuros em um brejo da Reserva Biológica de Duas Bocas, sudeste do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro* 63(4): 685-705.

- Pombal Jr. JP, Gordo M (2004) Anfíbios anuros da Juréia; p. 243-256. In O.A.V. Marques and W. Duleba (ed.). Estação Ecológica Juréia-Itatins. Ambiente físico, flora e fauna. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Potsch de Carvalho S, Gonçalves da Cruz CA (2004) *Bokermannohyla gouveai*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T55491A11307999. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55491A11307999.en>. Downloaded on **03 April 2017**.
- Potsch S, Telles AM. 2004. *Scinax hayii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004. Downloaded on 04 April 2017.
- Rexer-Huber KMJ, Bishop PJ, Wharton D a (2011) Skin ice nucleators and glycerol in the freezing-tolerant frog *Litoria ewingii*. J Comp Physiol B 181:781–92. doi: 10.1007/s00360-011-0561-7
- Silvano DL, Pimenta BVS (2001) Geographic Distribution. *Hyla microps*. Herpetological Review 32(4): 271.
- Silvano D, Caramaschi U, Rodrigues M. 2004. *Melanophryniscus moreirae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2004. Downloaded on 13 March 2017.
- Storey JM, Storey KB (1985) Triggering of cryoprotectant synthesis by the initiation of ice nucleation in the freeze tolerant frog , *Rana sylvatica*. 191–195.
- Storey KB (1997) Organic solutes in freezing tolerance. Comp Biochem Physiol A Physiol 117:319–26.
- Storey KB (1984) Freeze tolerance in the frog, *Rana sylvatica*. Experientia 40:4–5.
- Storey KB (1987) Glycolysis and the regulation of cryoprotectant synthesis in liver of the freeze tolerant wood frog. J Comp Physiol B 157:373–380. doi: 10.1007/BF00693364

- Storey KB, Storey JM (1986) Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 83:613–7.
- Storey KB, Storey JM (1992) Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates. *Annu Rev Physiol* 54:619–37. doi: 10.1146/annurev.ph.54.030192.003155
- Storey KB, Storey JM (1996a) Natural Freezing Survival in Animals. *Annu Rev Ecol Syst* 27:365–386. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.27.1.365
- Storey KB, Storey JM (1996b) NATURAL FREEZING SURVIVAL IN ANIMALS. *Annu Rev Ecol Syst* 27:365–386.
- Stuart S (2006). *Hypsiboas latistriatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2006. Downloaded on 03 April 2017.
- Wang L (1989) Advances in Comparative and Environmental Physiology 4 Animal Adaptation to Cold.
- Weber LN, Da Silva L, Oliveira R, Pereira da Silva S, Corrêa A, Potsch S. 2007. Notes on Geographic Distribution Amphibia, Anura, Bufonidae, *Melanophryniscus moreirae*: Distribution extension. *Check List* 3(4): 346-347,
- Willmer P, Stone G, Johnston I a. (2005) Environmental physiology of animals.
- Zagarese HF, Diaz M, Pedrozo F, Úbeda CA (2000) Mountain lakes in Northwestern Patagonia. *Verhandlungen des Int Verein Limnol* 27:533–537.

Anexo

Espécies modelos para testar tolerância ao congelamento

Grande parte dos dados apresentados abaixo foram retirados da “Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da International Union for Conservation of Nature – IUCN”. Como são espécies pouco estudadas, tal plataforma tornou-se a melhor fonte de informação sobre estes organismos.

***Alsodes gargola* (Alsodidae; Gallardo, 1970)**

Anfíbio endêmico da Argentina, possui tamanho mediano e hábitos semiaquáticos. Distribuem-se no noroeste da Patagônia Argentina, em elevações entre os 200 e os 2200m (Zagarese et al. 2000). Está associado a pequenas lagoas andinas e pequenas correntes dentro das florestas patagônicas onde existem registros de temperaturas abaixo do ponto de congelamento durante 8 meses do ano (Logares and Ubeda 2006; Navas et al. 2010). Os adultos passam o inverno se mantendo tanto em microhabitats terrestres, como embaixo da água (Logares and Ubeda 2006). Os girinos se desenvolvem em longos períodos (até 4 anos; Logares 2003; Navas et al. 2010; Úbeda, *observações pessoais*), e durante o inverno, podem ser encontrados em lagoas com camadas de gelo e neve superficiais (Navas et al. 2010).

***Bokermannohyla gouveai* (Hylidae; Peixoto and Cruz, 1992)**

Bokermannohyla gouveai é uma espécie endêmica do Brasil, conhecida apenas na localidade-tipo do Brejo da Lapa, no município de Itatiaia, estado do Rio de Janeiro, próximo ao Parque Nacional do Itatiaia, no limite entre o estado do Rio de Janeiro e de Minas Gerais, cerca de 1.800-2.400 m acima do nível do mar (Peixoto & Da Cruz 1992). Os dados sobre a sua história de vida, incluindo hábitat utilizado e reprodução, são insuficientes. Sabe-se apenas que ocorre na Mata Atlântica em áreas montanhosas, e se reproduz em áreas abertas alagadas (Carvalho-e-Silva & Cruz 2004). Como a maioria das espécies, está ameaçada pela perda de habitat, mas estudos sobre a sua história de vida e distribuição são necessários para melhor compreender o estado de conservação da espécie.

***Dendrosophus minutus* (Hylidae; Peter, 1872)**

Dendrosophus minutus é uma espécie comumente encontrada na borda de florestas, em áreas abertas ou clareiras (Lima *et al.*, 2005 ; Reginaldo A. Machado & Paulo S. Bernarde, 2002). Distribuem-se em toda a América do Sul, exceto ao oeste dos Andes. Os machos medem 20-23 mm e as fêmeas, um pouco maiores, com 24-26 mm (Lima *et al.*, 2005). Os machos têm coloração dorsal marrom a amarelo-brilhante à noite e marrom-avermelhada durante o dia, apresentando manchas dorsais grandes, de cor marrom com contorno amarelo-brilhante em forma de ampulheta (Lima *et al.*, 2005). Possuem ainda uma linha amarelo-creme próximo ao uróstilo e o ventre é branco na parte posterior e amarelo na parte anterior (Lima *et al.*, 2005). As fêmeas têm dorso marrom-claro, sem manchas, e o ventre creme a esbranquiçado (Lima *et al.*, 2005). A íris é laranja-clara a escura em ambos sexos (Lima *et al.*, 2005).

Dendrosophus minutus é arborícola e noturno, reproduzindo-se em poças permanentes, poças temporárias e brejos (Reginaldo A. Machado & Paulo S. Bernarde, 2002), principalmente na estação quente e chuvosa, de novembro a maio (Lima *et al.*, 2005 ; Toledo *et al.*, 2003). Os machos

vocalizam sobre arbustos que pendem sobre poças (Reginaldo A. Machado & Paulo S. Bernarde, 2002; Lima *et al.*, 2005), sendo a sua frequência acústica a principal variável usada na discriminação individual (Toledo *et al.*, 2003). As vocalizações nesses indivíduos podem ser influenciadas pelo comprimento rostro-cloacal, massa corporal, temperatura do ar e pela distância do chamado de outros machos (Toledo *et al.*, 2003). Indivíduos machos podem apresentar interações agonísticas durante os turnos de vocalização, o que pode resultar em combates físicos (Reginaldo A. Machado & Paulo S. Bernarde, 2002). Também é possível observar o comportamento de machos satélites (Haddad 1991;1992) onde um indivíduo fica sem vocalizar próximo a um macho que vocaliza aguardando uma vaga no sítio de vocalização ou para interceptar uma eventual fêmea que se aproxime. As fêmeas depositam cerca de 400 ovos, que ficam aderidos a plantas emergentes em poças, como uma massa globular. As larvas eclodem e caem dentro da água para completar o desenvolvimento. Os girinos ficam dispersos na coluna de água (Reginaldo A. Machado & Paulo S. Bernarde, 2002 ; Lima *et al.*, 2005).

***Dendropsophus microps* (Hylidae; Peter, 1872)**

Dendropsophus microps possui menos de 30 mm e tem sua localidade-tipo em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Sua distribuição vai do Sul do Estado da Bahia (Silvano e Pimenta 2001) ao Norte do Rio Grande do Sul (Kwet e DiBernardo 1999). Sabe-se também que ocorre nos estados de Minas Gerais (Haddad *et al.*, 2008), Espírito Santo (Prado e Pombal Jr. 2005), Rio de Janeiro (Santos *et al.*, 1998), São Paulo (Heyer *et al.*, 1990, Bertoluci e Rodrigues 2002a; Bertoluci e Rodrigues 2002b; Pombal Jr. e Gordo 2004), Paraná (Conte E Rossa-Feres 2006, 2007) e Santa Catarina (Deiques *et al.*, 2007). Fábio Maffei *et al.* (2009) expandiu a distribuição para a região centro-oeste do estado de São Paulo, onde a formação vegetal nestas novas áreas de ocorrência para a espécie é o Cerrado com influência da Floresta Semidecidual Sazonal (Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, 2008). Com isso, amplia-se o ambiente em que pode-se observar, antes restritos a áreas de Mata Atlântica, especificamente em florestas úmidas em planaltos ou planícies costeiras (Faivovich *et al.* 2005), e agora também em fragmentos florestais, bem como em campo aberto (Fábio Maffei *et al.*, 2009).

***Hypsiboas latistriatus* (Hylidae; Caramaschi & Cruz, 2004)**

Hypsiboas latistriatus é endêmica do Brasil e tem registro em apenas duas localidades do Estado de Minas Gerais: próximo ao Parque Nacional do Itatiaia, na Serra da Mantiqueira, a cerca de 2.160m acima do nível do mar e do município de Marmelópolis, a cerca de 1.200m acima do nível do mar. Sem informações quanto seu status populacional, sabe-se que habita a Mata Atlântica de altitude, presumindo-se ser uma espécie com desenvolvimento larval, e usar riachos para reprodução (Stuart, 2006).

***Hypsiboas polytaenius* (Hylidae; Cope, 1870)**

Hypsiboas polytaenius apresenta uma ampla distribuição e uma tolerância a uma ampla gama de habitats. A espécie é endêmica do Brasil, conhecida na Serra dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Foi registrada a uma altitude acima de 900m acima do nível do mar. Em seu ambiente é uma espécie comum e a tendência atual da população é estável. *H. polytaenius* ocorre em vegetação ao redor de lagoas abertas. Os ovos são depositados em massas gelatinosas, que flutuam na água de piscinas permanentes e também temporárias, com fluxo de água lento. É muito adaptável e é encontrada em quase todo o habitat onde há água disponível para produzir (Gonçalves da Cruzj & Caramaschi, 2010).

***Melanophryniscus moreirae* (Bufonidae; Miranda-Ribeiro, 1920)**

O gênero bufonídeo *Melanophryniscus* contém 25 espécies, todas distribuídas no Sudeste da América do Sul (Frost, 2009). *Melanophryniscus moreirae* é conhecida do Parque Nacional do Itatiaia, na Serra da Mantiqueira, na fronteira do Rio de Janeiro e Estado de Minas Gerais, de 1.800-2.400m de altitude (Bokermann, 1967). É uma espécie diurna que ocorre em áreas pantanosas ao longo de rios com águas límpidas e frias. Mede 1,3 centímetros e pesa 2,5 gramas na média. Tem a barriga vermelha, mas o dorso é escuro. Os *Melanophryniscus* hibernam durante o inverno, em um período médio de quatro meses. Quando as primeiras chuvas começam a cair, despertam e iniciam a reprodução, sempre longa e, muitas vezes, frenética. A cópula dura 24 horas, pelo menos. Depositam seus ovos em poças temporárias formadas pela chuva. Não se sabe se é ou não capaz de se adaptar à perturbação do habitat. A área conhecida da espécie é restrita ao Parque Nacional do Itatiaia. Quando ameaçados, mostram um comportamento defensivo chamado “unken reflex” (Duellman e Trueb 1994) onde o indivíduo arqueia as costas, erguendo a cabeça e a parte posterior do corpo enquanto permanece imóvel.

***Pleurodema bufoninum*, (Leptodactylidae; Bell, 1843)**

Uma espécie de tamanho que varia entre pequeno emediano, possuidistribuição geográfica da Argentina ao Chile, nos ecossistemas de estepa patagônica, locais de transição e florestas andinas patagônicas. É o anfíbio com maior distribuição latitudinal no mundo, sendo encontrado do nível do mar até os 2300m, tendo registros de observação em 51°S (Ceí, 1972). Os períodos de atividades são totalmente sazonais e noturnos, não apresentando atividade durante o inverno (Céi, 1972, 1980; Úbeda, 2010). Os girinos são comuns em poças no começo da primavera em águas com temperaturas muito variadas que vão desde quase o ponto de congelamento até os 23°C (Navas et al. 2010).

***Ologygon brieni* (Hylidae; De Witte, 1930)**

Ologygon brieni é uma espécie endêmica do Brasil, onde pode ser encontrada na Serra do Mar nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Frost, 2014; Caramaschi, 2004). É uma espécie moderadamente comum com a tendência atual da população estável. *O. brieni* pode ser encontrada em folhas ou caules de vegetação baixa, próximo a córregos ou lagoas, em florestas com crescimento secundário ou clareiras, também sendo encontrada em habitats perturbados, como pastagens. Reproduz-se em poças de água naturais ou artificiais, com fluxo lento. É necessário mais pesquisas sobre o grau de ocorrência e o estado da população.

***Scinax duartei* (Hylidae; Lutz, 1951)**

É uma espécie endêmica do Brasil, com dois registros reconhecidos para o Brejo da Lapa, um no município de Itatiaia (localidade tipo), estado do Rio de Janeiro (Lutz, 1952) e outro no município de Itamonte, no estado de Minas Gerais (Magrini et al. 2011). É uma espécie arborícola, encontrada em vegetação próxima a lagoas e riachos de baixo fluxo em áreas abertas de altitude (acima de 1.000m), se reproduzindo em lagoa de baixo fluxo, onde deposita seus ovos e os girinos se desenvolvem (Bertoluci & Cruz 2010). A espécie é comum ao longo de sua distribuição e sua tendência populacional é desconhecida.

Scinax duartei é listado como “pouco preocupante” pela IUCN tendo em vista a sua distribuição razoavelmente grande, população presumidamente grande, e porque é improvável o seu declínio para qualificar em uma categoria de maior ameaça. A principal localidade onde há registros da espécie estão muito próximas (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e na fronteira entre esses estados a principal ameaça à espécie é o trânsito não controlado de veículos ao lado da única lagoa (conhecidamente) que a espécie utiliza como ambiente reprodutivo. Caso

esse fluxo não seja controlado a espécie poderá alcançar um grau mais elevado de risco de extinção em pouco tempo.

***Scinax hayii* (Hylidae; Barbour, 1909)**

Scinax hayii é uma espécie endêmica do Brasil, descrita na localidade de Petrópolis no Estado do Rio de Janeiro, apresentando distribuição geográfica, segundo Frost (2014), na Serra do Mar ocorrendo desde o Estado do Espírito Santo até o Estado de Santa Catarina, sudeste do Brasil. Entretanto, registros de *S. hayii* são relatados para Serra da Mantiqueira. A espécie tolera uma ampla gama de habitats e devido ao fato que é improvável que esteja em rápido declínio para qualificar na listagem em uma categoria mais ameaçada. Vive em planícies primárias e secundárias de florestas de altitude, avistadas principalmente em bordas de floresta e áreas abertas. São geralmente encontradas em vegetação baixa, perto de riachos e lagoas, reproduzindo-se nestes ambientes. É uma espécie muito adaptável, não enfrentando nenhuma ameaça conhecida.