UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Efeito do estresse hídrico sobre a locomoção e morfologia de girinos de
Leptodactylus fuscus e *Physalaemus nattereri*

Diego Pimentel Venturelli

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO – SP
2016

DIEGO PIMENTEL VENTURELLI

Efeito do estresse hídrico sobre a locomoção e morfologia de girinos de
Leptodactylus fuscus e *Physalaemus nattereri*

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Orientador: Wilfried Klein

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto - SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Venturelli, Diego Pimentel

Efeito do estresse hídrico sobre a locomoção e morfologia de girinos de *Leptodactylus fuscus* e *Physalaemus nattereri*

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: Wilfried Klein

1. Poças temporárias 2. Dessecação 3. Morfometria linear 4. Histologia
5. Estereologia.

Nome: VENTURELLI, Diego Pimentel

Título: Efeito do estresse hídrico sobre a locomoção e morfologia de girinos de *Leptodactylus fuscus* e *Physalaemus nattereri*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biologia Comparada.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilfried Klein, pela oportunidade e contribuições para realização desse trabalho e principalmente para minha formação profissional.

À Profa. Dra. Elizabeth Spinelli de Oliveira, pelo espaço cedido para a realização dos experimentos.

À Profa. Dra. Elenice Varanda e ao Ricardinho por ceder o estereoscópio para fotografar as lâminas.

À Profa. Dra. Tiana Kohlsdorf, por me apresentar o Prof. Dr. Wilfried Klein e pelas sugestões no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Morfo-Fisiologia de vertebrados, Pedro Baú, Gustavo Oda, Tábata Cordeiro, Ana Paula Braga, Rafaela Volpi, Paulo de Oliveira, Yasmin Marini, Heloisa Flores pelo convívio e trocas de experiências profissionais e pessoais. À Susie Rocha pelo suporte logístico e ajuda durante essa etapa.

Aos demais colegas, Lucas Mariotto, Leandro Magrini, Marcos Celani que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão desse trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio e compreensão em todas as decisões da minha vida.

À Muriele, por ser tão especial e essencial em minha vida.

*“If I have seen further it is by standing on
the shoulders of Giants”*

(Isaac Newton)

RESUMO

VENTURELLI, D. P. **Efeito do estresse hídrico sobre a locomoção e morfologia em girinos de *Leptodactylus fuscus* e *Physalaemus nattereri***. 2016. 60f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Diversas espécies de anuros da família Leptodactylidae se reproduzem em corpos d'água sazonais, temporários e mantidos exclusivamente por chuvas. Em períodos de estiagem prolongada a poça pode secar completamente, ocasionando elevadas taxas de mortalidade de ovos e girinos dessas espécies, podendo exercer forte pressão seletiva na evolução de mecanismos de resistência e sobrevivência nas fases iniciais do desenvolvimento. Algumas espécies de girinos conseguem sobreviver cerca de cinco dias fora d'água o que pode proporcionar uma adaptação vantajosa, porque possibilita a sobrevivência dos girinos por um período que pode ser suficiente para a reincidência de novas chuvas e restabelecimento do corpo d'água. Apesar dessa capacidade de sobrevivência, pouco se sabe sobre as possíveis modificações que a desidratação pode causar na locomoção e na morfologia durante o desenvolvimento desses animais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do estresse hídrico: (1) no nível de sobrevivência e perda de massa corpórea; (2) no desempenho locomotor; (3) na morfologia externa (morfometria linear) e interna, analisando tanto o volume total quanto o volume visceral (estereologia); e (4) no tempo até metamorfose após o estresse. Utilizamos girinos de duas espécies de anuros, *Leptodactylus fuscus* (Leptodactylinae) e *Physalaemus nattereri* (Leiuperinae), ambas as espécies se reproduzem em corpos d'água temporários, em áreas com estação seca definida estando, portanto sujeitas as mesmas pressões seletivas. Além disso, as duas espécies apresentam modos reprodutivos diferentes, podendo apresentar diferentes graus de resistência ao estresse hídrico. Os girinos das duas espécies foram divididos em dois grupos, os que ficaram em água (grupo controle) e os que foram submetidos ao estresse hídrico (grupo tratamento), por três períodos de tempo (12, 24 e 72 horas). Houve diferenças significativas para valores de perda de massa entre os grupos controle e tratamento em ambas as espécies, sendo o grupo tratamento que mais perdeu massa corpórea em todos os períodos, além disso, quase metade dos girinos de *P. nattereri* morreram em 36 horas

de estresse. Não houve diferenças significativas para os dados de desempenho locomotor e volume total entre os grupos testado para girinos de *L. fuscus*, mas houve diferenças morfométricas significantes nos componentes relacionados a cauda e no volume visceral, onde, o intestino do grupo tratamento foi menor que do controle. Já em *P. nattereri*, houve diferenças significativas entre os grupos testados para desempenho locomotor, volume total, morfometria da cauda e volume visceral, sendo o estomago e anexo do tratamento maior que do controle. Nossos resultados sugerem que a exposição ao estresse hídrico não afeta significativamente a morfologia e o desempenho locomotor dos girinos de *L. fuscus*. No entanto, girinos de *P. nattereri* apresentaram uma sensibilidade ao estresse hídrico prolongado, principalmente sobre o seu desempenho locomotor.

Palavras chave: Poças temporárias, dessecação, morfometria linear, histologia, estereologia.

ABSTRACT

VENTURELLI, D. P. **Effect of hydric stress on locomotion and morphology in tadpoles of *Leptodactylus fuscus* e *Physalaemus nattereri***. 2016. 60f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Several species of frogs (Leptodactylidae) breed in temporary pools maintained exclusively by rainfall. These pools easily dry out causing high mortality of eggs or tadpoles thereby possibly exerting strong selective pressure on the evolution of resistance mechanisms and survival in the early stages of development. However, the tadpoles of some species can survive up to five days in pools that are drying out, needing only a humid substrate for development which can provide an advantageous adaptation, because it enables the survival of tadpoles for a period that may be enough for the recurrence of new rains and restoration of the water body. Despite this ability to survive out of water, it is not known which possible damages dehydration stress causes in tadpoles during their ontogeny. The aim of this study was to evaluate the effect of hydric stress on: (1) the level of survival and weight loss; (2) locomotor performance; (3) external (linear morphometry) and internal morphology, analyzing the total volume and visceral volume (stereology); and (4) the time of development after stress. We used tadpoles of two species, *Leptodactylus fuscus* (Leptodactylinae) and *Physalaemus nattereri* (Leiuperinae), both species breed in temporary ponds in areas with well-defined dry season therefore these species are subject to the same selective pressure. In addition, the two species show different reproductive modes, and may possess different degrees of resistance to water stress. To this end, the tadpoles were divided into two groups, those who stayed in 100 ml of water (control group) and those that were subjected to hydric stress (treatment group) for three time periods (12, 24 and 72 hours). Significant differences for weight loss were found between the groups (control/treatment) in both species, with the treatment group losing more weight in all stress levels. Furthermore almost half of *P. nattereri* tadpoles died within 36 hours of stress. There was no significant difference for locomotor performance and total volume between control group and treatment group of *L. fuscus* tadpoles, but morphometric

analyses indicated a significant difference in the components related to tail and visceral volume, with the gut of the treatment group was lower than the control. In *P. nattereri* tadpoles, there were significant differences between the groups tested for locomotor performance, total volume, tail morphometry and visceral volume, with the stomach of the treatment group being greater than in the control group. Our results suggest that hydric stress has a significant effect on locomotion and morphology of *P. nattereri* tadpoles, but not in *L. fuscus*.

Key words: Temporary pools, desiccation, linear morphometry, histology, estereology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Girinos pós-ninho (vivos) de <i>L. fuscus</i> aglomerados debaixo de folhas e pedras em uma poça completamente seca em Igarapava – SP no mês de Dezembro de 2015. Fotografia: Diego P. Venturelli.....	17
Figura 2: Representação esquemática do experimento e seus respectivos números amostrais, para cada espécie.....	24
Figura 3. Disposição dos recipientes dentro da caixa para filmagem.....	25
Figura 4. Representação das posições e regiões que foram mensuradas. TH: altura da cauda; THM: altura da musculatura da cauda; TL: comprimento da cauda; BL: comprimento do corpo; BH: altura do corpo; BW: largura do corpo; T: comprimento total.....	27
Figura 5. Grade sobreposta a uma foto de um corte (região abdominal) de girino de <i>P. nattereri</i> , a seta representa um dos pontos da categoria Intestino. M: musculatura epaxial; N: Notocorda; V: Vertebra; F: Fígado; E: Estômago.	29
Figura 6. Representação do caminho traçado por girinos dos grupos controle e tratamento no período de 12 horas. <i>L. fuscus</i> (A e B); <i>P. nattereri</i> (C e D), sendo A e C: tratamento (4 mL); B e D: controle (100 mL).	32
Figura 7. Resultado da análise de locomoção (Média ± Erro padrão). A e B representam atividade de nado (%), C e D Distância percorrida (cm), e E e F Velocidade de fuga (cm.s-1) sendo: A, C e E dados de <i>P. nattereri</i> e B, D e F dados de <i>L. fuscus</i> . (*) comparação entre os grupos experimentais, sendo: *** P<0,001, ** P<0,01, * P<0,05. (#) comparação com controle 12h, sendo: ## p<0,01; (x) comparação com controle 24h, sendo: xxx P<0,001; xx P<0,01; x P<0,05.....	34
Figura 8. Box plot do tempo (dias) que os girinos de <i>L. fuscus</i> levaram para se metamorfosear após os experimentos. Abaixo do gráfico, o número de indivíduos que metamorfosearam em seus respectivos grupos (controle e tratamento) e período de tempo.....	35
Figura 9. Volume total (cm ³), determinado pelo método de suspensão (Arquimedes). * diferença significativa entre os grupos experimentais 36h (Tukey P<0,001); (a) diferença significativa entre os tratamentos 12h e 36h (Tukey P<0,0001).	37
Figura 10. Proporções (médias ± desvio padrão) de volumes (%) de cada componente corporal dos girinos de <i>Physalaemus nattereri</i> e <i>Leptodactylus fuscus</i>	38
Figura 11. Regressão linear dos dados (logaritmizados) de velocidade fuga pelo comprimento da cauda: A - <i>P. nattereri</i> R ² =0,45; P<0,0001, B - <i>L. fuscus</i> R ² =0,03; P=0,21. Regressão linear dos dados (logaritmizados) de velocidade de fuga pela altura da cauda: C - <i>P. nattereri</i> R ² =0,47; P<0,0001, D - <i>L. fuscus</i> R ² = 0,002; P=0,3. Dados plotados no programa R.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão da capacidade de sobrevivência de girinos de diversas espécies de anuros em condições de estresse hídrico. Note que os girinos das espécies que possuem desova terrestre são os que sobrevivem mais tempo fora da água. 16

Tabela 2. Perda de massa corpórea (média $\pm$ desvio padrão) nos girinos pós-ninho (Gosner 29-34) referentes a cada período de tempo experimental. Os valores entre parênteses representam o tamanho amostral inicial e aqueles entre colchetes, o número de girinos sobreviventes em cada tratamento independentemente. O valor de significância para as comparações entre os grupos controle e tratamento (Tukey) foi $P < 0,0001$ para todos os períodos de tempo em ambas as espécies. 30

Tabela 3. Dados morfométricos (média $\pm$ desvio padrão) de ambos os grupos (controle e tratamento) de girinos de *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus* em todos os períodos de tempo. As comparações foram feitas com os valores residuais de cada medida. 35

Tabela 4. Valores (média $\pm$ desvio padrão) das porcentagens referentes à categoria Musculatura em ambos os grupos experimentais (controle tratamento) de girinos de *P. nattereri* e *L. fuscus*. 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos e predições	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Espécies	20
3.2 Área de coleta	21
3.3 Grupos experimentais.....	21
3.4 Perda de massa	23
3.5 Análise de Locomoção	24
3.6 Análises Morfológicas.....	25
3.6.1 Morfometria linear.....	26
3.6.2 Volume total.....	27
3.6.3 Volume visceral.....	27
3.6.3.1 Estereologia.....	28
4 RESULTADOS	30
4.1 Perda de massa	30
4.2 Locomoção.....	31
4.3 Tempo de metamorfose	34
4.4 Morfometria linear	34
4.5 Volume total.....	36
4.6 Volume visceral (Estereologia).....	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	45
7 REFERENCIAS.....	46
ANEXO I - PROTOCOLO PARA HISTOLOGIA.....	55
APÊNDICE I - Effect of hydric stress during development on metabolic rate in imago of <i>Leptodactylus fuscus</i>	56

1 INTRODUÇÃO

Durante o período Devoniano, a conquista do ambiente terrestre pelos primeiros tetrápodes foi uma das mais importantes transições na história evolutiva dos vertebrados, influenciando diretamente sua morfologia, fisiologia e diversidade do grupo (CLACK, 1997; 2006; ASHLEY-ROSS et al., 2013).

Devido à alta permeabilidade do tegumento dos anfíbios (fundamental para as trocas gasosas e hídricas) e a perda de água derivada principalmente da excreção e evapotranspiração, os anfíbios ainda mantêm forte dependência aos ambientes aquáticos ou úmidos, sendo o ambiente terrestre um dos grandes desafios para a sobrevivência e reprodução desses animais (MCNAB, 2002; LILLYWHITE, 2006; HADDAD et al, 2008). A capacidade de tolerar a perda de água é bastante variável entre os anfíbios e pode estar relacionada ao hábito do animal, sendo as espécies de hábito terrestre mais tolerantes a desidratação do que as espécies de hábito aquático (THORSON; SVIHLA, 1943; MCNAB, 2002).

Representando 88% dos anfíbios viventes, a ordem Anura possui a maior diversidade, sendo conhecidas 6594 espécies (FROST, 2016). A grande maioria das espécies de anuros se reproduz por meio da fertilização externa e apresentam desenvolvimento indireto com estágio larval aquático e um pós-metamórfico terrestre (DUELLMAN; TRUEB, 1994; HADDAD et al, 2008). Entretanto, esse grupo apresenta uma grande variedade de modos reprodutivos, incluindo desde deposição dos ovos diretamente na água até desova terrestre, desenvolvimento direto e viviparidade (HADDAD; PRADO, 2005; HADDAD et al, 2008).

Diversas espécies de anuros da família Leptodactylidae depositam seus ovos em ninhos de espuma construídos pelos adultos durante o amplexo. Os girinos crescem inicialmente no ninho, porém completam o desenvolvimento larval na água em aproximadamente 20–45 dias (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Muitas dessas espécies se reproduzem em corpos d'água sazonais, temporários e mantidos exclusivamente por chuvas (GIARETTA et al., 2008). Em período de estiagem a poça pode secar completamente, ocasionando elevadas taxas de mortalidade de ovos e girinos dessas espécies (GIARETTA; MENIN, 2004; SILVA et al., 2005; GIARETTA; FACURE, 2006; SILVA; GIARETTA, 2008).

De fato, a dessecação representa fator importante na mortalidade de girinos de espécies tropicais que utilizam poças temporárias e deve exercer forte pressão seletiva na evolução de mecanismos de resistência e sobrevivência nas fases iniciais do desenvolvimento (HEYER et al., 1975; DOWNIE, 1984; NEWMAN, 1992; LAURILA; KUJASALO, 1999; DOWNIE; SMITH, 2003). A antecipação da metamorfose e a resistência ao estresse hídrico têm sido sugeridas como possíveis mecanismos de resposta a essa pressão seletiva (DOWNIE, 1984; CRUMP, 1989; NEWMAN, 1992; LAURILA; KUJASALO, 1999; DOWNIE; SMITH, 2003).

Em animais de ciclo de vida complexo, acelerar o desenvolvimento larval em poças que estão secando é um clássico exemplo de plasticidade fenotípica, no entanto o tempo de desenvolvimento está associado com a diminuição ou aumento da massa corpórea dos metamorfoseados (TRAVIS, 1983; WASSERSUG, 1986; ALFORD; HARRIS, 1988; NEWMAN, 1992; TEJEDO; REQUES, 1994; DENVER et al, 1998; MERILA, et al., 2000; RICHTER-BOIX, et al, 2011; PATTERNS et al., 2016). A antecipação da metamorfose pode ser desencadeada por diversos fatores, como: diminuição do nível da água (CRUMP, 1989; LOMAN, 1999; LEIPS, et al., 2009; SZÉKELY, et al., 2010), quantidade de predadores (LAURILA; KUJASALO, 1999; RICHARDSON, 2001), temperatura (NEWMAN, 1992; LOMAN, 2002; ANGILLETTA et al., 2004), qualidade e quantidade de alimento (CRUMP, 1990; LEIPS; TRAVIS, 1994; KUPFERBERG, 1997; MOREY; REZNICK, 2000; ÁLVAREZ; NICIEZA, 2002) e densidade populacional (SEMLITSCH; CALDWELL, 1982; NEWMAN, 1987).

Já a capacidade de algumas espécies de girinos aquáticos resistirem ao estresse hídrico foi descrita sucintamente em notas qualitativas (VALERIO, 1971; BLACK, 1974; JONES, 1980; CANDELAS et al., 1981; DOWNIE, 1984). Apenas um trabalho apresentou dados experimentais sobre os possíveis mecanismos de resistências (DOWNIE; SMITH, 2003). Algumas espécies de girinos aquáticos (e.g., *Spea bombifrons*, *Leptodactylus fuscus*) conseguem sobreviver até cinco dias fora da água, aglomerando-se em refúgios ainda úmidos (e.g. embaixo de folhas e pedras) após a secagem completa do corpo d'água durante estiagens prolongadas (Figura 1) (VALERIO, 1971; BLACK, 1974; JONES, 1980; CANDELAS et al., 1981; DOWNIE, 1984; LIMA et al., 2006; SILVA; GIARETTA, 2008). Essa capacidade pode representar uma adaptação vantajosa, porque possibilita a sobrevivência dos girinos por um período que pode ser suficiente para a reincidência de novas chuvas e

restabelecimento do corpo d'água (VALERIO, 1971; BLACK, 1974; DOWNIE; SMITH 2003). Entretanto, a capacidade de sobrevivência fora da água não é comum a girinos de todas as espécies que se reproduzem em poças temporárias mesmo estando sob as mesmas pressões seletivas (ver Tabela 1).

Figura 1: Girinos pós-ninho (vivos) de *L. fuscus* aglomerados debaixo de folhas e pedras em uma poça completamente seca em Igarapava – SP no mês de Dezembro de 2015. Fotografia: Diego P. Venturelli.

Tabela 1. Revisão da capacidade de sobrevivência de girinos de diversas espécies de anuros em condições de estresse hídrico. Note que os girinos das espécies que possuem desova terrestre são os que sobrevivem mais tempo fora da água.

Espécies	Família	Tipo de desova	Tempo de sobrevivência (horas)	Tipo de Substrato	Temperatura (°C)	Referência
<i>Colostechus</i> sp	Aromobatidae	Aquática	7	1	22-26	Valério (1971)
<i>Rhinella marina</i>	Bufonidae	Aquática	10	1	22-26	Valério (1971)
<i>Dendropsophus ebraccatus</i>	Hylidae	Aquática	13	1	22-26	Valério (1971)
<i>Agalychnis callidryas</i>	Hylidae	Arbórea	20	1	22-26	Valério (1971)
<i>Rhinella humboldti</i>	Bufonidae	Aquática	menos de 24	2	34-38	Downie e Smith (2003)
<i>Smilisca phaeota</i>	Hylidae	Aquática	24	1	22-26	Valério (1971)
<i>Engytomops pustulosus</i>	Leptodactylidae	Aquática	24	3	28-29	Downie e Smith (2003)
<i>Spea bombifrons</i>	Scaphiopodidae	Terrestre	mais de 36	2	20-37	Black (1974)
<i>L. fuscus</i>	Leptodactylidae	Terrestre	mais de 48	3	28-29	Downie e Smith (2003)
<i>Mannophryne trinitatis</i>	Aromobatidae	Terrestre	mais de 48	3	28-29	Downie e Smith (2003)
<i>L. fuscus</i>	Leptodactylidae	Terrestre	120	2	34-38	Downie e Smith (2003)
<i>Leptodactylus poecilochilus</i>	Leptodactylidae	Terrestre	140	1	22-26	Valério (1971)
<i>L. pentadactylus</i>	Leptodactylidae	Terrestre	mais de 156	1	22-26	Valério (1971)
<i>L. albilabris</i>	Leptodactylidae	Terrestre	960	4	?	Candelas (1981)

Tipo de substrato: (1) Papel filtro umedecido com 2 mL de água; (2) Campo (poça seca); (3) Papel filtro umedecido com 4-8 mL de água; (4) Algodão úmido.

Curiosamente, os registros de girinos capazes de sobreviver alguns dias fora d'água são de espécies que possuem desovas terrestres (Tabela 1). Assim, uma possível associação entre desovas terrestres e resistência ao estresse hídrico vem sendo mencionada (CANDELAS; GOMES, 1963; SHOEMAKER; McCLANAHAN, 1973; JONES, 1980; DOWNIE; SMITH 2003).

Diferente dos adultos que absorvem água pela pele e podem armazenar água na bexiga (HILLYARD, 1999), pouco se sabe sobre os mecanismos utilizados pelos girinos para resistirem à desidratação (McDIARMIND; ALTIG, 1999). Downie e Smith (2003) exploraram experimentalmente possíveis mecanismos que possibilitam a girinos de *L. fuscus* sobreviverem alguns dias fora da água. Os experimentos evidenciaram que os girinos perdem, proporcionalmente, mais água no intestino do que em outras partes do corpo, sugerindo assim um controle fisiológico para perda de água em diferentes compartimentos corporais. Outro possível mecanismo de resistência a dessecação, seria a capacidade dos girinos produzirem espuma, como demonstrado para girinos de *L. fuscus* (DOWNIE, 1984; CALDWELL; LOPEZ, 1989; KOKUBUM; GIARETTA, 2005; LUCAS et al., 2008), *L. latinus* (PONSSA; BARRIONUEVO, 2008), *L. mystaceus* (CALDWELL; LOPEZ, 1989), *L. labyrinthicus* (KOKUBUM; GIARETTA, 2005; SHEPARD; CALDWELL, 2005) e *Adenomera* sp (KOKUBUM; GIARETTA, 2005). Além disso, Downie (1994) evidenciou em girinos de *L. fuscus*, a habilidade de, temporariamente, atenuar seu desenvolvimento em condições de estresse hídrico.

Em Leptodactylidae, a capacidade de girinos pós-ninho resistentes à dessecação tem sido reportada exclusivamente para espécies do gênero *Leptodactylus*, principalmente para espécies pertencentes aos grupos *L. fuscus* (e.g. *L. fuscus* e *L. albilabris*) e *L. pentadactylus* (e.g. *L. pentadactylus* e *L. labyrinthicus*), os quais possuem desovas terrestres (Tabela 1) (VALERIO, 1971; CANDELAS et al., 1981; DOWNIE, 1984; LIMA et al., 2006; SILVA; GIARETTA, 2008).

Apesar de girinos de algumas espécies de *Leptodactylus* sobreviverem alguns dias fora da água, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos que a desidratação pode causar ao longo do desenvolvimento desses animais. Experimentalmente, girinos de *L. fuscus* perdem cerca de 23% de sua massa corporal em 24 horas de estresse hídrico (DOWNIE; SMITH, 2003). Além disso, dados histológicos mostram, qualitativamente, uma aparente diminuição no volume do intestino de girinos de *L. fuscus* submetidos ao estresse hídrico (DOWNIE; SMITH, 2003). Em espécies menos resistentes, como *Engystomops pustulosus* (desova aquática), além da alta mortalidade, a perda de massa

corporal pode chegar a 30% em 24 horas de estresse hídrico (DOWNIE; SMITH, 2003). Assim, podemos questionar se a desidratação pode afetar significativamente a morfologia interna e externa dessas espécies, sendo elas resistentes ou não.

Em anuros adultos a desidratação pode causar perdas significativas de água no sistema nervoso (CHURCHILL; STOREY, 1994, 1995) e afetar a performance locomotora (PREEST; POUGH, 1989; 1999). A locomoção além de importante no forrageamento e escape de predadores (WASSERSUG; SPERRY, 1977; FEDER, 1983; WATKINS, 1996; MCCOLLUM; LEIMBERGER, 1997; LAURILA; KUJASALO, 1999), parece ser fundamental na sobrevivência dos girinos à dessecação, pois permite que os girinos se desloquem até refúgios ainda úmidos em poças completamente secas (VALERIO, 1971; BLACK, 1974; JONES, 1980; CANDELAS et al., 1981; DOWNIE, 1984; LIMA et al., 2006; SILVA; GIARETTA, 2008). No entanto, ainda não é conhecido se o estresse hídrico pode inviabilizar o desempenho locomotor desses girinos.

Deste modo, o conhecimento sobre os possíveis efeitos do estresse hídrico sob a morfologia e desempenho locomotor de girinos de espécies mais resistentes e menos resistentes a desidratação, são importantes para responder essas perguntas e entender como esses animais estão lidando com essa pressão seletiva, assegurando o seu sucesso reprodutivo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do estresse hídrico no desempenho locomotor e na morfologia de girinos de duas espécies de anuros, *Leptodactylus fuscus* (Leptodactylinae) e *Physalaemus nattereri* (Leiuperinae). Ambas as espécies se reproduzem em corpos d'água temporários, em áreas com estação seca definida estando, portanto sujeitas as mesmas pressões seletivas. Além disso, as duas espécies apresentam modos reprodutivos diferentes, modo 30 (desova terrestre) e 11 (desova aquática) respectivamente (HADDAD; PRADO, 2005), podendo apresentar diferentes graus de resistência ao estresse hídrico.

2.2 Objetivos específicos e predições

Para responder o objetivo geral, foram erigidos os seguintes objetivos específicos: (1) Avaliar o nível de sobrevivência e grau de desidratação; (2) Analisar o possível efeito do estresse hídrico no desempenho locomotor; (3) Avaliar a morfologia externa (morfometria linear) e interna, analisando tanto o volume total quanto o volume visceral (estereologia) dos girinos de *L. fuscus* e *P. nattereri*; e (4) Computar o tempo até metamorfose após o estresse.

Nossa predição é de que haverá diferença para valores de perda de massa entre os grupos experimentais em ambas as espécies, como já demonstrado por Downie e Smith (2003) para girinos de *L. fuscus* e *E. pustulosus*. Além disso, devido girino de *L. fuscus* apresentar alguns mecanismos de resistência a dessecação, como produção de espuma (DOWNIE, 1984) e comportamento de se aglomerar (Figura 1), possivelmente o desempenho locomotor e a morfologia desses girinos não serão afetados após serem submetidos ao estresse hídrico. Esperamos também, que a exposição durante algum tempo fora da água possa afetar o tempo de desenvolvimento das duas espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécies

Analizamos a resistência ao estresse hídrico em girinos de duas espécies de anuros que se reproduzem durante a estação chuvosa em corpos d'água temporários. As espécies, nos locais coletados, são sintópicas e estão sujeitas a dessecação devido à secagem da poça em período de estiagem. *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) (Leptodactylidae: Leiuperinae) constrói seu ninho de espuma (desova) na superfície da água (modo 11, HADDAD; PRADO, 2005). Já os ninhos de *Leptodactylus fuscus* (Schneider, 1799) (Leptodactylidae: Leptodactylinae) são colocados em câmaras subterrâneas (modo 30, HADDAD; PRADO, 2005) escavadas pelos machos adultos às margens dos corpos d'água (MARTINS, 1988). Os girinos crescem inicialmente no ninho, porém completam o desenvolvimento larval até a metamorfose no corpo d'água adjacente (fase pós-ninho) (BOKERMANN, 1962; GALLARDO, 1964; GIARETTA; KOKUBUM, 2004; SILVA et al., 2005; SILVA; GIARETTA, 2009).

Girinos de *P. nattereri* são bentônicos, possuem um corpo globular, ovoide em vista dorsal e globular em vista lateral (ROSSA-FERES; NOMURA, 2006), alimentando predominantemente de microalgas (ROSSA-FERES, et al., 2004). Em laboratório (24°C) esses girinos completam sua metamorfose em 32 dias (VIZOTTO, 1973). Os girinos de *L. fuscus* também são bentônicos e possuem um corpo deprimido, oval em vista dorsal e globular deprimido em vista lateral (ROSSA-FERES; NOMURA, 2006), e se alimentam predominantemente de fungos e microalgas (ROSSA-FERES, et al., 2004). Em campo os girinos completam seu desenvolvimento por volta de 20-30 dias (BOKERMANN, 1963; STATON; DIXON, 1977; MARTINS, 1988; SOLANO, 1987), mas, em laboratório (22°C), os girinos completam sua metamorfose em 50 dias (SOLANO, 1987). Além disso, girinos de *L. fuscus* vem sendo reportados como resistentes ao estresse hídrico e *P. nattereri* menos resistente (VALERIO, 1971; CANDELAS et al., 1981; DOWNIE, 1984; LIMA et al., 2006; SILVA; GIARETTA, 2008; VENTURELLI; SILVA, 2013).

3.2 Área de coleta

Na estação reprodutiva, entre os meses de novembro de 2014 e janeiro de 2015, foram coletados e identificados (segundo ROSSA-FERES; NOMURA, 2006) 120 girinos, de pelo menos três desovas diferentes, para cada espécie (*L. fuscus* e *P. nattereri*) em corpos d'água temporários nos municípios de Uberaba - MG (20° 47'S, 48° 20' O), Igarapava – SP (20° 02'18"S, 47° 44'49" O) e Ribeirão Preto - SP (21° 10' 40"S, 47° 48' 36" O). Esses municípios estão localizados na região sudeste do Brasil, onde o clima é classificado, segundo Köppen-Geiger, como tipo Aw ou clima tropical com estação seca, apresentando estação chuvosa no verão, e nítida estação seca no inverno. A temperatura média é superior a 18°C com precipitação média anual de 1500 mm (RUBEL; KOTTEK, 2010).

As coletas e os experimentos foram autorizados pelo ICMBIO-SISBIO (licença número 45462-1) e pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da USP campus Ribeirão Preto (Protocolo 14.1.696.53.1).

3.3 Grupos experimentais.

Os experimentos seguem Downie e Smith (2003) e foram realizados em condições controladas de temperatura (24-26°C) e luminosidade (13h claro – 11h escuro) no laboratório de Morfo-fisiologia de vertebrados (FFCLRP-USP, Ribeirão Preto). Os girinos pós-ninhos (estágios 29 a 34, *sensu* GOSNER, 1960) foram previamente aclimatados em caixas plásticas de polietileno (comprimento 58 cm, largura 36 cm, altura 10 cm, capacidade 15L) a essas condições por, pelo menos, cinco dias, sendo mantidos em água decolorificada com oxigenação constante através de bomba de ar e alimentados *ad libitum* com ração para peixe (NutriFlakers).

Antes dos experimentos, os girinos (estágios 29 a 34) foram submetidos a jejum por 24 horas e depois transferidos (aleatoriamente) e divididos em dois grupos: um grupo controle (n=60), onde os girinos foram mantidos em recipientes plásticos (300 mL; base 9 cm diâmetro) com 100 mL de água decolorificada; e um grupo tratamento (n=60), onde os girinos foram submetidos ao estresse hídrico, sendo transferidos para recipientes plásticos (300 mL; base 9 cm diâmetro) tendo como substrato dois papéis filtro umedecidos, uma única vez, com apenas 4 mL de água decolorificada (Figura 2) (segundo DOWNIE; SMITH, 2003).

Os girinos de ambos os grupos experimentais (controle e tratamento) foram mantidos sob essas condições por três períodos de tempo, 12 (n=20), 24 (n=20) e 72 horas (n=20), independentemente (Figura 2). Os potinhos foram tampados não hermeticamente para diminuir a evaporação da água e permitir a entrada de ar. Com os potinhos tampados não hermeticamente a quantidade de água que evaporou (25°C) nos recipientes (n=5) dos controles (100 mL) foram (média $\pm$ desvio padrão) de $0,36 \pm 0,04\%$, $0,60 \pm 0,08\%$ e $0,85 \pm 0,11\%$ após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Nos recipientes (n=5) dos tratamentos (papel filtro umedecido com 4 mL) houve perda evaporativa de $2,19 \pm 0,13\%$, $4,31 \pm 0,27\%$ e $6,06 \pm 0,53\%$ após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Assim, dos 4 mL de água do grupo tratamento no início do experimento, em 72 horas restaram por volta de 3,8mL, ou seja, a condição de hidratação do substrato quase que não se alterou durante todos os períodos de tempo do experimento.

Os girinos de *L. fuscus* levam por volta de 50 dias para se metamorfosear em laboratório a 22 °C (SOLANO, 1987), assim os períodos de tempo de experimento (12, 24 e 72 horas) representam cerca de 1%, 2% e 6%, respectivamente, do tempo total de desenvolvimento dessa espécie. Vizotto (1973) evidenciou em laboratório (24°C), girinos de *P. nattereri* completando a metamorfose em 32 dias, assim o período de tempo do experimento representam cerca 1,6%, 3,1% e 9,4% do tempo de desenvolvimento total desses animais.

Para que ao final do experimento tivéssemos uma amostra para análise morfológica e uma para análise de desempenho locomotor, foram colocados dois girinos em 10 recipientes para ambos os grupos (controle e tratamento). Portanto, obtivemos 10 replicações com dois girinos em cada replicação para cada período de tempo (12, 24 e 72 horas). Ao final do experimento, para cada período de tempo, um girino de cada recipiente tanto dos controles (n=10) quanto dos tratamentos (n=10) foram eutanasiados (benzocaina 300mg/L), fixados em solução de Bouin por 24h e transferidos para álcool 70%, para as análises morfológicas. Os girinos dos grupos controles (n=10) e tratamentos (n=10) restantes foram transferidos para recipientes (300 mL; base 9 cm diâmetro) com 100 mL de água para as análises de locomoção (Figura 2). Após análise de locomoção, os girinos foram mantidos separadamente em recipiente com água e alimentados (*ad libitum*) até atingirem a metamorfose. Em seguida os animais metamorfoseados foram eutanasiados em benzocaina (300mg/L) e após a

confirmação da morte (ausência de mobilidade, de movimentos respiratórios e de batimentos cardíacos) foram fixados em formol (10%).

Figura 2: Representação esquemática do experimento e seus respectivos números amostrais, para cada espécie.

3.4 Perda de massa

Todos os girinos de ambos grupos experimentais (controle e tratamento) tiveram o excesso de água removido com papel toalha e foram pesados (0,001g) antes e depois do experimento, em todos os períodos de tempo, para avaliarmos o quanto esses animais desidrataram durante o estresse hídrico. Além disso, o nível de sobrevivência dos girinos durante o experimento também foi computado.

Para cada replicação, calculamos a média dos pesos dos dois girinos antes e depois do experimento. Os valores de perda de massa foram dados pelas diferenças, em porcentagem, dos pesos antes e depois dos experimentos. Para comparar a perda de massa entre os grupos controle e tratamento em 12, 24 e 72 horas, foi realizado, no programa Prisma® 5.01, teste de análise de variância simples (One-way ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* Tukey.

3.5 Análise de Locomoção

Utilizamos dados de vídeo para avaliar o possível efeito do estresse hídrico no desempenho locomotor dos girinos. Assim, após os experimentos de cada período de tempo, os girinos (vivos) dos grupos controle e tratamento foram transferidos para recipientes (300 mL; base 9 cm diâmetro) com 100mL de água para realização das filmagens.

Uma caixa de papelão (50x40x15cm) foi preparada para evitar que a presença do pesquisador influenciasse nas análises. Essa caixa foi forrada com folhas (A4) brancas pelo lado de dentro, para que a luz refletisse e realçasse os girinos em seus recipientes. Também foram marcados pontos de referências de medidas nas bordas da caixa (10 cm) e fixada uma régua (30 cm) para a calibração das medidas durante as análises dos vídeos (Figura 3). Foi deixada uma abertura na parte superior da caixa para a entrada de luz e para posicionarmos a câmera digital (Samsung WB350F).

As filmagens foram realizadas em duas baterias, nas quais os recipientes dos grupos experimentais foram colocados em agrupamentos de 10 (5 controles e 5 tratamentos) na caixa e filmados durante 15 minutos (Figura 3).

Não houve aclimação, pois nosso objetivo foi avaliar a mobilidade dos girinos logo após o estresse hídrico.

Figura 3. Disposição dos recipientes dentro da caixa para filmagem

O desempenho locomotor foi avaliado através de três variáveis: distância percorrida, atividade de nado e velocidade de fuga. Utilizamos o programa Tracker©v.4.87 para obtermos as coordenadas X e Y do ponto central de cada girino, marcando três pontos por segundo durante os 15 minutos de vídeo. Assim, foram marcados cerca de 2700 pontos (coordenadas) que foram utilizados para calcular, através do somatório da distancia entre dois pontos (Fórmula de Pitágoras $d = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}$), a distância total percorrida pelo girino no recipiente durante esse tempo. Ressaltamos que as medidas no eixo Z, ou seja, o quanto o girino se locomoveu na coluna d'água (vertical), não foram amostradas.

Depois dos 15 minutos de gravação os girinos foram estimulados com um pincel para analisarmos a velocidade máxima atingida (velocidade de fuga). Foram analisados os primeiros 5 segundos após o estímulo, pois o girino atinge a velocidade máxima instante depois do estímulo, em seguida, a velocidade decai e somente atinge a velocidade máxima se estimulado novamente. A atividade de nado foi computada através da porcentagem de tempo em que os girinos estavam ativos em relação ao tempo total do vídeo (15 min).

Para comparar os grupos experimentais em todos os períodos de tempo, utilizamos o teste de análise de variância simples (One-way ANOVA) seguido do teste *post-hoc* Tukey. A estatística e os gráficos foram plotados no programa Prisma® 5.01.

3.6 Análises Morfológicas

Após o estresse hídrico um girino de cada grupo experimental (controle e tratamento) de todos os períodos de tempo (12, 24 e 72 horas) foi fixado para as análises morfológicas (Figura 2) as quais, consistiam em avaliarmos a morfologia externa, pelo método de morfometria linear, e interna, na qual foi analisado tanto o volume total, pelo método Arquimedes (HUGHES, 2005), quanto o volume visceral dos girinos por meio de cortes histológicos.

3.6.1 Morfometria linear

Os girinos fixados foram posicionados entre duas lâminas de vidro, com uma escala conhecida, dentro de uma placa de petri com álcool (70%). Em seguida, os animais foram fotografados (Canon, SX50 HS) em duas posições, lateral e dorsal (Figura 4). Foram tomadas sete medidas morfológicas (programa ImageJ©1.49t), afim de avaliar uma possível diferença morfométrica devido ao estresse hídrico (Figura 4). Para as medidas de altura e largura, foram considerados os maiores valores.

Figura 4. Representação das posições e regiões que foram mensuradas. TH: altura da cauda; THM: altura da musculatura da cauda; TL: comprimento da cauda; BL: comprimento do corpo; BH: altura do corpo; BW: largura do corpo; T: comprimento total.

Devido às medidas lineares serem fortemente relacionadas ao tamanho do corpo, removemos esse efeito utilizando o método de regressão de cada medida contra o tamanho do corpo para estimar a variação residual dessas medidas (PARSON, 2003). Assim, os valores residuais obtidos para cada medida foram comparados de maneira pareada por uma análise multivariada da variância (MANOVA). Para realizar essas análises utilizamos o programa R.

3.6.2 Volume total

O volume total dos girinos (fixados) foi determinado utilizando a técnica de suspensão baseada no princípio de Arquimedes. Segundo Hughes (2005), a técnica de suspensão gera valores de volume mais exatos e precisos do que outras técnicas de medida de volume. Essa técnica consiste em pesar os objetos em um recipiente com água, onde o volume é medido através da divisão desse peso (g) pela densidade da água (g.mL^{-1}) em determinada temperatura. Assim, para calcularmos o peso dos girinos, tiramos em uma balança analítica (0,001g), um béquer com 100 mL de água ($25 \pm 0,8$ °C), cuja densidade foi dada segundo *Handbook of Chemistry and Physics* (1971).

Para comparar os grupos experimentais (controle e tratamento) em todos períodos de tempo, utilizamos o teste de análise de variância simples (One-way ANOVA) seguido do teste *post-hoc* Tukey. A estatística e os gráficos foram plotados no programa Prisma® 5.01.

3.6.3 Volume visceral

O volume visceral foi avaliado por meio de procedimento histológico. Selecionamos aleatoriamente 5 girinos, dos 10 fixados de cada grupo (controle e tratamento) em todos os períodos de tempo para ambas as espécies. Retiramos a cauda de todos os girinos antes de iniciarmos a histologia para melhorar a infiltração do álcool, xilol e parafina nos tecidos.

Os girinos foram desidratados e clarificados, por 55 minutos, em séries crescentes de álcool etílico e xilol, e incluídos em parafina (dois banhos de 2 horas), segundo técnicas histológicas de rotina (Protocolo – Anexo 1). Durante a inclusão em parafina, realizou-se orientação para cortes transversais. Com auxílio de um micrótomo, cabeça e abdômen dos girinos foram cortados inteiros (7 μm de espessura) e sequencialmente os cortes referentes a região abdominal foram aderidos (albumina) a lâminas de vidro (20 cortes por lâminas).

Foram montadas cerca de 20-25 lâminas por girino e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Para obtermos dados quantitativos a partir dos dados histológicos utilizamos o método estereológico (RUSS; DEHOFF, 2000).

3.6.3.1 Estereologia

A estereologia é a ciência das relações geométricas entre uma estrutura tridimensional e as imagens de suas estruturas que são essencialmente bidimensionais (RUSS; DEHOFF, 2000). Assim, o método estereológico possibilita determinar quantitativamente as proporções de volumes de parâmetros tridimensionais de determinadas estruturas a partir de cortes histológicos bidimensionais.

Selecionamos aleatoriamente cerca de 20 cortes (um por lâmina) da região abdominal dos girinos (n=5), os quais foram fotografados em um estereoscópio (Leica M216 – 20X). Os órgãos internos foram agrupados em quatro categorias: Intestino, que corresponde ao intestino delgado, grosso e reto; Estômago e Anexos, que corresponde ao esôfago, estômago, fígado, pâncreas; Musculatura, que corresponde à musculatura epaxial e hipaxial; e Outros, que corresponde a qualquer outra estrutura não contemplada nos agrupamentos anteriores (e.g. vértebra, notocorda).

Os métodos de contagem mais eficientes são aqueles que contam o número de intersecções da estrutura de interesse, como grades, linhas ou pontos (RUSS; DEHOFF, 2000). Assim, imprimimos uma grade quadriculada (1 cm² por quadrado) em transparência (A4), a qual foi fixada na tela do computador sobrepondo a imagem do corte para contagem de pontos de cada estrutura (Figura 5).

Figura 5. Grade sobreposta a uma foto de um corte (região abdominal) de girino de *P. nattereri*, a seta representa um dos pontos da categoria Intestino. M: musculatura epaxial; N: Notocorda; V: Vertebra; F: Fígado; E: Estômago.

O número de pontos (intersecção entre duas linhas – seta figura 5) que atingiu cada categoria foi contado no programa The Happy Counter© rodado no Microsoft Excel. Uma vez analisado todas as estruturas incluídas no corte, foi realizada a soma dos valores de cada estrutura. Os valores obtidos nessa soma foram convertidos em porcentagem para cada categoria utilizando a fórmula:

$$\text{Porcentagem} = \frac{\sum Pv}{Pt} \times 100,$$

sendo “Pv” número de pontos para cada categoria e “Pt” o número de pontos totais de todos os cortes. Esta fórmula foi aplicada para cada categoria (Intestino, Estômago e Anexo, Musculatura e Outros).

Para comparar os grupos controle e tratamento em todos os períodos de tempo, utilizamos o teste de análise de variância simples (One-way ANOVA) seguido do teste *post-hoc* Tukey. A estatística e os gráficos foram plotados no programa Prisma® 5.01.

4 RESULTADOS

4.1 Perda de massa

A diferença na capacidade de sobrevivência ao estresse hídrico entre os girinos das duas espécies foi grande. Em 36 horas quase metade dos girinos de *P. nattereri* haviam morrido, resultando no encerramento do experimento. Assim, não obtivemos valores de perda de massa dessa espécie para 72 horas (Tabela 2). Já os girinos de *L. fuscus* foram mantidos até 72 horas, não interrompendo os experimentos. Portanto, não avaliamos a perda de massa dos girinos de *L. fuscus* em 36 horas (Tabela 2).

A perda de massa corpórea foi notável entre os grupos controle e tratamento de ambas as espécies (Tabela 2). No entanto, podemos observar que a perda de massa dos girinos de *L. fuscus* do tratamento no período de 72 horas, foi semelhante à perda de massa dos girinos do tratamento de *P. nattereri* em 12 horas de estresse (Tabela 2).

Apesar do aumento na perda de massa dos tratamentos entre os períodos de tempo, a diferença não foi significativa em ambas as espécies. A perda de massa corpórea também não diferiu entre os controles.

Tabela 2. Perda de massa corpórea (média $\pm$ desvio padrão) nos girinos pós-ninho (Gosner 29-34) referentes a cada período de tempo experimental. Os valores entre parênteses representam o tamanho amostral inicial e aqueles entre colchetes, o número de girinos sobreviventes em cada tratamento independentemente. O valor de significância para as comparações entre os grupos controle e tratamento (Tukey) foi $P < 0,0001$ para todos os períodos de tempo em ambas as espécies.

Espécies	Tratamento	Perda de massa corpórea (%)				Estatística (ANOVA)
		12h	24h	36h	72h	
<i>P. nattereri</i>	Controle (20)	5,5 $\pm$ 2,5 [20]	5,1 $\pm$ 2,2 [20]	5,3 $\pm$ 1,7 [20]	-	$F_{5,53}=53,8$ $P < 0,0001$
	4-mL (20)	25,7 $\pm$ 11,2 [20]	27,3 $\pm$ 3,1 [18]	31,1 $\pm$ 4,6 [12]	-	
<i>L. fuscus</i>	Controle (20)	6,04 $\pm$ 3,9 [20]	6,5 $\pm$ 2,9 [20]	-	9,7 $\pm$ 4,7 [20]	$F_{5,54}=24,19$ $P < 0,0001$
	4-mL (20)	18,9 $\pm$ 4,6 [20]	20,9 $\pm$ 4,6 [20]	-	24,4 $\pm$ 8,3 [20]	

4.2 Locomoção

Em *P. nattereri* o tamanho da amostra para dados de distância percorrida e atividade de nado variaram, sendo: grupo tratamento (4mL), 12h (n=15), 24h (n=9) e 36h (n=7); grupo controle (100mL), 12h (n=15), 24h (n=10) e 36h (n=10). Para velocidade de fuga o tamanho amostral variou apenas no período de 12 horas, sendo amostrados cinco girinos de ambos os grupos (controle e tratamento). Para *L. fuscus* o tamanho amostral foi dez em todos os grupos (controle e tratamento) e período de tempo (12, 24 e 72 horas) (Figura 2).

Na figura 6 foram selecionadas aleatoriamente quatro amostras para representar o trajeto que os girinos dos grupos controle e tratamento percorreram durante os 15 minutos de filmagem. Note que o comportamento locomotor do girino de *P. nattereri*, que sofreu estresse (C – Figura 6), foi prejudicado em comparação ao girino que permaneceu em água (D – Figura 6). Para girinos de *L. fuscus* essa diferença foi mais sutil (A e B – Figura 6).

Figura 6. Representação do caminho traçado por girinos dos grupos controle e tratamento no período de 12 horas. *L. fuscus* (A e B); *P. nattereri* (C e D), sendo A e C: tratamento (4 mL); B e D: controle (100 mL).

Quantitativamente, o comportamento locomotor do grupo tratamento de *P. nattereri* foi significativamente afetado, havendo diferenças entre os grupos controle e tratamento nos períodos de 12 e 24 horas para Atividade de nado ($F_{5,60}=9,99$; $P<0,0001$) e Distância percorrida ($F_{5,60}=7,87$; $P<0,0001$) (Figura 7). Apesar de não haver diferença entre os grupos experimentais em 36 horas, o grupo tratamento (36h) se diferenciou dos grupos controles de 12 e 24 horas (Figura 7). Para distância percorrida, o controle 36 horas também se diferenciou dos demais controles (12 e 24 horas). Houve diferença na velocidade de fuga entre os grupos controles e tratamentos para todos os períodos de tempo do experimento ($F_{5,40}=22,68$; $P<0,0001$).

Em *L. fuscus* não houve diferença entre os grupos (controle e tratamento) em todos os períodos de tempo experimental (12, 24 e 72 horas) para Atividade de nado ($F_{5,54}=2,51$; $P=0,041$ – apesar do valor significativo, não foi encontrada diferença no teste de comparações múltiplas de Tukey), Distância percorrida ($F_{5,54}=3,77$; $P=0,005$), exceto em 12 horas (Tukey $P<0,05$), e Velocidade de fuga ($F_{5,54}=1,63$; $P=0,17$) (figura 7).

Figura 7. Resultado da análise de locomoção (Média $\pm$ Erro padrão). A e B representam atividade de nado (%), C e D Distância percorrida (cm), e E e F Velocidade de fuga (cm.s⁻¹) sendo: A, C e E dados de *P. nattereri* e B, D e F dados de *L. fuscus*. (*) comparação entre os grupos experimentais, sendo: *** P<0,001, ** P<0,01, * P<0,05. (#) comparação com controle 12h, sendo: ## p<0,01; (x) comparação com controle 24h, sendo: xxx P<0,001; xx P<0,01; x P<0,05.

4.3 Tempo de metamorfose

Apenas sete girinos de *P. nattereri* do período experimental de 12h (3 controle e 4 tratamento) chegaram a metamorfose em média de $35 \pm 5,83$ (tratamento) e $39 \pm 16,52$ (controle) dias após estresse. Os girinos restantes foram mantidos nos recipiente por cerca de 90 dias, mas não estavam se desenvolvendo. Assim, os girinos foram eutanasiados e fixados em formol (5%). A maioria dos girinos de *L. fuscus* metamorfosearam (Figura 8 – Apêndice I).

Figura 8. Box plot do tempo (dias) que os girinos de *L. fuscus* levaram para se metamorfosear após os experimentos. Abaixo do gráfico, o número de indivíduos que metamorfosearam em seus respectivos grupos (controle e tratamento) e período de tempo.

4.4 Morfometria linear

Os girinos de cada espécie diferiram, entre os controles e os tratamentos, quanto a altura da cauda, comprimento da cauda, musculatura da cauda, altura do corpo e largura do corpo (Tabela 3). A maioria das diferenças se deu em algum componente referente à cauda desses animais, podendo evidenciar a sensibilidade dessa estrutura ao estresse hídrico. Além disso, quando comparamos os valores residuais dos dados morfométricos dos tratamentos entres todos períodos de tempo, houve diferença apenas no comprimento da cauda em *L. fuscus* ($F_{2,25}=5,764$; $P=0,009$). Os grupos controles não se diferiram entre os períodos de tempo em ambas as espécies.

Tabela 3. Dados morfométricos (média $\pm$ desvio padrão) de ambos os grupos (controle e tratamento) de girinos de *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus* em todos os períodos de tempo. As comparações foram feitas com os valores residuais de cada medida.

Característica	Espécies	Tratamentos	Medidas (mm)			Estatística - Resíduos (MANOVA)
			12h	24h	36h/72h	
Comprimento do Corpo (BL)	<i>P. nattereri</i>	Control	7,24 $\pm$ 0,64	7,25 $\pm$ 0,43	7,21 $\pm$ 0,57	
		4 mL	7,27 $\pm$ 0,75	7,16 $\pm$ 0,39	6,56 $\pm$ 0,64	
	<i>L. fuscus</i>	Control	6,32 $\pm$ 0,26	6,72 $\pm$ 0,54	6,11 $\pm$ 0,99	
		4 mL	6,42 $\pm$ 0,53	6,37 $\pm$ 0,35	6,62 $\pm$ 0,56	
Altura do corpo (HB)	<i>P. nattereri</i>	Control	2,98 $\pm$ 0,34	2,99 $\pm$ 0,20	2,87 $\pm$ 0,25	12h $F_{1,27}=9,36$; $P=0,005$ 24h $F_{1,18}=19,86$; $P=0,0003$
		4 mL	2,56 $\pm$ 0,32	2,44 $\pm$ 0,25	2,45 $\pm$ 0,32	
	<i>L. fuscus</i>	Control	2,54 $\pm$ 0,19	2,75 $\pm$ 0,21	2,51 $\pm$ 2,55	12h $F_{1,18}=7,93$; $P=0,011$
		4 mL	2,41 $\pm$ 0,21	2,41 $\pm$ 0,18	2,53 $\pm$ 0,23	
Largura do corpo (WB)	<i>P. nattereri</i>	Control	4,02 $\pm$ 0,46	3,99 $\pm$ 0,17	4,05 $\pm$ 0,21	
		4 mL	4,16 $\pm$ 0,40	4,09 $\pm$ 0,26	3,76 $\pm$ 0,34	
	<i>L. fuscus</i>	Control	3,52 $\pm$ 0,19	3,83 $\pm$ 0,22	3,46 $\pm$ 0,39	24h $F_{1,16}=11,65$; $P=0,004$
		4 mL	3,60 $\pm$ 0,34	3,35 $\pm$ 0,23	3,57 $\pm$ 0,38	
Comprimento da cauda (TL)	<i>P. nattereri</i>	Control	10,81 $\pm$ 1,61	11,18 $\pm$ 0,96	12,07 $\pm$ 1,24	12h $F_{1,27}=11,62$; $P=0,002$ 36h $F_{1,17}=8,29$; $P=0,01$
		4 mL	9,01 $\pm$ 1,78	9,93 $\pm$ 1,67	7,56 $\pm$ 1,72	
	<i>L. fuscus</i>	Control	10,50 $\pm$ 1,12	11,91 $\pm$ 1,07	10,84 $\pm$ 1,30	24h $F_{1,16}=21,59$; $P=0,0003$ 72h $F_{1,18}=7,4$; $P=0,0002$
		4 mL	10,66 $\pm$ 0,83	9,49 $\pm$ 1,02	10,06 $\pm$ 0,74	
Altura da cauda (HT)	<i>P. nattereri</i>	Control	3,33 $\pm$ 0,48	3,14 $\pm$ 0,32	2,98 $\pm$ 0,34	12h $F_{1,27}=12,01$; $P=0,002$ 36h $F_{1,17}=4,53$; $P=0,05$
		4 mL	2,75 $\pm$ 0,51	2,65 $\pm$ 0,29	2,09 $\pm$ 0,28	
	<i>L. fuscus</i>	Control	2,95 $\pm$ 0,21	3,06 $\pm$ 0,38	2,86 $\pm$ 0,46	12h $F_{1,18}=71,38$; $P<0,0001$ 24h $F_{1,16}=26,04$; $P=0,0001$ 72h $F_{1,18}=19,08$; $P=0,0004$
		4 mL	2,26 $\pm$ 0,31	2,20 $\pm$ 0,25	2,41 $\pm$ 0,19	
Musculo da cauda (TLM)	<i>P. nattereri</i>	Control	1,52 $\pm$ 0,18	1,39 $\pm$ 0,13	1,43 $\pm$ 0,17	24h $F_{1,18}=9,14$; $P=0,007$ 36h $F_{1,17}=5,35$; $P=0,03$
		4 mL	1,60 $\pm$ 0,24	1,59 $\pm$ 0,13	1,41 $\pm$ 0,11	
	<i>L. fuscus</i>	Control	1,36 $\pm$ 0,10	1,43 $\pm$ 0,09	1,34 $\pm$ 0,18	12h $F_{1,18}=6,16$; $P=0,02$
		4 mL	1,31 $\pm$ 0,14	1,43 $\pm$ 1,76	1,43 $\pm$ 0,11	
Comprimento total (T)	<i>P. nattereri</i>	Control	18,05 $\pm$ 2,11	18,43 $\pm$ 1,20	19,29 $\pm$ 1,63	
		4 mL	16,34 $\pm$ 2,32	17,08 $\pm$ 1,90	14,13 $\pm$ 2,09	
	<i>L. fuscus</i>	Control	16,83 $\pm$ 1,29	18,69 $\pm$ 1,52	16,95 $\pm$ 2,10	
		4 mL	17,09 $\pm$ 1,26	15,85 $\pm$ 1,33	16,67 $\pm$ 1,20	

Valores (Manova) referentes a comparação geral dos resíduos entre os níveis de estresse, *P. nattereri*: 12h ($F_{1,27}=11,968$; $P<0,001$; Pillai=0,722) 24h ($F_{1,18}=21,016$; $P<0,001$; Pillai=0,88) 36h ($F_{1,17}=8,09$; $P=0,001$; Pillai=0,75); *L. fuscus*: 12h ($F_{1,18}=15,56$; $P<0,001$; Pillai=0,085) 24h ($F_{1,16}=6,65$; $P=0,003$; Pillai=0,74) 72h ($F_{1,18}=7,4$; $P=0,001$; Pillai=0,72).

4.5 Volume total

Na figura 9, apresentamos os resultados dos volumes totais obtidos pelo método de suspensão (HUGHES, 2005). Não houve diferença entre os volumes totais entre os grupos (controle e tratamento) em girinos de *L. fuscus* em todos os períodos de tempo experimental ($F_{5,48}=2,24$; $P=0,07$).

Em *P. nattereri* houve diferença entre os volumes totais dos grupos controle e tratamento em 36 horas e entre os tratamentos de 12 e 36 horas ($F_{5,50}=9,69$; $P<0,0001$).

Figura 9. Volume total (cm³), determinado pelo método de suspensão (Arquimedes). * diferença significativa entre os grupos experimentais 36h (Tukey $P<0,001$); (a) diferença significativa entre os tratamentos 12h e 36h (Tukey $P<0,0001$).

4.6 Volume visceral (Estereologia)

Para *L. fuscus*, foram obtidos (média $\pm$ desvio padrão) um total de 2162 ± 520 pontos, distribuídos da seguinte forma: Intestino (564), Estômago e Anexo (374), Musculatura (304) e Outros (921). Houve diferença entre os grupos (controle e tratamento) apenas nos volumes da categoria Intestino ($F_{5,24}=6,09$; $P=0,0009$) no período de 72 horas (Tukey $P<0,05$) (Figura 10).

Para *P. nattereri* a quantidade (média $\pm$ desvio padrão) de pontos totais foi de 2471 ± 629 , distribuídos da seguinte forma: Intestino (814), Estômago e Anexo (308), Musculatura (274) e Outros (1075), onde a categoria Estômago e Anexo ($F_{5,22}=5,37$; $P=0,002$) do grupo controle foi menor que do grupo tratamento em 36 horas (Tukey $P<0,001$) (Figura 10).

Figura 10. Proporções (médias $\pm$ desvio padrão) de volumes (%) de cada componente corporal dos girinos de *Physalaemus nattereri* e *Leptodactylus fuscus*.

5 DISCUSSÃO

Como predito, os girinos de *L. fuscus* e *P. nattereri* perderam massa corporal (Tabela 2) em proporções semelhantes aos girinos de *L. fuscus* ($20,3 \pm 5,6\%$) e de *E. postulosus* ($29,3 \pm 2,9\%$) encontrados por Downie e Smith (2003) em estresse hídrico de 4mL durante 24 horas.

Downie e Smith (2003) demonstraram que girinos de *L. fuscus* tendem a ganhar água em substrato hidratado com 6 a 10 mL de água, mas perdem água em substrato hidratado apenas com 4 mL. Assim, o ganho ou perda de água em girinos depende do nível de hidratação do substrato. Em substrato com baixo nível de hidratação os girinos perdem água, e em substrato com maior nível de hidratação os girinos podem absorver água, no entanto, esta habilidade é perdida ao longo do desenvolvimento (DOWNIE; SMITH, 2003). Como os girinos (estágios 29-34) do grupo tratamento estavam em substrato com baixo nível de hidratação (4 mL), os girinos perderam água gradualmente conforme o período de tempo em que ficaram sob essa condição, mesmo o nível de hidratação quase não ter alterado em 72 horas (4 mL para 3,8 mL). Assim, há uma tendência de que, quanto mais tempo os girinos ficam em contato com substrato de baixo nível de hidratação, mais eles perdem água (Tabela 2). A perda de massa causada pela defecação e pelo jejum pode ser explicada pela porcentagem de perda de massa dos girinos dos grupos controles.

Anuros em fase adulta, quando desidratados, são capazes de se hidratar rapidamente pela coordenação de mecanismos fisiológicos e comportamentais para melhorar a absorção cutânea e o armazenamento de urina diluída na bexiga urinária. (HILLYARD, 1999; DABÉS et al. 2012). Algumas espécies (e.g. *Phyllomedusa hypochondrialis*, *Polypedates maculatus*) utilizam mecanismos de secreções cutâneas juntamente com o comportamento de se limpar, espalhando a secreção pelo corpo e consequentemente reduzindo a perda de água por evapotranspiração (LILLYWHITE et al, 1997; GOMEZ et al., 2006). Além disso, experimentos mostram que o hormônio peptídico (angiotensina II) estimula a absorção de água pela pele, em mecanismo semelhante ao de beber água (sede) em outras classes de vertebrados (HILLYARD, 1999). No entanto, os mecanismos de relações hídricas utilizados pelos girinos, a resistirem a desidratação, são poucos conhecidos (McDIARMIND; ALTIG, 1999).

Além da desidratação, notamos alta taxa de mortalidade dos girinos de *P. nattereri* em 36 horas, que pode ser explicada pela intensa perda de água corporal

(Tabela 2). Para girinos de *L. fuscus*, não houve mortalidade durante o experimento em nenhum período de tempo.

As principais causas de morte de girinos podem ser a desidratação e/ou a intoxicação por amônia, principal excreta em organismos aquáticos (SHOEMAKE; McCLANAHAN, 1973; BLACK, 1974; JONES, 1980). Girinos de algumas espécies de anuros, principalmente aqueles resistentes à dessecação que possuem desovas terrestres (e.g., *Scaphiopus*, *L. bufonius*), conseguem excretar seus compostos nitrogenados em forma de ureia (menos tóxico), podendo ser um mecanismo que auxilie na sobrevivência desses animais (CANDELAS; GOMEZ, 1963; SHOEMAKER; McCLANAHAN, 1973; JONES, 1980; GRAFE et al., 2005). Além disso, os girinos também estão sujeitos a hipóxia ou até mesmo anóxia, já que podem ser encontrados em ambientes com baixa concentração de oxigênio ou fora da água e/ou aglomerados em refúgios úmidos, caso a respiração aérea seja insuficiente ou ainda não desenvolvida para obtenção de oxigênio (BLACK, 1971; CRUMP, 1981, CANDELAS et al, 1981; DOWNIE, 1984; DOWNIE; SMITH, 2003). Black (1974) sugere que a sobrevivência de girinos de *Scaphiopus* em poças recém-secas provavelmente é favorecida pela respiração aérea através dos pulmões. Assim, outra possível adaptação para esse cenário seria o desenvolvimento precoce dos pulmões (BLACK, 1971; CRUMP, 1981, CANDELAS et al, 1981).

Provavelmente a baixa mortalidade de girinos de *L. fuscus* pode ser devido a sua resistência a desidratação, mas também por possivelmente excretar ureia e desenvolver pulmões precocemente quando submetidos a estresse hídrico. Entretanto, esses aspectos ainda carecem de estudos.

Girinos não possuem bexiga urinária para armazenar água, mas podem beber água, distendendo seu intestino (DOWNIE; SMITH, 2003). Experimentos mostram que girinos de *L. fuscus* perdem água proporcionalmente mais pelo intestino do que em outras partes, como a cauda e o resto do corpo, sugerindo um mecanismo de controle fisiológico em diferentes compartimentos corporais (DOWNIE; SMITH, 2003). Nossos resultados sobre a proporção de volume de órgãos internos corroboram essa hipótese. A única diferença encontrada em todas as categorias analisadas foi nas proporções de volume do intestino em girinos de *L. fuscus* submetidos a 72 horas de estresse, onde apresentaram um volume menor do que os girinos do grupo controle (Figura 10). Em *P. nattereri* a proporção de volume diferiu apenas na categoria Estômago e Anexo (36

horas) (Figura 10), mesmo essa espécie apresentando um intestino (814 pontos) maior do que *L. fuscus* (564 pontos).

Estudos comportamentais nas áreas de ecotoxicologia e fisiologia utilizam a ferramenta de vídeo-análise para avaliar o efeito de algum fator estressante no desempenho locomotor de organismos modelos (e.g. peixes e girinos) (DENOEL et al., 2012, 2013, KANE, 2004, SUROVA, 2009, CACHAT, 2011, DELCOURT et al., 2012). Denoel et al. (2013), utilizando o método de vídeo-análise, forneceram evidência quantitativa do efeito negativo do endossulfan (pesticida) em vários aspectos do comportamento locomotor dos girinos, o qual resultou numa significativa redução da velocidade de natação, menor atividade de nado e curtas distâncias percorridas, além dos girinos expostos ao pesticida se locomoverem de forma diferente.

Do mesmo modo que Denoel et al (2013), mas em resposta ao estresse hídrico, encontramos resultados semelhantes no desempenho locomotor de *P. nattereri* (Figura 7). Os girinos expostos ao estresse hídrico se locomoveram menos, percorrendo curtas distâncias e com menor velocidade do que os girinos que ficaram em água, evidenciando assim a influencia da desidratação no comportamento locomotor dessa espécie. O fato de não haver diferença no desempenho locomotor entre os grupos experimentais de *P. nattereri* em 36h, pode ser devido a outros fatores, já que o grupo controle também percorreu curta distância (Figura 7). Apesar da temperatura da sala ter sido mantida a 25 °C em todos os experimentos, a temperatura da água nos recipientes não foi medida, podendo ter influenciado na locomoção desses animais, como mostrado por Tracy (1993). Outra hipótese, seria devido ao jejum prolongado (4 dias), podendo causar redução da taxa metabólica, influenciando seu comportamento locomotor para evitar gastos energéticos desnecessários (CANDELAS, 1981).

Girinos de *L. fuscus* aparentemente são mais ativos e se locomovem por maiores distâncias, estando ou não submetidos ao estresse hídrico. Azizi et al (2005) demonstraram que durante o nado os girinos flexionam lateralmente o tronco alternando as direções (esquerda-direita), sugerindo que essas flexões laterais cíclicas da coluna vertebral são proporcionadas pelos músculos axiais na região do tronco dos girinos, contribuindo assim, para oscilação do focinho e a geração de impulso durante natação. Como analisamos a região abdominal dos girinos (região do tronco), isolando apenas os valores das proporções de volume da categoria Musculatura (Tabela 4), podemos notar que os girinos de *L. fuscus* apresentam uma quantidade maior de musculatura associada

à coluna vertebral do que girinos de *P. nattereri*, o que pode explicar a grande capacidade locomotora desses animais estando ou não submetidos a desidratação.

Tabela 4. Valores (média $\pm$ desvio padrão) das porcentagens referentes à categoria Musculatura em ambos os grupos experimentais (controle tratamento) de girinos de *P. nattereri* e *L. fuscus*.

Espécies	Tratamentos	Musculatura (%)			
		12 h	24h	36h	72h
<i>P. nattereri</i>	Controle	9,76 $\pm$ 2,04	7,40 $\pm$ 0,98	13,14 $\pm$ 10,24	-
	4-mL	10,31 $\pm$ 1,94	11,90 $\pm$ 2,75	12,22 $\pm$ 2,74	-
<i>L. fuscus</i>	Controle	14,16 $\pm$ 2,17	12,70 $\pm$ 1,07	-	13,69 $\pm$ 1,11
	4-mL	14,75 $\pm$ 1,48	14,47 $\pm$ 1,41	-	14,92 $\pm$ 2,87

A exposição a predadores pode induzir mudança na coloração e no crescimento da cauda, o que normalmente está associado à capacidade dos girinos alcançarem maiores velocidades para fugirem dos predadores (MCCOLLUM; LEIMBERGER, 1997; VAN BUSKIRK; MCCOLLUM, 2000; MCINTYRE et al., 2004; ARENDT, 2010; JOHNSON et al., 2015). Por outro lado, Van Buskirk e McCollum (2000) evidenciou que o aumento no comprimento da cauda, não melhorou o desempenho durante a natação, do mesmo modo que uma redução cirúrgica de cerca de 30% no comprimento da cauda não apresenta impacto significativo sobre a velocidade da natação em girinos de *Hyla versicolor* (VAN BUSKIRK; MCCOLLUM, 2000). Quando relacionamos a velocidade de fuga com o comprimento e altura da cauda, encontramos relação significativa apenas para *P. nattereri* (Figura 11).

Figura 11. Regressão linear dos dados (logaritmizados) de velocidade fuga pelo comprimento da cauda: A - *P. nattereri* $R^2=0,45$; $P<0,0001$, B - *L. fuscus* $R^2=0,03$; $P=0,21$. Regressão linear dos dados (logaritmizados) de velocidade de fuga pela altura da cauda: C - *P. nattereri* $R^2=0,47$; $P<0,0001$, D - *L. fuscus* $R^2= 0,002$; $P=0,3$. Dados plotados no programa R.

Assim, para *P. nattereri*, aparentemente, os maiores valores de velocidade são relacionados aos girinos que apresentam maior comprimento e altura de cauda. Já em *L. fuscus*, assim como detectado para os girinos de *Hyla versicolor* (VAN BUSKIRK; MCCOLLUM, 2000), essa relação não foi encontrada, sendo a velocidade de fuga explicada por outro fator extrínseco ao comprimento da cauda, provavelmente pela maior quantidade de musculatura axial.

Devido à cauda dos girinos não apresentarem estrutura óssea, essa se torna uma parte do corpo bastante plástica, podendo mudar de forma e cor rapidamente em resposta ao ambiente (polifenismo) (HOFF; WASSERSUG, 2000). Essa plasticidade permite alterações, como aumento no comprimento da cauda em resposta a fatores estressante, como predadores (MCCOLLUM; LEIMBERGER, 1997; VAN BUSKIRK; MCCOLLUM, 2000; VAN BUSKIRK, 2002; MCINTYRE et al., 2004; ARENDT, 2010; JOHNSON et al., 2015). No entanto, o estresse causado pela restrição hídrica causou um efeito contrário, o comprimento da cauda dos girinos tanto de *L. fuscus* quanto de *P. nattereri* foi menor em girinos que sofreram estresse do que os que ficaram em 100 mL de água (Tabela 3). A diminuição do comprimento da cauda não pode ser explicada pela reabsorção da cauda devido ao jejum prolongado, porque os girinos de ambos os grupos (controle e tratamento) estavam sob as mesmas condições alimentares. Possivelmente essa diminuição da cauda seria um mecanismo utilizado pelos girinos

para reduzir área superficial em contato com o ar, evitando assim, maior perda evaporativa de água.

A antecipação da metamorfose não foi possível de ser computada para *P. nattereri*, no entanto, os poucos girinos (n=7) que metamorfosearam apresentam indício de um tempo menor de desenvolvimento para os girinos que sofreram estresse do que os que ficaram em água. O fato da maioria dos girinos de *P. nattereri* não terem metamorfoseado, não foi causado pelo estresse hídrico, porque os girinos do controle também não se desenvolveram. Possivelmente, fatores extrínsecos como a temperatura da água e/ou a quantidade e qualidade do alimento pode ter influenciado no desenvolvimento desses animais (TRACY, 1993; YU LEI et al, 2016). Já os girinos de *L. fuscus* não apresentaram diferença no tempo de desenvolvimento, metamorfoseando em média $35 \pm 3,95$ dias após o experimento. Além disso, constatamos que o estresse hídrico durante o desenvolvimento de *L. fuscus*, não afeta a taxa metabólica dos recém-metamorfoseados (Apêndice I).

Aparentemente, desovas terrestres, girinos aquáticos ureotélicos e resistentes a estresse hídrico podem apresentar caracteres associados decorrentes de evolução correlata (CANDELAS; GOMEZ, 1963; JONES, 1980; BROOKS; McLENNAN, 2002; DOWNIE; SMITH, 2003; GRAFE et al., 2005). Além disso, o comportamento de se aglomerar em locais ainda úmidos, em poças que estão secando, também aparenta ser comum em espécies consideradas como resistentes à desidratação, como *L. fuscus*, *L. pentadactylus*, *Spea bombifrons* e *Spea multiplicata* (VALERIO, 1971, BLACK, 1974; JONES, 1980; DOWNIE; SMITH, 2003). Assim, estudos mais abrangentes e em nível de comparação filogenética, são importantes para elucidarmos essas associações à capacidade de sobrevivência de girinos ao estresse hídrico.

Girinos de *P. nattereri* foram afetados consideradamente pelo estresse hídrico o que torna essa linha de pesquisa mais interessante, pois são espécies que utilizam poças sujeitas a secar e, no entanto, também apresentam sucesso reprodutivo, nos questionando quais mecanismos fisiológicos e/ou comportamentais esses animais estão utilizando para sobreviverem nesses ambientes. Aspectos em relação a estratégia reprodutiva, como reprodução comunal, vem sendo reportado como um fator diferencial para evitar mortalidade por predação e desidratação (MENIN; GIARETTA, 2003; ZINA, 2006; SILVA; GIARETTA, 2008).

Além da pressão seletiva causada pelo estresse hídrico, outros aspectos ambientais podem ser determinantes para a sobrevivência desses animais, como:

temperatura, quantidade de predadores, exposição à radiação solar, agrotóxicos, eutrofização da água, entre outros, necessitando de estudos que abrangem aspectos ecológicos, comportamentais e fisiológicos, para entendermos como esses animais estão sobrevivendo e reproduzindo nesses ambientes.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a exposição ao estresse hídrico não afeta significativamente a morfologia e o desempenho locomotor dos girinos de *L. fuscus*. No entanto, girinos de *P. nattereri* apresentaram uma sensibilidade ao estresse hídrico prolongado, principalmente sobre o seu desempenho locomotor.

7 REFERENCIAS

ALFORD, REID N.; HARRIS, R. A. **Effects of larval growth history on anuran metamorphosis**The American Naturalist, 1988.

ÁLVAREZ, D.; NICIEZA, A. G. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. **Functional Ecology**, v. 16, n. 5, p. 640–648, 2002.

ANGILLETTA, M. J.; STEURY, T. D.; SEARS, M. W. Temperature , Growth Rate , and Body Size in Ectotherms: Fitting Pieces of a. **Integrative and Comparative Biology**, v. 44, p. 498–509, 2004.

ARENDT, J. Morphological correlates of sprint swimming speed in five species of spadefoot toad tadpoles: Comparison of morphometric methods. **Journal of Morphology**, v. 271, n. 9, p. 1044–1052, 2010.

ASHLEY-ROSS, M. A. et al. Vertebrate land invasions-past, present, and future: An introduction to the symposium. **Integrative and Comparative Biology**, v. 53, n. 2, p. 192–196, 2013.

AZIZI, E.; LANDBERG, T.; WASSERSUG, R. J. Vertebral function during tadpole locomotion. **Zoology**. v. 110, p. 290–297, 2007.

BENTLEY, P. J; LEE, A. K; MAIN, A. R. Comparison of dehydration and hydration of two genera of frogs (*Heleioporus* and *Neobatrachus*) that live in areas of varying aridity. **J. Exp. Biol**, v. 35, p. 667-684, 1958.

BEUCHAT, C.A.; POUGH, F.H; STEWAR, M.M. T. Response to simultaneous dehydration and thermal stress in three species of Puerto Rican frogs. **J. Comp. Physiol**, v. 154B, p. 579-585, 1984.

BLACK, J. H. Larval spadefoot survival. **J Herpetol**, v. 8, p. 371–373, 1974.

BOKERMANN, C. A. Girinos de Anfíbios Brasileiros - I (Amphibia - Salientia). v. 1962, 1963.

BOKERMANN, W. C. A. Observações biológicas sobre *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Rev Brasil Biol**, v. 22, p. 391–399, 1962.

BROOKS, D. R.; MCLENNAN, D. A. **The nature of diversity**: an evolutionary voyage of discovery. The University of Chicago Press. 2002.

CACHAT, J. M., *et al.* Video-Aided Analysis of Zebrafish Locomotion and Anxiety-Related Behavioral Responses. **Neuromethods**, v. 51, p. 1-14, 2011.

CALDWELL, J. P.; LOPEZ, P. T. Foam-Generating Behavior in Tadpoles of *Leptodactylus mystaceus*. **Copeia**, v. 1989, n. 2, p. 498–502, 1989.

CANDELAS, G. C.; GOMEZ, M. Nitrogen excretion in tadpoles of *Leptodactylus albilabris* and *Rana catesbeiana*. **Am Soc Zool**, v. 3, p. 521–522, 1963.

CANDELAS, G. C.; ORTIZ, E.; VASQUEZ, C.; FELLIX, L. Respiratory metabolism in tadpoles of *Leptodactylus albilabris*. **Am Soc Zool**, v. 1, p. 348, 1981.

CHURCHILL, T. A.; STOREY, K. B. Effects of dehydration on organ metabolism in the frog *Pseudacris crucifer*: hyperglycemic responses to dehydration mimic freezing-induced cryoprotectant production. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 164, n. 6, p. 492–498, 1994.

CHURCHILL, T. A.; STOREY, K. B. Metabolic effects of dehydration on an aquatic frog, *Rana pipiens*. **The Journal of experimental biology**, v. 198, n. Pt 1, p. 147–154, 1995.

CLACK, J. A. Devonian tetrapod trackways and trackmakers; a review of the fossils and footprints. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 130, n. 1-4, p. 227–250, 1997.

CLACK, J. A. The emergence of early tetrapods. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 232, n. 2-4, p. 167–189, 2006.

CRUMP, M. L. . Effect of Habitat Drying on Developmental Time and Size at Metamorphosis in *Hyla pseudopuma*. **American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, v. 1989, n. 3, p. 794–797, 1989.

CRUMP, M. L. Effect of habitat drying on developmental time and size at metamorphosis in *Hyla pseudopuma*. **Copeia**, v. 1988, n. 3, p. 94–797, 1988.

CRUMP, M. L. Possible enhancement of growth in tadpoles through cannibalism. **Copeia**, v. 1990, n. 2, p. 560–564, 1990.

DABÉS, L.; BONFIM, V. M. G.; NAPOLI, M. F. ; KLEIN, W. Water Balance and Spatial Distribution of an Anuran Community from Brazil. **Herpetologica (Austin, TX)**, v. 68, p. 443-455, 2012.

DELCOURT, J.; DENOËL, M., D.; YLIEFF, M.; PONCIN, P. Video multitracking of fish behaviour: a synthesis and future perspectives. **Fish And Fisheries**, v. 14, p. 186–204, 2012.

DENOËL, M. D.; LIBON, S. A.; KESTEMONT, P.; BRASSEUR, C.; FOCANT, J.; DE PAUW, E. Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: A video-tracking analysis in larval amphibians. **Chemosphere**, v. 90, p. 945-951, 2013.

DENOËL, M., D.; HOOGHE, B.; FICETOLA, G. F.; BRASSEUR, C.; DE PAUW, E.; THOMÉ, J.P.; KESTEMONT, P. Using sets of behavioral biomarkers to assess short-term effects of pesticide: a study case with endosulfan on frog tadpoles. **Ecotoxicology** v. 21, p. 1240–1250, 2012.

DENVER, R. J.; MIRHADI, N.; PHILLIPS, M. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis: response of *Scaphiopus hammondi* tadpoles to habitat desiccation. **Ecology**, v. 79, n. 6, p. 1859–1872, 1998.

DOWNIE, J. R. How *Leptodactylus fuscus* Tadpoles Make Foam, and Why. **Copeia**, v. 1984, n. 3, p. 778–780, 1 ago. 1984.

- DOWNIE, J. R. Developmental arrest in *Leptodactylus fuscus* tadpoles (Anura, Leptodactylidae). I: Descriptive analysis. **Herpetological Journal**, v.4, p.29–38. 1994.
- DOWNIE, J. R.; SMITH, J. Survival of larval *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) out of water: developmental differences and interspecific comparisons. **J Herpetol**, v.37, p. 107–115, 2003.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L.. **Biology of amphibians**. Baltimore: Johns Hopkins University, 1994.
- FEDER, M. E.; BURGGREN, W. W. **Environmental Physiology of the Amphibians**. Chicago: University of Chicago Press, 1992.
- FEDER, M. The relation of air breathing and locomotion to predation on tadpoles, *Rana berlandieri* by turtles. **Physiological Zoology**, v. 56, n. 4, p. 522–531, 1983.
- FROST, Darrel R. 2016. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Version 6.0 (*Date of access*). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- GALLARDO, J. M. Consideraciones sobre *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Anura) y espécies aliadas. **Physis-Tomo**, v. 68, p.373–384, 1964.
- GIARETTA, A. .A.; MENIN, M. Reproduction, phenology and mortality sources of a species of *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae). **J. Nat. Hist**, v. 38, n. 13, p.1711-1722, 2004.
- GIARETTA, A. A.; KOKUBUM, M.N.D.E.C. Reproductive ecology of *Leptodactylus furnarius* Sazima & Bokermann, 1978, a frog that lays eggs in underground chambers (Anura: Leptodactylidae). **Herpetozoa**, v. 16, p. 115–126, 2004.
- GIARETTA, A. A.; FACURE, K. G. Terrestrial and communal nesting in *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): interactions with predators and pond structure. **J Nat Hist**, v. 40, p. 2577–2587, 2006.
- GIARETTA, A. A.; MENIN, M.; FACURE, K. G.; KOKUBUM, M.N.D.E.C.; OLIVEIRA-FILHO, J. C. Species richness, relative abundance, and habitat of reproduction of terrestrial frogs in the Triângulo Mineiro region, Cerrado biome, southeastern Brazil. **Sér Zoologia**, v. 98, p.181–188, 2008.
- GOMEZ, N. A. et al. Wiping behavior, skin resistance, and the metabolic response to dehydration in the arboreal frog *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 6, p. 1058–1068, 2006.
- GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, p. 183–190, 1960.
- GOTELLI, N. J; ELLISON, A. M. **Princípios de Estatística em Ecologia**. 1ª ed. Editora Artmed, 2010.

GRAFE, T. U.; KAMINSKY, S. K.; LINSSENMAIR, E. Terrestrial larval development and nitrogen excretion in the afro-tropical pig-nosed frog, *Hemissus marmoratus*. **J Trop Ecol.** v. 21, p. 219–222, 2005.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n.3, p. 207–217, 2005.

HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; PRADO, C. P. A. **Anfíbios da Mata Atlântica: Guia dos anfíbios anuros da Mata Atlântica**. São Paulo: Neotropica, 2008.

Handbook of Chemistry and Physics 1971 52nd edn (Cleveland, OH: Chemical Rubber Company) F-5

HEYER, W. R. Systematics of the *fuscus* group of the frog genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Nat Hist Mus Los Angeles County Sci Bull**, v. 29, p. 1–85, 1978.

HEYER, W. R. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v. 23, p. 421–428, 1969.

HEYER, W. R.; MCDIARMID, R. W.; WEIGMANN, D. L. Tadpoles, predation and pond habitats in the tropics. **Biotropica**, v. 7, p.100–111, 1975.

HILLMAN, S. S.; WITHERS, P. C.; DREWES, R. C.; HILLYARD, S. D. **Ecological and environmental physiology of amphibians**. New York: Oxford University Press, 2009.

HILLMAN, S.S. Dehydrational effects on cardiovascular and metabolic capacity in two amphibians. **Physiology. Zool**, v. 60, p. 608–613, 1987

HILLYARD, S. D. Behavioral, Molecular and Integrative Mechanisms of Amphibian Osmoregulation. **Journal Experimental Zoology**, v. 283, p. 662–674, 1999.

HOFF, K. V. S.; WASSERSUG, R. J. Tadpole Locomotion: Axial Movement and Tail Functions in a Largely Vertebraeless Vertebrate. **AMER. ZOOL**, v. 40, p. 62–76, 2000.

HUGHES, S. W. Archimedes revisited: a faster, better, cheaper method of accurately measuring the volume of small objects. **Physics Education**, v. 40, n. 5, p. 468–474, 2005.

JOHNSON, J. B. et al. Naturally occurring variation in tadpole morphology and performance linked to predator regime. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 15, p. 2991–3002, 2015.

JONES, R. M. Nitrogen excretion by *Scaphiopus* tadpoles in ephemeral ponds. **Physiol Zool**, v. 53, p. 216–31, 1980.

KANE, A. S.; SALIERNO, J. D.; GIPSON, G. T.; MOLTENO, T. C. A.; HUNTER, C. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. **Water research**, v. 38, p. 3993–4001, 2004.

KOKUBUM, M. N. DE C.; GIARETTA, A. A. Reproductive ecology and behaviour of a species of *Adenomera* (Anura, Leptodactylinae) with endotrophic tadpoles: Systematic implications. **Journal of Natural History**, v. 39, n. 20, p. 1745–1758, set. 2005.

KUPFERBERG, S. J. The Role of Larval Diet in Anuran Metamorphosis 1. **American Zoology**, v. 159, n. October, p. 146–159, 1997.

LAURILA, A.; KUJASALO, J. Habitat duration , predation risk and phenotypic in common plasticity frog (*Rana temporaria*) tadpoles. **Journal of Animal Ecology**, v. 68, n. 6, p. 1123–1132, 1999.

LEIPS, A. J.; TRAVIS, J. Metamorphic Responses to Changing Food Levels in Two Species of Hylid Frogs. **Ecology**, v. 75, n. 5, p. 1345–1356, 1994.

LEIPS, J.; MCMANUS, M. G.; TRAVIS, J. Response of Treefrog Larvae to Drying Ponds : Comparing Temporary and Permanent Pond Breeders. **Ecology**, v. 81, n. 11, p. 2997–3008, 2000.

LILLYWHITE H. B. Review: Water relations of tetrapod integument. **J. Exp. Biol**, v. 209, p. 202–226, 2006.

LILLYWHITE H. B.; MITTAL, A. K.; GARG, T. K.; AGRAWAL, N. Wiping behavior and its ecophysiological significance in the Indian treefrog, *Polypedates maculatus*. **Copeia**, v. 1997, p.88–100, 1997

LIMA, A. P.; MAGNUSSON, W. E.; MENIN, M.; ERDTMANN, L. K.; RODRIGUES, D. J.; KELLER, C.; HÖDL, W. **Guide to the frogs of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazonia**. Manaus, Brazil: Áttema Design Editorial, 2006.

LOMAN, J. Early metamorphosis in common frog *Rana temporaria* tadpoles at risk of drying: an experimental demonstration. **Amphibia-Reptilia**, v. 20, n. 4, p. 421–430, 1999.

LOMAN, J. Temperature, genetic and hydroperiod effects on metamorphosis of brown frogs *Rana arvalis* and *R. temporaria* in the field. **Journal of Zoology**, v. 258, n. 1, p. 115–129, 2002.

LUCAS, E. M. et al. (Anura, Leptodactylidae): new data from natural temporary ponds in the Brazilian Cerrado and a review throughout its distribution. **Journal of Natural History**, v. 42, n. 35–36, p. 2305–2320, 2008.

MARTINS, M. Biologia reprodutiva de *Leptodactylus fuscus* em Boa Vista, Roraima (Amphibia: Anura). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 48, n. 4, p. 969–977, 1988.

MCCOLLUM, S. A.; LEIMBERGER, J. D. Predator-induced morphological changes in an amphibian: Predation by dragonflies affects tadpole shape and color. **Oecologia**, v. 109, n. 4, p. 615–621, 1997.

- MCDIARMID, R. W.; ALTIG, R. **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. The University of Chicago Press, 1999.
- MCINTYRE, P. B.; BALDWIN, S.; FLECKER, A. S. Effects of behavioral and morphological plasticity on risk of predation in a Neotropical tadpole. **Oecologia**, v. 141, n. 1, p. 130–138, 2004.
- MCNAB, B. K. **The Physiological Ecology of Vertebrates: A View From Energetics**. New York: Cornell University Press, 2002.
- MENIN, M.; GIARETTA, A. A. Predation on foam nests of leptodactyline frogs (Anura: Leptodactylidae) by larvae of *Beckeriella niger* (Diptera: Ephydriidae). **Journal of Zoology**, v. 261, n. 3, p. 239–243, 2003.
- MERILA, J.; LAURILA, A.; PAHKALA, M.; RASANEN, K.; TIMENES LAUGEN, A. Adaptive phenotypic plasticity in timing of metamorphosis in the common frog *R. temporaria*. **Ecoscience**, v. 7, n. 1, p. 18–24, 2000.
- MOORE, F. R.; GATTEN, J. R. Locomotor performance of hydrated, dehydrated and osmotically stressed anuran amphibians. **Herpetologica**, v. 45, p. 101–110, 1989.
- MOREY, S.; REZNICK, D. A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. **Ecology**, v. 81, n. 6, p. 1736–1749, 2000.
- NEWMAN, R. A. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. **Bioscience**, v. 42, p. 671–678, 1992.
- NEWMAN, R. A. Effects of density and predation on *Scaphiopus couchi* tadpoles in desert ponds. **Oecologia**, v. 71, n. 2, p. 301–307, 1987.
- PARSONS, K. J.; ROBINSON, B. W.; HRBEK, T. Getting into shape: An empirical comparison of traditional truss-based morphometric methods with a newer geometric method applied to New World cichlids. **Environ Biol Fish**, v. 67, p. 417–431, 2003.
- PONSSA, M. L.; BARRIONUEVO, S. Foam-generating behaviour in tadpoles of *Leptodactylus latinasus* (Amphibia, Leptodactylidae): significance in systematics. **Zootaxa**, v. 1884, p. 51–59, 2008.
- PREEST, M. R.; POUGH, F. H. Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. **Functional Ecology**, v. 3, n. 6, p. 693–699, 1989.
- RASBAND, W.S., **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2015.
- RICHARDSON, J. M. L. A comparative study of activity levels in larval anurans and response to the presence of different predators. **Behavioral Ecology**, v. 12, n. 1, p. 51–58, 2001.
- RICHTER-BOIX, A.; TEJEDO, M.; REZENDE, E. L. Evolution and plasticity of anuran larval development in response to desiccation. A comparative analysis. **Ecology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 15–25, 2011.

- ROGOWITZ, G. L.; CORTÉS-RIVERA, M.; NIEVES-PUIGDOLLER, K. Water loss, cutaneous resistance, and effects of dehydration on locomotion of Eleutherodactylus frogs. **Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 169, n. 3, p. 179–186, 1999.
- ROSSA-FERES, D. C.; NOMURA, F. Characterization and taxonomic key for tadpoles (Amphibia: Anura) from the northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 6, 2006.
- ROSSA-FERES, D. DE C.; JIM, J.; FONSECA, M. G. Diets of tadpoles from a temporary pond in southeastern Brazil (Amphibia, Anura). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 4, p. 745–754, 2004.
- RUBEL, F.; KOTTEK, M. 2010: Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. **Meteorol. Z.**, 19, 135-141. DOI: 10.1127/0941-2948/2010/0430.
- RUSS, J. C.; DEHOFF, R. T. **Practical Stereology**. 2^a ed. New York: Plenum Press, 2000.
- SEMLITSCH, R. D.; CALDWELL, J. P. Effects of Density of Growth, Metamorphosis, and Survivorship in Tadpoles of Scaphiopus. **Source: Ecology**, v. 63, n. 634, p. 905–911, 1982.
- SHEPARD, D. B.; CALDWELL, J. P. From Foam to Free-living: Ecology of Larval *Leptodactylus labyrinthicus*. **Copeia**2, v. 4, n. 4, p. 803–811, 2005.
- SHOEMAKER, V. H.; McCLANAHAN, L. L. Nitrogen excretion in the larvae of a land-nesting frog (*Leptodactylus bufonius*). **Comp Biochem Phys.** v. 44A, p.1149–1156, 1973.
- SILVA, W. R.; GIARETTA, A. A. On the natural history of *Leptodactylus syphax* with comments on the evolution of reproductive features in the *L. pentadactylus* species group (Anura, Leptodactylidae). **J Nat Hist**, v. 43, p. 191–203, 2009.
- SILVA, W. R.; GIARETTA, A. A. Seleção de sítios de oviposição em anuros (Lissamphibia). **Biota Neotrop**, v. 8, n. 3, 2008.
- SILVA, W. R.; GIARETTA, A. A.; FACURE, K. G. On the natural history of the South American pepper frog, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Anura, Leptodactylidae). **J Nat Hist**, v. 39, p. 555–566, 2005.
- SOLANO, H. Algunos Aspectos de la Biología Reproductiva del Sapito Silbador *Leptodactylus fuscus* (Schneider) (Amphibia: Leptodactylidae). **Amphibia-Reptilia**, v. 8, p. 111–128, 1987.
- STATON, M. A.; DIXON, J. R. The Herpetofauna of the Central Llanos of Venezuela : Noteworthy Records , a Tentative Checklist and Ecological Notes. **Journal of Herpetology**, v. 11, n. 1, p. 17–24, 1977.

SUROVA, G. S.; MUKHINA T. V.; BEZRYADNOV D. V. Group Effect on Individual Locomotor Activity of Common Toad (*Bufo bufo* L.) and Brown Frog (*Rana temporaria* L.) Tadpoles. **Russian Journal of Ecology**, v. 40, p. 280-285, 2009.

SZÉKELY, P.; COGĂLNICEANU, D.; TUDOR, M. Effect of habitat drying on the development of the Eastern spadefoot toad (*Pelobates syriacus*) tadpoles. **Amphibia-Reptilia**, v. 31, n. 3, p. 425–434, 2010.

TEJEDO, M.; REQUES, R. Does larval growth history determine timing of metamorphosis in anurans? A field experiment. **Herpetologica**, v. 50, n. 2, p. 113–118, 1994.

THORSON, T.; SVIHLA, A. Correlation of the Habitats of Amphibians with Their Ability to Survive the Loss of Body Water. **Ecology**, v. 24, n. 3, p. 374-381, 1943.

TRACY, C.; RICHARD; Christian, K. A.; O'CONNOR, M. P.; TRACY, Christopher. Behavioral Thermoregulation by *Bufo americanus*: The Importance of the Hydric Environment. **Herpetologica**, v. 49, n. 3, p. 375-382, 1993.

TRAVIS, J. Variation in development patterns of larval anurans in temporary ponds. I. Persistent variation within a *Hyla gratiosa* population. **Evolution**, v. 37, n. 3, p. 496–512, 1983.

VALERIO, C. E. Ability of some tropical tadpoles to survive without water. **Copeia**, v. 1971, p. 364–365, 1971.

VAN BUSKIRK, J. A. Comparative Test of the Adaptive Plasticity Hypothesis: Relationships between Habitat and Phenotype in Anuran Larvae. **The American Naturalist**, v. 160, n. 1, p. 87-102, 2002.

VAN BUSKIRK, J.; MCCOLLUM, A. Influence Of Tail Shape On Tadpole Swimming Performance. **The Journal of Experimental Biology**, 203: 2149–2158, 2000

VAN BUSKIRK, J.; MCCOLLUM, S. A. Functional mechanisms of an inducible defence in tadpoles: Morphology and behaviour influence mortality risk from predation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 13, n. 2, p. 336–347, 2000.

VENTURELLI, D. P; SILVA, W. R. Sobrevivência de girinos aquáticos de espécies de *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae) fora da água: mecanismos e contexto evolutivo. 2013. 23f. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba.

VIZOTTO, D. Aspectos Ontogenéticos dos Anuros. **Caldasia**, v. 11, n. 52, 1973.

WASSERSUG, R. How does a tadpole know when to metamorphose? A theory linking environmental and hormonal cues. **Journal of Theoretical Biology**, v. 118, n. 2, p. 171–181, 1986.

WASSERSUG, R. J.; SPERRY, D. G. The Relationships of Locomotion to Differential Predation on *Pseudacris triseriata* (Anura: Hylidae). **Source: Ecology**, v. 58, n. 4, p. 830–839, 1977.

WATKINS, T. B. Predator-Mediated Selection on Burst Swimming Performance in Tadpoles of the Pacific Tree Frog, *Pseudacris regilla*. **Physiological Zoology**, v. 69, n. 1, p. 154–167, 1996.

ZINA, J. Communal nests in *Physalaemus pustulosus* (Amphibia: Leptodactylidae): experimental evidence for female oviposition preferences and protection against desiccation. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, n. 1, p. 148–150, 2006.

ANEXO I - PROTOCOLO PARA HISTOLOGIA

- Fixação

- Bouin

Solução ácido pícrico 75ml
Formol 25ml
Ácido Acético 5ml

Após a fixação é fundamental a remoção do ácido pícrico dos tecidos para a posterior etapa de coloração. Além disso, resíduos deste ácido podem favorecer a deterioração da peça com o passar do tempo. Para a eliminação do excesso de fixador dos tecidos é recomendado (Junqueira e Junqueira, 1983):

- 1º) Lavagem em água corrente por 18h;
- 2º) Transferência da peça para álcool 50%, durante 30min;
- 3º) Armazenamento da peça em álcool 70%.

- 1.1 Colocar material dentro do fixador escolhido já cortado no devido tamanho

2 Desidratação e Diafanização

I Desidratação

Álcool 80% 55 min
Álcool 90% 55 min
Álcool 95% 55 min
Álcool Absoluto I 55 min
Álcool Absoluto II 55 min

II Diafanização * mistura de álcool + xilol 1:1.

Mistura Álcool + Xilol 55 min
Xilol I 55 min
Xilol II 55 min

3 Inclusão (na parafina) *A fusão da parafina deve estar por volta de 58 °C

Primeiro banho 2 horas
Segundo banho 2 horas

Após esse período, retirar corte do segundo banho, coloque-o em uma forma com uma parafina filtrada (nova) e espere esfriar a temperatura ambiente por 24h.

4.1 Inclusão final: Retira a parafina (endurecida) contendo a peça e adere-a em um toquinho de madeira específico para o micrótomo.

*modele esse bloco de parafina na forma de pirâmide.

5 Microtomia

Os corte de 7µm de espessura, foram colocados sobre lâminas histológicas com albumina transferidas para uma chapa quente (cerca 35°C) para serem distendidos e depois transferidos para uma estufa a 60° para secagem por volta de 24 horas.

6 Hidratações, desparafinização e coloração

Xilol II 10 min
Xilol I 10 min
Mistura Xilol + álcool 10 min
Álcool absoluto II 10 min
Álcool absoluto I 10 min
Álcool 95% 10 min
Álcool 90% 10 min
Álcool 80% 10 min
Água corrente 10 min
Hematoxilina 2 min
Água corrente 10 min
2 banhos de água destilada rapidamente
Eosina 5 min
1 banho de água destilada rapidamente

7 Desidratação e Montagem

Álcool 70% 2 min
Álcool 90% 2 min
Álcool 95% 2 min
Álcool Absoluto I 5 min
Álcool Absoluto II 5 min
Mistura Álcool + Xilol 5 min
Xilol I 5 min
Xilol II 5 min

Montamos a lâminas com Entellan.

APÊNDICE I - Effect of hydric stress during development on metabolic rate in imago of *Leptodactylus fuscus*.

VENTURELLI, D.; BAÚ, P. H. T.; KLEIN, W.

Studies presented at 50. Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia 'Bridge to the future', Águas de Lindóia, SP. 2015.

Introduction

Several species of frogs breed in temporary pools maintained exclusively by rainfall. These pools easily dry out causing high mortality of eggs or tadpoles. However, the tadpoles of some species, such as *Leptodactylus fuscus*, can survive up to five days in pools that are drying out, needing only a humid substrate for development. It is not known which possible damages dehydration stress causes in tadpoles during their ontogeny

The goal of this study was to analyze the effect of hydric stress during development on metabolic rate in imago of *L. fuscus*.

Materials e Methods

Tadpoles of treatment group were transferred to a container with a double layer of absorbent tissue paper on the bottom wetted with 4 mL water for 12, 24 and 72 hours (h). Control group tadpoles were kept in containers with 100 mL water (fig. 1a). Afterwards, all tadpoles were kept in containers with 100 mL water until metamorphoses. Oxygen consumption of imagos was measured using closed respirometry at 25°C. (fig. 1b)

Fig 1 . Methods; A: Experimental protocol (see Downie; Smith, 2013), B: Closed respirometry

Results and Discussion

No significant difference in oxygen consumption comparing Treatment and Control groups was detected in all intervals (2wayANOVA, $F=1,10$ $p=0,3126$) but, there are significant difference between time of treatment (2wayANOVA, $F=10,17$ $p=0,0019$) (fig 2).

Imago of tadpoles subjected to hydric stress (72h) had a body mass lower compared to other time of stress. So, that difference of time can be due to body mass since the oxygen consumption is relativized by the body mass (fig 3).

Fig 2. Metabolic rate (Mean±SD) of imago of tadpoles subjected to treatment (4mL) and control in all intervals of time

Fig 3. Absolute values of oxygen consumption related to the body mass of imagos; 12, 24 and 72 (time); C (Control) T (4mL).

Conclusion

Hydric stress during development of *L. fuscus* did not affect metabolic rate of imago corroborating the current hypothesis that tadpoles of *L. fuscus* show admirable survival capacities out of water. Nonetheless, prolonged hydric stress (e.g. 72 hours) can cause reduction body mass of metamorphosed animals.

Reference

- DOWNIE, J. R.; SMITH, J. 2003. Survival of larval *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) out of water: developmental differences and interspecific comparisons. **J Herpetol**, v. 37, p. 107–115, 2003.
- DONOHUE, P. H.; WEST, T.; BOUTILIER, R. G. Respiratory, metabolic, and acid-base correlates of aerobic metabolic rate reduction in overwintering frogs. **The American Physiological Society**, p. 0363-6119, 1998.
- GIARETTA, A. A.; MENIN, M.; FACURE, K. G.; KOKUBUM, M.N.D.E.C.; OLIVEIRA-FILHO, J. C. Species richness, relative abundance, and habitat of reproduction of terrestrial frogs in the Triângulo Mineiro region, Cerrado biome, southeastern Brazil. **Iheringia, Sér Zoologia**, v. 98, p. 181–188, 2008.

SINCLAIR, B. J.; et al. Real-time measurement of metabolic rate during freezing and thawing of the wood frog, *Rana sylvatica*: implications for overwinter energy use. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 292-302, 2013.

VALERIO, C. E. Ability of some tropical tadpoles to survive without water. **Copeia**, p. 364–365, 1971.