

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

O efeito da variação térmica e da umidade sobre os mecanismos de osmorregulação em  
*Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*

Vanessa Maria Gomes Bonfim

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada

Ribeirão Preto - SP

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

O efeito da variação térmica e da umidade sobre os mecanismos de osmorregulação em  
*Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*

Vanessa Maria Gomes Bonfim

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Wilfried Klein

Co-orientador: Prof. Dr. John Campbell McNamara

Ribeirão Preto - SP

2023

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.

Bonfim, Vanessa Maria Gomes

O efeito da variação térmica e da umidade sobre os mecanismos de osmorregulação em *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*.  
Ribeirão Preto, 2023

121. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área: Biologia Comparada. Orientador: Klein, Wilfried. Co-orientador: Prof. Dr. John Campbell McNamara

1. Fisiologia. 2. Osmorregulação. 3. Comportamento Animal. 4. Anfíbios. 5. Temperatura. 6. Umidade. 7. *Rhinella diptycha*. 8. *Leptodactylus labyrinthicus*.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

O efeito da variação térmica e da umidade sobre os mecanismos de osmorregulação em

*Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*.

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

Aprovado em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Ao meu filho Henrique, meu marido Vitor, meu orientador e amigo Wilfried.

Sem o apoio e a força de vocês isso não teria acontecido.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a pós em Biologia compara pela oportunidade, pelo apoio financeiro e diretamente a Vera por sempre estar disposta a tirar as minhas dúvidas.

A CAPES pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A minha Família Bonfim e a minha Família Passos Rios por sempre acreditarem e me apoiarem.

A todos os colegas e amigos de Laboratório LMFV, por todas as conversas e ajuda em tudo durante esse doutorado. Em especial a Ray Bueno Brasil por que mesmo quando duvidou que a gente ia conseguir tirar o sangue foi comigo aprender.

A Susie Keico Teixeira Rocha (técnica do LMFV), por ser tuuuuu, amiga e as vezes até mãe.

A Família Amphibia (Lab prof. Napoli da UFBA) por sempre e por tudo.

As Amigas do apto 33 da Rua Maracaju! Por todo o apoio e resenhas.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram seja empréstimo de equipamento ou seja só por uma conversa sobre o projeto: Rodrigo Augusto Santinelo Pereira, Tiana Kohlsdorf, Ademilson Panunto Castelo, Maria Sol Brassesco Annichini, Tiago Campos Pereira, Elisabeth Spinelli de Oliveira e Patricia Ferreira Monticelli.

Ao Prof e coorientador John Campbell McNamara por ter topado trabalhar nessa loucura, ter me ensinado muito e ter me dado apoio nos momentos necessários. Te agradeço muito.

Se eu fosse agradecer ao meu orientador prof Wilfried Klein por todos esses 16 anos (desde a UFBA até a USP) daria um livro! Te amo de verdade! Sem você, eu como profissional não teria acontecido. Você é mais que um pesquisador e orientador sempre foi uma pessoa humana e amigo comigo.

Ao meu marido, amigo, companheiro, parceiro, amante, colega de trabalho.... enfim td na minha vida Vitor Passos Rios! Te amo demais! Vc é o segundo amor da minha vida!

Meu filho Henrique, primeiro amor da vida da mamãe! Você veio pra me ensinar tudo que realmente importa, e me ensinou/ensina que a vida é maior que a academia. Por você consegui terminar.

## Resumo

BONFIM, V. M. G. O efeito da variação térmica e da umidade sobre os mecanismos de osmorregulação em *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*. 2023. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2023

As mudanças climáticas interferem diretamente no ciclo da água, alterando a dinâmica de chuvas e temperatura dos ambientes. Anfíbios anuros podem ter na sua fisiologia a resposta para a permanência em regiões marcadas por mudanças climáticas que são potencialmente desafiadores à sobrevivência dos mesmos. O objetivo principal deste projeto foi descrever e comparar os padrões fisiológicos e comportamentais relacionados à osmorregulação sob efeito da variação térmica e da umidade em *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*. Para isso, indivíduos dessas espécies foram coletados e mantidos em uma câmara climática, na qual sofreram um aumento gradual da temperatura. Ao longo do experimento, foram medidas a osmolalidade e as concentrações no plasma e no sangue de ureia e íons monovalentes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) após cada aumento de temperatura. Os indivíduos também foram submetidos a experimentos de desempenho locomotor para verificar o efeito do stress fisiológico na capacidade de deslocamento. Para o experimento, a temperatura foi elevada em 3° C a cada 10 dias de experimento, começando de 25°C (dia) e 20°C (noite) indo até 40°C (dia) e 35°C (noite). O experimento de baixa umidade do ar foi realizado em sala com temperatura controlada a 25°C. No experimento de desempenho locomotor, os indivíduos foram induzidos a percorrer um circuito oval, por 5 minutos, e a distância percorrida e número de saltos foram registradas. Foram ao total seis meses de manutenção e experimento, com *Rhinella diptycha* apresentando alto grau de mortalidade. Os parâmetros fisiológicos do sangue e da urina foram alterados em resposta ao aumento de temperatura e diminuição da umidade do ar, com a concentração de osmólitos aumentando, indicando stress hídrico. A quantidade de urina diminuiu, chegando a zero em vários indivíduos ao longo do experimento. O desempenho locomotor não foi afetado significativamente, porém a condição corporal dos indivíduos foi afetada, com perdas significativas de massa corporal ao longo do experimento, indicando gasto aumentado de energia. Esse conjunto de resultados evidencia a fragilidade destas espécies no cenário atual de mudanças climáticas.

Palavras-chave: Fisiologia. Osmorregulação. Comportamento Animal. Anfíbios. Temperatura. Umidade. *Rhinella diptycha*. *Leptodactylus labyrinthicus*

## Abstract

BONFIM, V. M. G. Effect of thermal variation and low humidity on the osmoregulatory mechanisms of *Rhinella diptycha* and *Leptodactylus labyrinthicus*. 2023. Thesis (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2023

Climate change interferes directly the water cycle, altering the dynamics of rain and temperature change in the environments. Anuran amphibians may alter their physiology as a way to remain in areas affected by climate change. This project's main objective was to describe and compare physiological and behavioral patterns linked to osmoregulation under thermal and humidity changes in *Rhinella diptycha* and *Leptodactylus labyrinthicus*. Individuals were captured and maintained in a climatic chamber, where they were subjected to gradual temperature increases. Throughout the experiment, we measured osmolality and concentrations of monovalent ions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) in plasma and urine after each temperature increase. Animals were also subjected to a locomotor performance test to assess the effects of physiological stress on locomotor capacity. The temperature experiment involved gradual, 3°C increases in diurnal and nocturnal temperature every 10 days, starting at 25°C (day) and 20°C (night), and ending at 40°C (day) and 35°C (night). The low humidity experiment was carried out in a climate-controlled room at 25°C. For the locomotor performance experiment, subjects were made to traverse an oval course for 5 minutes, and distance and number of jumps were recorded. The experiment lasted for 6 months, with *Rhinella diptycha* showing a high degree of mortality. Plasma and urine physiological parameters were altered in response to increasing temperature and decreasing air humidity, with osmolality increasing, indicating hydric stress. Urine volume decreased, reaching zero in several individuals throughout the experiment. Locomotor performance was not affected significantly, but body condition was affected with significant weight loss, indicating an increase in energy expenditure. The different results taken together demonstrate the fragility of these species in the current climate change scenario.

Keywords: Physiology. Osmoregulation. Animal behavior. Amphibians. Temperature. Humidity. *Rhinella diptycha*. *Leptodactylus labyrinthicus*

## Lista de ilustrações

Figura 1. Ciclo experimental de aumento gradual de temperatura.....	28
Figura 2. Desenho experimental desidratação por ar seco. ....	31
Figura 3. Gráficos de média e desvios padrão da osmolalidade do plasma e seus respectivos componentes. Cada ponto é um indivíduo. ....	37
Figura 4. Média e desvio padrão de peso e volume de urina ao longo do tempo. <i>R. diptycha</i> não apresentou urina ao longo do experimento. Cada ponto é um indivíduo. ....	38
Figura 5. Gráficos de média, desvio padrão e dispersão dos indivíduos na recém-captura. ....	41
Figura 6. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta peso dos indivíduos das espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> , durante o período de experimento de variação gradual da temperatura. ....	51
Figura 7. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta hematócrito das espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> , durante o período de experimento de variação gradual da temperatura. ....	52
Figura 8. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) das variáveis resposta osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia no plasma dos indivíduos das espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> , durante o período de experimento de variação gradual da temperatura. ....	53
Figura 9. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta Volume de urina das espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> , durante o período de experimento de variação gradual da temperatura. ....	58
Figura 10. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) das variáveis resposta osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia na urina dos indivíduos das espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> . Durante o período de experimento de variação gradual da temperatura. ....	59
Figura 11. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável peso (g/cm <sup>2</sup> ) dos indivíduos de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> , no experimento de desidratação por ar seco (URC1 = indivíduos pré-experimento e URC2= indivíduos após perda de 20% do seu peso .....)	63
Figura 12. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável hematócrito dos indivíduos de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> , no experimento de desidratação por ar seco (URC1 = indivíduos pré-experimento e URC2= indivíduos após perda de 20% do seu peso inicial. ....)	64
Figura 13. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) das variáveis resposta osmorregulatórias osmolalidade do plasma e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia no plasma dos indivíduos de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> , no experimento de desidratação peso ar. ....	65

Figura 14. Temperatura corpórea de <i>L. labyrinthicus</i> e <i>R. diptycha</i> , da câmara climática e da sala controle aferidas durante o experimento de aumento gradual da temperatura. ....	68
Figura 15. Esquema do experimento de desempenho locomotor dentro da câmara climática.....	74
Figura 16. Gráfico de médias (▲) e distribuição das medidas dos indivíduos (●) referente a distância percorrida total padronizada, ao longo do gradiente de aumento de temperatura.....	79
Figura 17. Gráfico de médias (▲) e distribuição das medidas dos indivíduos (●) referente a tamanho médio do salto (cm), padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, ao longo do gradiente de aumento de temperatura.....	80
Figura 18. Gráfico de médias (▲) e distribuição das medidas dos indivíduos (●) referente a contagem do número de saltos (contagem), ao longo do gradiente de aumento de temperatura. .	81
Figura 19. Gráfico de médias (●) e desvio padrão (barras verticais) referente ao tamanho de salto (cm) padronizado pelo comprimento rostro-cloacal (cm) de cada indivíduo medido no experimento D1, a cada minuto. Período total da do estímulo de salto 5 minutos. ....	82
Figura 20. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental porcentagem do tempo total em salto para as espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> . ....	89
Figura 21. Média e desvio padrão da variável resposta comportamental porcentagem do tempo em salto por minuto para as espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> .....	90
Figura 22. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental nº total de saltos para as espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> . ....	91
Figura 23. Média, desvio padrão da variável resposta comportamental nº de saltos por minuto para as espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> . ....	92
Figura 24. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) para as espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> . ....	95
Figura 25. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental moda do tamanho do salto de cada indivíduo (Mo salto individuo padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) para as espécies. ....	96
Figura 26. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental porcentagem do tempo total em salto para as espécies <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> . Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente). ....	101

Figura 27. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental porcentagem do tempo em salto por minuto para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente). ..... 102

Figura 28. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental nº total de saltos para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/ noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente)... 103

Figura 29. Média e desvio padrão da variável resposta comportamental nº de saltos por minuto para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente). ..... 104

Figura 30. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente). ..... 105

Figura 31. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental moda do tamanho do salto de cada indivíduo (Mo salto individuo padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente). ..... 106

Figura 32. Temperatura corpórea de *L. labyrinthicus* e *R. diptycha*, da câmara climática aferida durante o experimento de desempenho locomotor. Triângulos indicam os indivíduos, bola com barra indicam média e desvio padrão. Temperatura câmara climática dia e noite (linha) indicam temperatura controlada. .... 108

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de média e desvio padrão das variáveis resposta ao longo do tempo. ....	36
Tabela 2. Variáveis na recém-captura. Média e desvio padrão das variáveis resposta peso e parâmetros sanguíneos osmorregulatórios (osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia) recém-captura no plasma dos indivíduos das espécies <i>L. labyrinthicus</i> e <i>Rhinella diptycha</i> . ....	40
Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis resposta: peso, hematócrito, osmolalidade, concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia no plasma dos indivíduos da espécie <i>L. labyrinthicus</i> no experimento de aumento gradual da temperatura.....	47
Tabela 4. Resumo das análises estatísticas (variáveis repostas: Peso, hematócrito, e osmolalidade, cloretos, sódio, potássio e ureia do plasma, entre os grupos de <i>L. labyrinthicus</i> e seus respectivos testes de premissas.....	48
Tabela 5. Média e desvio padrão das variáveis resposta: peso, hematócrito, osmolalidade, concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia no plasma dos indivíduos da espécie <i>Rhinella diptycha</i> no experimento de aumento gradual da temperatura. ....	49
Tabela 6. Resumo das análises estatísticas (variáveis repostas: Peso, hematócrito, Volume de Urina e osmolalidade, cloretos, sódio, potássio e ureia do plasma, entre os grupos de <i>Rhinella diptycha</i> e seus respectivos testes de premissas.....	50
Tabela 7. Média e desvio padrão das variáveis resposta: volume de urina, osmolalidade, concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia na urina dos indivíduos da espécie <i>L. labyrinthicus</i> no experimento de aumento gradual da temperatura.....	55
Tabela 8. Média e desvio padrão das variáveis resposta: volume de urina, osmolalidade, concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia na urina dos indivíduos da espécie <i>Rhinella diptycha</i> no experimento de aumento gradual da temperatura. ....	56
Tabela 9. Resumo das análises estatísticas (variáveis repostas: Volume de Urina e osmolalidade, cloretos, sódio, potássio e ureia na urina), entre os grupos de <i>L. labyrinthicus</i> e seus respectivos testes de premissas.....	57
Tabela 10. Média e desvio padrão das variáveis resposta peso, hematócrito, osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia no plasma, e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos de <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> , no experimento de desidratação por ar seco.....	62
Tabela 11. Temperatura corpórea de <i>L. labyrinthicus</i> e <i>R. diptycha</i> , da câmara climática e da sala controle aferidas durante o experimento de aumento gradual da temperatura. Manutenção dia e noite são as temperaturas controladas na câmara climática. ....	67

Tabela 12. Sumário das variáveis de desempenho locomotor sob aumento gradual da temperatura (média ± desvio padrão): distância total percorrida, número de saltos, tamanho de salto, tempo de fadiga e tempo de viragem. .... 83

Tabela 13. Média e desvio padrão das variáveis resposta percentagem do tempo total em salto e percentagem do tempo em salto por minuto, e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* no experimento de aumento gradual da temperatura. .... 87

Tabela 14. Média e desvio padrão das variáveis resposta percentagem do tempo total em salto, e percentagem do tempo em salto por minuto; e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas. .... 88

Tabela 15. Média e desvio padrão das variáveis resposta número total de saltos; somatório do número de saltos por minuto ( $\sum$  n° saltos minuto); tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC); e moda do tamanho de salto (Mo salto indivíduo); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissa. .... 93

Tabela 16. Média e desvio padrão das variáveis resposta número total de saltos; número de saltos por minuto ( $\sum$  n° saltos minuto; salto indivíduo); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas. Para indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* no experimento de aumento gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°c/noite 20°c; CP2= dia 28°c/noite 23°c; CP3= dia 31°c/noite 26°c; CP4= dia 34°c/noite 29°c; CP5= dia 37°c/ noite 32°c; CP6= dia 40°c/35°c)..... 94

Tabela 17. Média e desvio padrão das variáveis resposta número total de saltos; número de saltos por minuto ( $\sum$  n° saltos minuto); tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal (DTS/CRC); e moda do tamanho do salto de cada indivíduo (Mo salto indivíduos)..... 97

Tabela 18. Média e desvio padrão das variáveis resposta percentagem do tempo total em salto, e percentagem do tempo em salto por minuto. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas para indivíduos da espécie *L. labyrinthicus* (temperaturas: CP1= dia 25°c/noite 20°c; CPURC1= temperatura ambiente). .... 98

Tabela 19. Média e desvio padrão das variáveis resposta número total de saltos; número de saltos por minuto ( $\sum$  n° saltos minuto), tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) e moda do tamanho do salto de cada indivíduo (Mo salto indivíduo). Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* (temperaturas: CP1= dia 25°c/noite 20°c; CPURC1= temperatura ambiente)..... 99

Tabela 20. Média e desvio padrão das variáveis resposta percentagem do tempo total em salto e percentagem do tempo em salto por minuto. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1); e

resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* (temperaturas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CPURC1= temperatura ambiente). ..... 100

Tabela 21. Temperatura corpórea de *L. labyrinthicus* e *R. diptycha*, da câmara climática aferida durante o experimento de desempenho locomotor. Manutenção dia e noite são as temperaturas controladas na câmara climática. .... 107

## Sumário

Resumo .....	6
Abstract.....	7
Introdução Geral – Ecofisiologia e osmorregulação em Anfíbios .....	16
<i>Objetivos</i> .....	20
Capítulo 1 - A osmorregulação sob efeito da variação térmica e da baixa umidade em <i>Rhinella diptycha</i> e <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> .....	22
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	26
1.    Ambientes amostrais e espécies amostradas .....	26
2.    Protocolo experimental 1: Recém-captura .....	26
3.    Protocolo experimental 2: Manutenção e tratamentos - experimento variação gradual da temperatura.....	27
3.1. Piloto.....	28
3.1.1. Alterações metodológicas após o experimento piloto.....	29
1.1. Alterações metodológicas pós resultado do piloto.....	29
4.    Protocolo experimental 3: experimento de baixa umidade do ar .....	30
5.    Análises estatísticas.....	32
5.1. Pré-tratamento dos dados.....	32
5.2. Análises comparativas .....	32
Resultados .....	34
1.    Resultados do experimento piloto.....	34
2.    Estado geral e situação de coleta – Recém-captura - experimento definitivo.....	39
3.    Experimento variação gradual da temperatura.....	42
3.1. Aspectos gerais do experimento .....	42
3.2. Variável resposta: Peso padronizado pela área superficial.....	43
3.3. Variável resposta: Hematócrito .....	45
3.4. Variável resposta: osmolalidade e concentrações de ureia e eletrólitos (cloretos, sódio, potássio) no plasma .....	45
3.5. Variável resposta: osmolalidade e concentrações de ureia e eletrólitos (cloretos, sódio, potássio) na urina.....	54
4.    Experimento baixa de umidade do ar - <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> .....	60
4.1. Variável resposta: Peso padronizado pela área superficial .....	60
4.2. Variável resposta: Hematócrito.....	60
4.3. Variável resposta: osmolalidade e concentrações de ureia e eletrólitos (cloretos, sódio, potássio).....	60
5.    Temperatura Corpórea.....	66
Capítulo 2 - O efeito da variação térmica sobre o desempenho locomotor de <i>Rhinella diptycha</i> e <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> .....	69
Introdução.....	69
Material e Métodos.....	71
1.    Ambientes amostrais e espécies amostradas .....	71
2.    Experimento piloto.....	71
3.    Protocolo experimental 2: Manutenção e tratamentos - experimento variação gradual da temperatura.....	72
3.1.1. Alterações metodológicas pós resultado do piloto.....	73

4.	Análises estatísticas.....	74
4.1.	Pré-tratamento dos dados.....	74
4.2.	Análises comparativas.....	75
	Resultados.....	77
1.	Experimento piloto.....	77
2.	Experimento de aumento gradual de temperatura.....	84
3.	Comparação entre o primeiro dia de experimento e após período de recuperação.....	85
4.	Temperatura Corpórea.....	85
	Discussão geral.....	109
	Conclusão.....	114
	Referências.....	115

## Introdução Geral – Ecofisiologia e osmorregulação em Anfíbios

Os estudos ecofisiológicos têm como princípio básico entender como as respostas de controle metabólico dos indivíduos influenciam nas relações com o ambiente em que vivem. Esta linha de pesquisa tem ajudado a responder questões, como: “Como os indivíduos ocupam os ambientes?”, “Como os indivíduos suportam fatores estressantes?”, ou “Como esses controles fisiológicos interferem na dinâmica das espécies em seu ambiente?” (Wikelski e Cooke, 2006; Stevenson *et al.*, 2005; Ribeiro e Navas, 2012).

Atualmente, o emprego dos estudos de ecofisiologia é fundamental para o entendimento dos efeitos de mudanças climáticas, pois as espécies possuem padrões fisiológicos que, a depender das características do ambiente e da plasticidade fenotípica dos mecanismos de controle fisiológico das espécies, podem não ser efetivos mediante uma mudança para além do padrão da espécie. Neste contexto, estudos ecofisiológicos vem auxiliando na compreensão quanto ao controle e nos limites suportáveis das espécies (Beebee e Griffiths, 2005; Carey *et al.*, 2001; Blaustein *et al.*, 2011; Ribeiro e Navas, 2012).

As mudanças climáticas estão interferindo diretamente no ciclo da água, alterando a dinâmica de chuvas e temperatura dos ambientes. Os anfíbios são um dos principais grupos a sofrer com a mudança climática, devido a sua dependência direta de corpos de água para a sua manutenção no ambiente e reprodução das espécies (Buckeridge, 2008; Jones *et al.*, 1999; Blaustein *et al.*, 2010).

Evolutivamente, os anfíbios constituem um dos primeiros grupos de vertebrados a exibir características que lhes permitiram fazer incursões no ambiente terrestre (e.g., membros locomotores e respiração pulmonar), mas possuem características no seu ciclo de vida que os mantiveram dependentes de corpos d’água (e.g., pele permeável e ovos anamnióticos) e que os tornam mais susceptíveis à desidratação (Burggren e Warburton, 2007; Wells, 2007; Wygoda, 1984). Atualmente sabe-se, contudo, que a pele permeável não é uma barreira a sobrevivência dos anfíbios, pois estudos mostram que existem controles fisiológicos, morfológicos e comportamentais que reduzem as perdas evaporativas de água e assim favorecem a sobrevivência das espécies em ambiente terrestre (Toledo e Jared, 1993; Duellman, 1994; Pough *et al.*, 1983).

Estudos fisiológicos geralmente envolvem experimentação animal e, segundo o princípio de Krogh, existe um modelo experimental ideal para cada investigação científica. Os anfíbios constituem modelo investigativo ideal para estudos do sistema osmorregulatório por serem um grupo diverso e viverem em ambientes sob estresses diversificados. Estas características permitem entender as adaptações morfológicas e fisiológicas encontradas neste grupo (Burggren, 1999;

Burggren e Warburton, 2007). *Rhinella diptycha*, espécie da família Bufonidae foi incluída no grupo dos *Rhinella marina*, tendo sido descrita previamente para a região sudeste como *Rhinella schneideri* e para a região nordeste como *Rhinella jimi*, (Pereyra, et al. 2021; Stevaux, 2002). Ela é uma espécie com hábito mais terrestre e noturno, sendo encontrada comumente em áreas abertas e urbanizadas (Duellman e Trueb, 1994; Pramuk, 2006), possui pele espessa e com verrugas e glândulas que podem armazenar e secretar água e/ou substâncias lipídicas, o que permite a essa espécie incursões de longa distância sem estar próxima a corpos de água (Stevaux, 2002). Isso faz dela um bom modelo de estudo para relações hídricas de animais que dependem da água, mas que conseguem em algum período ter incursões em ambientes mais secos. *Leptodactylus labyrinthicus* é uma espécie da família Leptodactylidae, do grupo dos pentadactylus. Quando adultos são de grande porte, possuem a pele lisa e secretam na pele substâncias lipídicas de caráter tóxico que auxiliam na defesa contra predadores (Heyer, 1969; Ponssa et al, 2017, Gusmão et al, 2017). Ela possui hábito noturno, aquático e é encontrada dentro ou próxima a corpos de água (Silva et al, 2005; Zina e Haddad, 2005; Agostinho et al.,2013). Isso faz dela um bom modelo de estudo para relações hídricas de animais que dependem da água tanto na fase adulta quanto na fase larval.

A pele dos anfíbios é altamente especializada e possui características que são capazes de minimizar o efeito da desidratação quando ocupando um ambiente terrestre de baixa umidade. Entre tais características, destaco a presença de extensa rede de capilares no tegumento, glândulas lipídicas, verrugas que auxiliam na obtenção de água, canais iônicos e proteínas de membrana (aquaporinas) que têm como função primária o transporte de água para o interior da célula (Elias e Shapiro, 1957; Shoemaker e Nagy, 1977; Toledo e Jared, 1993; Cartledge *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007). Tais características morfológicas permitem que a pele dos anfíbios participe ativamente em processos fisiológicos, como trocas gasosas, osmorregulação (por captar água do meio ou diminuir a perda para o meio) e termorregulação (os anfíbios são ectotérmicos) (Bentley e Yorio, 1979; Wells, 2007).

Essas características morfológicas variam a depender da espécie animal, da região da pele (e.g., ventral, dorsal, pélvica e membros), de características do ambiente onde a espécie vive (variação de temperatura e umidade) e da distribuição espacial da espécie no habitat (e.g., hábitos arborícolas, terrestre, fossorial etc.) (Christensen, 1974; Wygoda, 1981; Warburg, 1997; Klein *et al.*, 2016). A título de exemplo sobre esta plasticidade, a região pélvica ventral dos anuros constitui a região mais vascularizada do corpo (Christensen, 1974; Jorgensen, 1994), mas espécies que vivem em ambientes áridos apresentam concentração adicional de capilares na região ventral e ainda há espécies que produzem várias camadas de pele, capazes de formar casulos durante épocas

de seca (Toledo e Jared, 1993). Nota-se, portanto, que não podemos tratar as espécies de maneira generalizada quanto aos padrões dentro do grupo dos anfíbios, pois, a depender de cada estratégia de vida no ambiente, as características morfológicas irão variar para cada espécie.

Estas características morfológicas também podem ser controladas através de mecanismos fisiológicos hormonais, expressão gênica de proteínas e controle de ATPases (Nagel e Katz, 2002; Jensen *et al.*, 2003; Uchiyama e Konno, 2006). Estudos recentes têm mostrado correlação entre a concentração sanguínea do hormônio antidiurético AVT (arginina-vasotocina) e o aumento da osmolaridade do sangue, a expressão de aquaporinas, o aumento da quantidade de canais iônicos (ATPases) e o aumento do potencial de trabalho das aquaporinas e ATPases já expressas na pele dos indivíduos (Konno *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2015; Peña-Villalobos *et al.*, 2016). Níveis elevados desse hormônio aumentam o funcionamento das ATPases, aumentando a concentração de íons no sangue dos indivíduos, tornando-os mais hiperosmóticos em relação ao meio. Isto tem o efeito de aumentar também a expressão e/ou funcionamento das aquaporinas (Ogushi *et al.*, 2010b), aumentando assim a reabsorção de água através dos rins e bexiga e a absorção de água através da pele da região ventral pélvica (Viborg e Rosenkilde, 2004; Viborg e Hillyard, 2005). Outros estudos evidenciaram ainda a importância dos hormônios corticosterona e cortisol na resposta fisiológica relacionada ao estresse osmótico devido ao aumento da salinidade, infecção por doenças e a fragmentação dos habitats (Janin *et al.*, 2011; Assis *et al.*, 2015; Gabor *et al.*, 2015; Uchiyama *et al.*, 2015).

Um efeito importante, porém, comparativamente pouco estudado do estresse osmótico é a relação entre este e comportamento locomotor, que tem ligação direta com a sobrevivência dos animais. Desempenho locomotor pode ser usado como uma medida indireta da capacidade do indivíduo de buscar microhabitats adequados ou evadir-se de predadores, tendo, portanto, um impacto direto sobre o fitness do animal. O estresse hídrico em baixos níveis pode afetar o desempenho locomotor estimulando o animal a aumentar sua locomoção em busca de microhabitats mais propícios, mas, em níveis mais altos, pode debilitar o animal a ponto de ele não conseguir se deslocar com eficiência. A resistência aos efeitos do estresse hídrico no desempenho locomotor pode ser um traço selecionado positivamente, por exemplo, em ambientes xéricos. Tingley e colaboradores (2012) demonstraram que populações de *Rhinella marina* de ambientes xéricos da Austrália tem uma maior resistência (medida como distância total percorrida, velocidade e número de saltos por metro) aos efeitos da dessecação do que coespecíficos de áreas méxicas, uma indicação de rápida seleção deste traço, dado que *R. marina* é uma espécie que foi introduzida

recentemente na Austrália. Isto é apoiado pelos dados de Prates e Navas (2009), que encontraram resultados semelhantes para *Rhinella granulosa* de ambientes de Mata Atlântica e da Caatinga.

Mesmo com o aumento dos estudos de ecofisiologia, pesquisas sobre respostas osmorregulatórias ainda são escassas quanto aos tipos de ecossistemas e habitats dos anfíbios anuros e o número de espécies estudadas. A maioria dos estudos com resposta fisiológica está ligada a ambientes extremos (e.g., alta salinidade ou altitude), evolução do desenvolvimento ligada a plasticidade em girinos (Rocha *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2012) e espécies que realizam estivação. Entretanto, as respostas fisiológicas para as estratégias das espécies relacionadas às mudanças sazonais dos ambientes e como estas espécies se distribuem no habitat ainda permanecem desconhecidas (Xavier e Napoli, 2011; Hopkins e Brodie, 2015). No Brasil, há grande variação nas características dos biomas existindo regiões com variação sazonal bem-marcada e outras regiões com variações menos acentuadas, como é o caso da Caatinga e da Mata Atlântica de baixa altitude, respectivamente. Além disso, existe número muito grande de espécies que pode ter em sua fisiologia respostas para a permanência de indivíduos em regiões que apresentam variações sazonais com microclimas potencialmente estressantes, principalmente devido à variação de temperatura e umidade para as quais os animais estão expostos (Silvano e Segalla, 2005; Ribeiro e Navas, 2012; Dabés *et al.*, 2012).

## Objetivos

### Objetivo geral:

Descrever e comparar os padrões fisiológicos e comportamentais relacionados a osmorregulação sob efeito da variação térmica e da baixa umidade em *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*

### Objetivos específicos:

#### 1. Recém-captura

1.1. Determinar a osmolalidade do plasma em situação de recém-captura para cada espécie.

1.2. Determinar as concentrações de ureia e eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) no plasma em situação de recém-captura para cada espécie.

#### 2. Variação gradual de temperatura

Para cada espécie, iremos investigar:

2.1. Peso: Identificar se o peso muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados em campo e no experimento

2.2. Hematócrito: Identificar se a concentração do hematócrito muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados experimento

#### 2.3. Urina:

2.3.1. Identificar se o volume de urina muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados experimento

2.3.2. Identificar se a osmolalidade da urina muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões no experimento

2.3.3. Identificar se as concentrações de ureia e eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) na urina mudam em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados no experimento

#### 2.4. Plasma

2.4.1. Identificar se a osmolalidade do plasma resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados em campo e no experimento

2.4.2. Identificar se as concentrações de ureia e eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) no plasma mudam em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados em campo e no experimento

#### 2.5. Comportamento

2.5.1. Identificar se o desempenho locomotor dos animais (número total de saltos, distância total percorrida, moda do tamanho do salto, total de salto por minuto e percentual do tempo em salto) muda em resposta à mudança gradual de temperatura.

3. Variação gradual de Umidade – só para *Leptodactylus labyrinthicus*

3.1. Peso

3.1.1 Identificar se o peso muda em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento ao limite de perda de 20% do peso inicial

3.2. Hematocrito

3.2.1. Identificar se o hematócrito muda em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento ao limite de perda de 20% do peso inicial

3.3. Plasma

3.3.1. Identificar se a osmolalidade do plasma muda em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento ao limite de perda de 20% do peso inicial

3.3.2. Identificar se as concentrações de ureia e eletrólitos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) no plasma mudam em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento ao limite de perda de 20% do peso inicial

## Capítulo 1 - A osmorregulação sob efeito da variação térmica e da baixa umidade em *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*

### Introdução

Uma necessidade básica para a sobrevivência dos seres vivos é a presença de água no meio intra e extracelular, por exemplo na quebra ou formação de proteínas e na manutenção da estrutura do DNA (Chaplin, 2001). A osmorregulação representa os mecanismos de regulação da água nos seres vivos, principalmente através do controle das concentrações de solutos, como sais, íons e moléculas orgânicas (osmólitos), nos tecidos ou no interior das células (Willmer, 2005; Wells, 2007). Estes mecanismos de regulação podem variar de acordo com o hábito (aquático/terrestre) e habitat, por exemplo, a água dos rios tem em sua composição menor concentração de solutos (ambiente hiposmótico ou isosmótico) quando comparado à água dos oceanos, que tem maior concentração de solutos (ambiente hiperosmótico) (Schmidt-Nielsen, 1990). Outro fator que interfere na osmorregulação, além da disponibilidade de água e seus componentes, é a temperatura, já que esta influencia diretamente na manutenção ou quebra das ligações químicas das moléculas, podendo alterar, por exemplo, estruturas e/ou conformações de membranas celulares, alterando o transporte de substâncias necessárias à osmorregulação (Willmer, 2005; Wells, 2007).

Evolutivamente os anfíbios constituem um dos primeiros grupos de vertebrados a exibir características que lhes permitiram fazer incursões no ambiente terrestre (e.g., membros locomotores e respiração pulmonar), mas possuem características no seu ciclo de vida que os mantiveram dependentes de corpos d'água (e.g., pele permeável e ovos anamnióticos) e que os tornam mais susceptíveis à desidratação (Burggren e Warburton, 2007; Wells, 2007; Wygoda, 1984). Atualmente sabe-se, contudo, que a pele permeável não é uma barreira à sobrevivência dos anfíbios, pois estudos mostram que existem controles fisiológicos, morfológicos e comportamentais que reduzem as perdas evaporativas de água e assim favorecem a sobrevivência das espécies em ambiente terrestre (Toledo e Jared, 1993; Duellman, 1994; Pough *et al.*, 1983).

Estudos fisiológicos geralmente envolvem experimentação animal e, segundo o princípio de Krogh, existe um modelo experimental ideal para cada investigação científica. Os anfíbios constituem modelo investigativo ideal para estudos do sistema osmorregulatório por serem um grupo diverso e viverem em ambientes sob estresses diversificados. Estas características permitem entender as adaptações morfológicas e fisiológicas encontradas neste grupo (Burggren, 1999; Burggren e Warburton, 2007).

A pele dos anfíbios é altamente especializada e possui características que são capazes de minimizar o efeito da desidratação quando ocupando um ambiente terrestre de baixa umidade. Entre tais características, destaco a presença de extensa rede de capilares no tegumento, glândulas lipídicas, verrugas que auxiliam na obtenção de água, canais iônicos e proteínas de membrana (aquaporinas) que têm como função primária o transporte de água para o interior da célula (Elias e Shapiro, 1957; Shoemaker e Nagy, 1977; Toledo e Jared, 1993; Cartledge *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2007). Tais características morfológicas permitem que a pele dos anfíbios participe ativamente em processos fisiológicos, como trocas gasosas, osmorregulação (por captar água do meio ou diminuir a perda para o meio) e termorregulação (os anfíbios são ectotérmicos) (Bentley e Yorio, 1979; Wells, 2007).

Essas características morfológicas variam a depender da espécie animal, da região da pele (e.g., ventral, dorsal, pélvica e membros), de características do ambiente onde a espécie vive (variação de temperatura e umidade) e da distribuição espacial da espécie no habitat (e.g., hábitos arborícolas, terrestre, fossorial etc.) (Christensen, 1974; Wygoda, 1981; Warburg, 1997; Klein *et al.*, 2016). A título de exemplo sobre esta plasticidade, a região pélvica ventral dos anuros constitui a região mais vascularizada do corpo (Christensen, 1974; Jorgensen, 1994), mas espécies que vivem em ambientes áridos apresentam concentração adicional de capilares na região ventral e ainda há espécies que produzem várias camadas de pele, capazes de formar casulos durante épocas de seca (Toledo e Jared, 1993). Nota-se, portanto, que não podemos tratar as espécies de maneira generalizada quanto aos padrões dentro do grupo dos anfíbios, pois, a depender de cada estratégia de vida no ambiente, as características morfológicas irão variar para cada espécie.

Estas características morfológicas também podem ser controladas através de mecanismos fisiológicos hormonais, expressão gênica de proteínas e controle de ATPases (Nagel e Katz, 2002; Jensen *et al.*, 2003; Uchiyama e Konno, 2006). Estudos recentes têm mostrado correlação entre a concentração sanguínea do hormônio antidiurético AVT (arginina-vasotocina) e o aumento da osmolaridade do sangue, a expressão de aquaporinas, o aumento da quantidade de canais iônicos (ATPases) e o aumento do potencial de trabalho das aquaporinas e ATPases já expressas na pele dos indivíduos (Konno *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2015; Peña-Villalobos *et al.*, 2016). Níveis elevados desse hormônio aumentam o funcionamento das ATPases, aumentando a concentração de íons no sangue dos indivíduos, tornando-os mais hiperosmóticos em relação ao meio. Isto tem o efeito de aumentar também a expressão e/ou funcionamento das aquaporinas (Ogushi *et al.*, 2010b), aumentando assim a reabsorção de água através dos rins e bexiga e a absorção de água através da pele da região ventral pélvica (Viborg e Rosenkilde, 2004; Viborg e

Hillyard, 2005). Outros estudos evidenciaram ainda a importância dos hormônios corticosterona e cortisol na resposta fisiológica relacionada ao estresse osmótico devido ao aumento da salinidade, infecção por doenças e a fragmentação dos habitats (Janin *et al.*, 2011; Assis *et al.*, 2015; Gabor *et al.*, 2015; Uchiyama *et al.*, 2015).

Mesmo com o aumento dos estudos, pesquisas sobre respostas osmorregulatórias ainda são escassas quanto aos tipos de ecossistemas e habitats dos anfíbios anuros e o número de espécies estudadas. Além disso, existe número muito grande de espécies que pode ter em sua fisiologia respostas para a permanência de indivíduos em regiões que apresentam variações sazonais com microclimas potencialmente estressantes, principalmente devido à variação de temperatura e umidade para as quais os animais estão expostos (Silvano e Segalla, 2005; Ribeiro e Navas, 2012; Dabés *et al.*, 2012).

Desta forma, o objetivo deste capítulo é descrever e comparar aspectos fisiológicos da osmorregulação (osmolalidade, ureia e íons monovalentes - Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) sob efeito da variação térmica e da baixa umidade em *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*.

#### Objetivos específicos:

1. Determinar a osmolalidade e as concentrações de osmólitos (ureia e íons monovalentes - Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) no plasma em situação de recém-captura para cada espécie.
2. Identificar se o peso muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados em campo e no experimento.
3. Identificar se a concentração do hematócrito muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados no experimento.
4. Identificar se a osmolalidade e as concentrações de ureia e eletrólitos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) no plasma mudam em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados em campo e no experimento.
5. Identificar se o volume de urina muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados no experimento.
6. Identificar se a osmolalidade e as concentrações de ureia e eletrólitos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) na urina mudam em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados no experimento.
6. Identificar se o peso muda em resposta à exposição ao ar seco, comparando o peso inicial do experimento ao limite de perda de 20% do peso inicial.

7. Identificar se o hematócrito muda em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento ao limite de perda de 20% do peso inicial.
8. Identificar se a osmolalidade e as concentrações de ureia e eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) no plasma mudam em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento ao limite de perda de 20% do peso inicial.

## Material e Métodos

### 1. Ambientes amostrais e espécies amostradas

(Licença de coleta, transporte e manutenção: SISBIO N°63810-1 outorgado a Vanessa Maria Gomes Bonfim no ano de 2018)

Os indivíduos de *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus* foram coletados no período de chuvas de 26 de setembro a 18 de novembro de 2019, através de busca ativa em período noturno, na área do campus da USP – Ribeirão Preto. Esta área está localizada em uma zona de transição de Mata Atlântica e Cerrado, apresentando corpos de água de pequeno e grande porte. No local de coleta foram obtidos 0,5 ml de sangue (seringa previamente heparinizada) para obtenção das medidas plasmáticas de recém-captura da osmolalidade e concentrações individuais dos osmólitos.

Do local de coleta até o Laboratório de Morfofisiologia de Vertebrados os animais foram mantidos individualmente em saco plástico inflado com ar contendo substrato úmido e folhas do local de coleta. No laboratório foram transferidos dos sacos para caixas (contendo folhas) de tamanho suficiente para movimentação lateral, mas que não possibilitou o salto (como indicado pela RN29 do CONCEA) e então foram mantidos no Biotério de Vertebrados Silvestres da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto, onde foram mantidos em cativeiro para realização dos experimentos.

### 2. Protocolo experimental 1: Recém-captura

Para alcançar o objetivo específico 1, foram coletados 15 indivíduos de *Rhinella diptycha* e 14 indivíduos de *Leptodactylus labyrinthicus*. Estes indivíduos foram coletados através de busca ativa e foram pesados em situação de repouso imediatamente após captura.

Análises laboratoriais do plasma: Na coleta dos animais em campo, e nos experimentos em laboratório, foram retiradas amostras de sangue dos indivíduos (0,5 ml) via punção ventricular com agulha (26Gx1/2") previamente heparinizada (20UI/ml) e então transferidas para Eppendorf de 2,5 ml e foram mantidos em gelo até chegar ao laboratório. Segundo Romero e Reed (2005), essa coleta deve ser realizada em até 3 minutos após captura, pois a captura interfere na concentração de corticosterona encontrada nos indivíduos. Não foi utilizado nenhum tipo de anestesia, pois esta interfere nas concentrações plasmáticas de eletrólitos.

No laboratório o sangue foi centrifugado a 4000 rpm por 8 minutos, para separação do plasma sanguíneo que foi mantido em freezer -20° C até a realização das análises plasmáticas. A

osmolalidade do plasma foi medida através de um osmômetro de pressão de vapor Wescor 5500. Para os eletrólitos (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup>) a medição foi realizada através de analisador de eletrólitos íon seletivo (Bioclin Íons PH - R10050) e para o osmólito (Ureia) foi utilizado sistema enzimático-colorimétrico para a determinação da uréia (kit Labtest Uréia CE). Estas medições foram realizadas por clínica veterinária particular (Ancliver filial de Franca-SP), para o transporte de Ribeirão Preto até a clínica as amostras de plasma foram acondicionadas em gelo.

### 3. Protocolo experimental 2: Manutenção e tratamentos - experimento variação gradual da temperatura

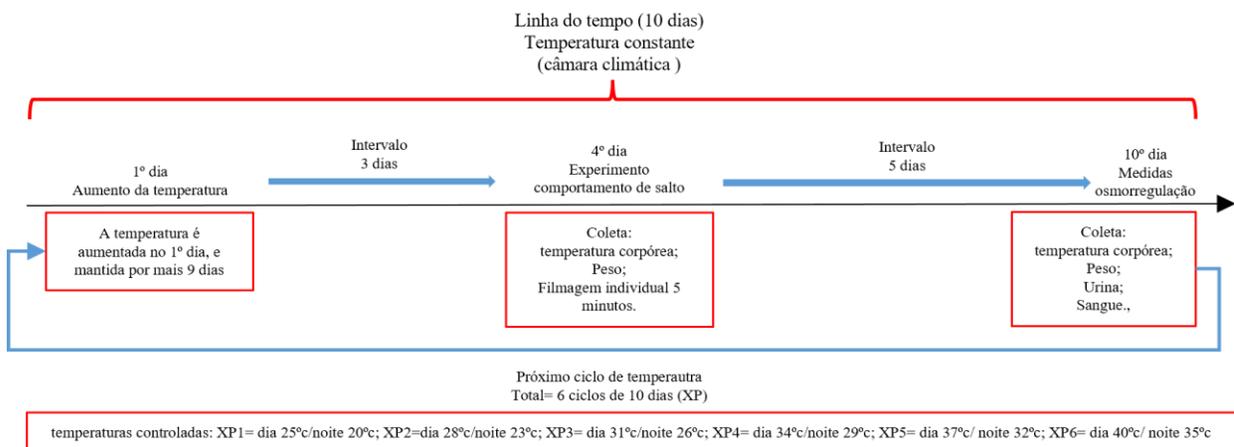
Para alcançar os objetivos específicos 2, 3, 4 e 5, os indivíduos coletados foram mantidos em sala com variação da luz e temperatura natural de Ribeirão Preto por um período de quarentena de 30 dias (15 de novembro a 22 de novembro de 2019), neste período os animais estiveram em ambiente controlado: a temperatura entre 25 (dia) e 20 (noite) °C, solo e ar 100% úmido e alimentação com baratas e tenébrios a cada 2 dias. Após este período 5 indivíduos de *Rhinella diptycha* e 4 indivíduos de *Leptodactylus labyrinthicus* foram mantidos nas mesmas condições do período de quarentena como grupo controle do efeito de tempo de cativeiro, e outros 10 indivíduos de cada espécie foram transportados para câmara climática Eletrolab (local onde foi variada a temperatura). Anfíbios anuros são solitários, o único momento gregário é a época reprodutiva, em que os machos buscam por fêmeas reprodutivas para realizar o amplexo. Nesse período reprodutivo também pode haver competição entre machos, por este motivo os animais foram mantidos individualmente em caixas de polipropileno com dimensões 50cm de comprimento x 30cm de altura x 30cm de largura que foram higienizadas 2 vezes por semana com água e detergente neutro. O substrato era trocado e água estava disponível *ad libitum* e era verificada diariamente, além disso, as salas de manutenção e experimentação foram limpas 2 vezes por semana. Neste projeto não houve nenhum enriquecimento ambiental (nas caixas de manutenção e experimentação) que permita ao animal se abrigar ou fugir do local de experimentação, pois todos os animais deveriam estar na mesma condição de cativeiro para que as diferenças específicas de comportamento (abrigo) não interferissem na resposta fisiológica (questão principal deste projeto).

Foram feitos experimentos no quais as condições de temperatura foram variadas gradualmente (Figura 1.), chegando até valores mais extremos do que os encontrados em campo. Os experimentos tiveram duração total de três meses, com alteração da temperatura a cada 10 dias. Neste projeto foi esperada alguma agitação (ex. saltos e tentativas de fuga) que pode ser indício de desconforto dos animais, pois anfíbios tem características comportamentais de buscar (por

deslocamento) ambientes úmidos em períodos secos. Esse desconforto esperado não prejudica fisiologicamente os animais. O critério de determinação do limite suportado pelos animais foi o da perda de 20% do peso inicial, pois isso já está descrito para anfíbios como o limite máximo de desidratação na qual não há dano fisiológico (Burggren and Vitalis, 2005; Cartledge et al., 2006; Churchill and Storey, 1995). A cada 10 dias era medido o peso (balança semi-analítica), para comparação do objetivo específico 2, era também aferida a temperatura corpórea (termômetro laser), e coletada a urina, para comparação dos objetivos específicos 3 e 4, e era coletado sangue dos indivíduos para a comparação do objetivo específico 5.

Para a investigação da osmolalidade, osmólitos, eletrólitos e hematócrito, o sangue foi coletado da mesma forma que no protocolo experimental 1. O hematócrito foi mensurado em todos os indivíduos (grupo controle e experimentais) como uma medida de verificação da recuperação dos componentes do sangue devido as sucessivas coletas que foram realizadas ao longo do experimento. Para determinação do hematócrito (hematócrito = %), microcapilares (triplicata) preenchidos com sangue foram centrifugados (11.000 rpm, 3 minutos) em centrífuga analógica micro hematócrito (Global Trade, Brasil) e logo após a centrifugação o microcapilar foi sobreposto ao cartão de leitura de sedimentação dos eritrócitos. A urina foi coletada via compressão abdominal sobre béquer volumétrico e coletado (quando havia) 2 ml e transferido para Eppendorf de 2.5 ml. A osmolalidade, osmólito e eletrólitos, tanto do plasma quanto da urina, foram medidos no mesmo laboratório de medicina veterinária, seguindo o mesmo protocolo de análise do protocolo experimental 1 – recém captura.

Figura 1. Ciclo experimental de aumento gradual de temperatura



### 3.1. Piloto

Para determinação das taxas de variação da temperatura e para testar os equipamentos experimentais, foi feito experimento piloto, com a duração de 1 mês. Neste piloto foram coletados quatro indivíduos de *Rhinella diptycha* e 4 indivíduos de *Leptodactylus vastus* em ambiente de Caatinga (município de Xique-Xique). A variável temperatura foi variada controladamente, começando de 25°C de dia e 20°C de noite indo até 43°C de dia e 38°C de noite. Desta forma, podemos determinar o melhor setup experimental e corrigir eventuais problemas. Para a realização do experimento foi utilizada câmara climática (Eletrolab) instalada no Biotério de Vertebrados Silvestres a temperatura foi aumentada em 3° C para o dia e noite a cada 10 dias de experimento. Vale ressaltar que a continuidade do experimento nas temperaturas altas só foi mantida se identificada perda menor que 20% da massa corpórea inicial como explicado anteriormente. Desta forma, cada período de 10 dias de experimento teve a seguinte sequência de coleta de dados: manutenção por sete dias na temperatura desejada e no sétimo dia realização da coleta de dados do desempenho locomotor, seguindo de mais 3 dias na mesma temperatura e no terceiro dia coleta de sangue (plasma e hematócrito), peso, temperatura do indivíduo, volume de urina e amostra de urina. No dia de coleta de sangue havia a mudança para a nova temperatura desejada do gradiente. Desta forma os indivíduos foram expostos a 10 dias da temperatura desejada. Como dito anteriormente, somente a temperatura foi alterada. Os animais tiveram água livre (reposta todos os dias) e alimentação com 6g de baratas nos dias de coleta de dados e uma alimentação intermediária no terceiro dia após a coleta de sangue.

A partir da realização do piloto obtivemos os resultados preliminares (descritos na seção de resultados). Estes nos permitiram identificar problemas no número amostral e na execução da metodologia que foram determinantes para a melhoria da metodologia de obtenção de dados do projeto. Durante a realização deste trabalho, *Rhinella jimi* era considerada uma espécie separada de *R. diptycha*, e foi usada no piloto por ser, até então, grupo irmão e ter hábito semelhante. Porém, Pereyra, et al. 2021 sinonimizou as duas espécies sob o nome de *R. diptycha*. *Leptodactylus* sendo grupo irmão, faz parte dos mesmos grupos filogenéticos e possui os mesmos hábitos de *Leptodactylus labyrinthicus*, a outra espécie focal deste projeto.

#### 3.1.1. Alterações metodológicas após o experimento piloto

##### 1.1. Alterações metodológicas pós resultado do piloto

Após a realização do piloto percebemos que o número amostral foi baixo, desta forma o esforço de coleta de *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus* foi maior, assim após 2 meses

de coleta foram obtidos 15 indivíduos e 14 indivíduos, respectivamente. A partir do piloto também identificamos a importância de um grupo controle, que nos permitiu identificar o efeito de cativeiro prolongado separadamente do efeito da temperatura, permitindo levar em consideração este efeito na análise dos grupos experimentais. Também identificamos a necessidade da medida de hematócrito para avaliar o efeito das coletas consecutivas (a cada 10 dias) sobre a recuperação hematológica. Outra variável que passamos a analisar foi a temperatura individual em momento experimental e no controle, pois precisávamos saber se a variação de temperatura de cativeiro experimental estava influenciando na temperatura do corpo do indivíduo.

#### 4. Protocolo experimental 3: experimento de baixa umidade do ar

Foram no total 4 meses de manutenção em cativeiro para o experimento de variação gradual de temperatura: coleta; período pré-experimento, caracterizado pelo período de alimentação e hidratação do animal afim de garantir que os animais estariam em condições ótimas de nutrição; período do experimento de variação gradual temperatura e período pós-experimento de temperatura, afim de verificar se os animais poderiam ter a capacidade de recuperação indicando que não houve danos fisiológicos evidentes pós experimentos. Isto nos permitiu utilizar os mesmos indivíduos no experimento de baixa de umidade (mais 2 meses de manutenção em cativeiro, totalizando 6 meses de experimento).

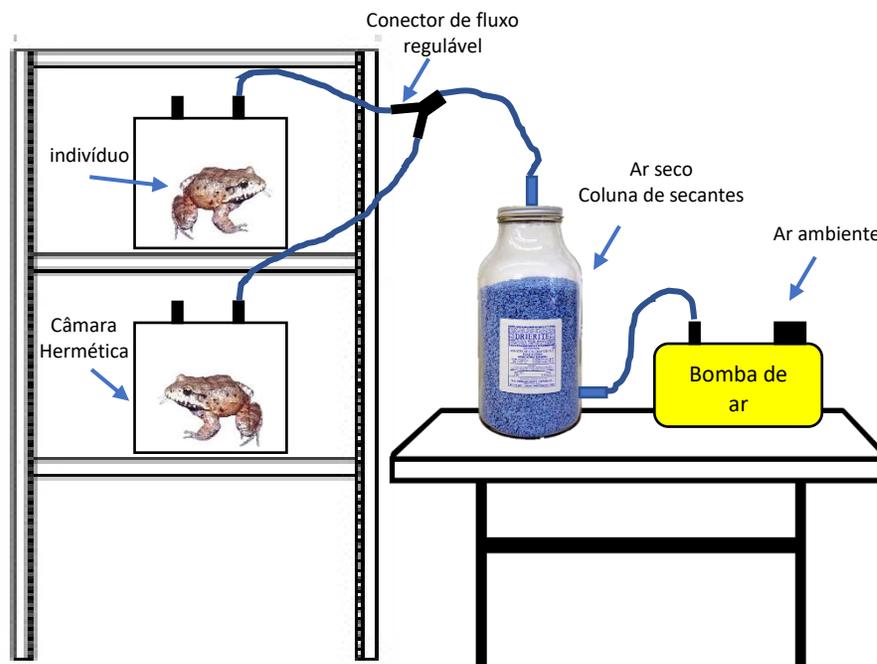
Para alcançar os objetivos específicos 6 e 7, após o período do procedimento experimental de variação da temperatura 9 indivíduos de *Leptodactylus labyrinthicus* foram mantidos em recuperação por um período de 1 mês (nível de tratamento experimental – URC1 = dia e noite 25°C). Esse período consistiu na manutenção desses animais com temperatura e luz natural de Ribeirão Preto, com alimentação a cada 2 dias (ração, baratas, tenébrios e besouros), água livre trocada a cada 2 dias e folhas para se abrigarem. Os indivíduos foram pesados para o acompanhamento do ganho de peso. Após esse período os indivíduos foram encaminhados para o experimento de variação de umidade do ar.

O experimento de variação de umidade do ar foi realizado em sala com temperatura controlada a 25°C. Os animais foram mantidos em caixas individuais herméticas e cada caixa teve o seu próprio ambiente de umidade do ar. Não foi fornecido água livre e nem alimentação. Os animais foram expostos ao ar seco que possuía umidade 10% (nível de tratamento experimental – URC2 = dia e noite 25°C). O período que os animais foram expostos foi de uma semana ou até que eles perdessem 20% do peso inicial do experimento. Os indivíduos foram pesados a cada 2 horas. Nesse procedimento experimental, as coletas de dados para o peso, hematócrito e plasma

(osmolalidade, ureia e íons monovalentes -  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) foram realizadas com as mesmas metodologias de coleta explicadas nos procedimentos experimentais anteriores.

Para a obtenção do ar seco (Figura 2), o ar era bombeado por uma coluna composta por Drierite e Sílica gel, que era substituída a cada 6 horas. Este ar seco era então bombeado para as câmaras herméticas individuais. Os indivíduos foram pesados a cada 2 horas e retirados do experimento, sob os critérios dito anteriormente, e o sangue era coletado seguindo o método descrito no protocolo 1. Após esta coleta os indivíduos foram encaminhados para caixas de manutenção e mantidos em quarentena para recuperação.

Figura 2. Desenho experimental desidratação por ar seco.



## 5. Análises estatísticas

### 5.1. Pré-tratamento dos dados

Para uma melhor visualização, entendimento e comparação dos dados, foram necessárias correções matemáticas. Foi feita uma padronização com o objetivo de controlar para as diferenças do tamanho corporal dos indivíduos. A variável peso foi padronizada pela área superficial ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), e o cálculo da área superficial foi feito de acordo com Klein et al. (2016) que estabelece uma relação entre massa e área superficial através de equações de regressão para Anura e para famílias específicas estudadas no respectivo trabalho. Deste modo, para o cálculo da área superficial ( $A_s$ ) de *Leptodactylus labyrinthicus* utilizamos a equação da família Leptodactylidae,  $A_s = 8.6856*(M_b^{0.6652})$  e para *Rhinella diptycha* utilizamos a equação da família Bufonidae  $A_s = 7.956*(M_b^{0.6772})$ . O volume de urina foi padronizado pelo peso do animal ( $\text{ml}/\text{g}$ ). Também foi feita uma conversão de unidades de medida para a variável concentração de ureia na urina e no plasma, devido à padronização usada pelo kit de medida utilizado (de  $\text{mg}/\text{dl}$  para  $\text{mmol}/\text{l} = \text{mg}/\text{dl} * 0.166$ ). Devido à diluição das amostras de plasma, necessária para obter volume suficiente para análise, foi feito o Cálculo de Diluição da Solução ( $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$ ) das concentrações plasmáticas obtidas pelo analisador ión seletivo, para obtenção dos valores corretos de concentração das amostras.

### 5.2. Análises comparativas

Após os tratamentos dos dados foram calculadas as médias e desvio-padrão de todas as variáveis respostas (peso, hematócrito, volume de urina, osmolalidade e concentrações de ureia e eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ ), tanto para plasma quando para urina (quando houve), sob o efeito da variável preditora temperatura (níveis de tratamento: XP1 = dia  $25^\circ\text{C}$ /noite  $20^\circ\text{C}$ ; XP2 = dia  $28^\circ\text{C}$ /noite  $23^\circ\text{C}$ ; XP3 = dia  $31^\circ\text{C}$ /noite  $26^\circ\text{C}$ ; XP4 = dia  $34^\circ\text{C}$ /noite  $29^\circ\text{C}$ ; XP5 = dia  $37^\circ\text{C}$ /noite  $32^\circ\text{C}$ ; XP6 = dia  $40^\circ\text{C}/35^\circ\text{C}$ ; URC1 = dia e noite  $25^\circ\text{C}$  e grupo controle = variação natural do ambiente) e também sob o efeito da variável preditora baixa de umidade do ar (10% de umidade)

Foi realizada uma análise de *outliers* via *boxplot*, uma ferramenta gráfica exploratória estatística que permite visualizar a distribuição dos dados e a presença de valores discrepantes (*outliers*) sem pré-determinar a distribuição, fornecendo assim um meio complementar para o entendimento do caráter dos dados. Foram retirados das análises apenas os indivíduos que estavam acima do limite máximo e abaixo do limite mínimo interquartil. Mesmo com as análises de *outliers*, fizemos análises de premissas de normalidade e de homogeneidade com e sem os *outliers* para verificar se a remoção, apesar de graficamente alterar a distribuição dos dados, não alterava a natureza geral destes. Os testes de premissas foram feitos para cada variável resposta e por nível

de tratamento. Para a premissa de normalidade foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, e para a premissa de homogeneidade das variâncias foi feito o teste de Levene. Para aquelas variáveis que não atenderam às premissas foi feita uma transformação logarítmica. Mesmo com essa transformação, elas continuaram não atendendo às premissas, desta forma optamos em realizar testes não-paramétricos com os dados não transformados.

Os testes não-paramétricos comparativos foram o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon *rank-sum test*), que compara dois níveis de tratamento por variável, para grupos independentes que possuem ou não tamanhos amostrais iguais. Para comparações com mais de dois níveis de tratamento foi realizada uma análise de Modelo Generalizado Misto (GLMM) com fator aleatório sendo o indivíduo. Este modelo ajusta os dados utilizando máxima verossimilhança restrita (REML) para encontrar o parâmetro  $\lambda$  que melhor se ajusta aos dados. No caso das nossas variáveis respostas, por serem contínuas, a família de funções de ligação indicada para o GLMM é a família gaussiana com a função identidade. Desta forma, o GLMM ajusta uma curva normal aos dados, sem perder as características da distribuição da variável. Para determinar que usaríamos o GLMM fizemos uma análise prévia de seleção de modelos, comparando (via ANOVA) um modelo complexo que continha indivíduo como fator aleatório (GLMM), e um modelo sem o indivíduo como fator aleatório (GLM). Como o valor de  $p$  desta comparação foi significativo, escolhemos o modelo mais complexo, incorporando assim o efeito da repetição dos indivíduos nas variáveis resposta. Nas análises do GLMM foram utilizados somente os indivíduos em que foi possível obter as medidas para todos os níveis de tratamento.

Os testes paramétricos comparativos usados foram o teste-t pareado, que compara dois níveis de tratamento por variável, para uma única amostra repetida. Para comparações com mais de dois níveis de tratamento foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas. Para verificar as diferenças entre os grupos, tanto para ANOVA de medidas repetidas quanto para o GLMM, foi feito um teste *post-hoc* de Tukey. Nas análises de medidas repetidas foram utilizados somente os indivíduos em que foi possível obter as medidas para todos os níveis de tratamento. Todas essas análises e cálculos foram realizadas no *software* R (R CORE TEAM, 2017), utilizando R Studio (2015). No tópico resultados iremos indicar qual análise foi realizada para cada variável. Todas as tabelas de resumo dos valores das variáveis respostas indicam as estatísticas e seus respectivos resultados.

## Resultados

Os resultados do experimento são apresentados abaixo, e serão discutidos em conjunto com os resultados do Capítulo 2, na Discussão Geral

### 1. Resultados do experimento piloto

A partir da realização do piloto obtivemos os resultados preliminares que nos permitiram identificar problemas no número amostral e na execução da metodologia que foram determinantes para a melhoria da metodologia de obtenção de dados do projeto. A Tabela 1 sumariza os dados encontrados no experimento piloto (média  $\pm$  desvio padrão). O volume de urina só foi coletado a partir do dia D3, e *R. diptycha* não apresentou urina em nenhum dia do experimento mesmo quando comprimido o abdômen. Os resultados gráficos para cada variável são apresentados na Figura 3 e Figura 4. É importante salientar que a alta variação encontrada nos dados deve ser levada em conta ao interpretar a significância (ou ausência desta) das análises estatísticas. Não foi encontrado um padrão claro para a osmolalidade de *L. vastus* em função do aumento da temperatura, porém há uma indicação de que a osmolalidade de *R. diptycha* aumenta o aumento da temperatura experimental, indicando um aumento da concentração dos componentes eletrolíticos do plasma, tornando o animal hiperosmótico, aumentando sua capacidade de absorção de água do meio.

Para *R. diptycha*, Osmolalidade exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p < 0.01$ ,  $R^2 = 26,92\%$ , inclinação de 4,745, significando que quando a temperatura aumenta ao longo do tempo, aumenta também a capacidade osmótica. Cloretos não exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.10$ ,  $R^2 = 19,31\%$ . Ureia não exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.10$ ,  $R^2 = 0,05\%$ , não exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.10$ ,  $R^2 = 0,05$ . Potássio não exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.10$ ,  $R^2 = 8.90\%$ , e Peso não exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.41$ ,  $R^2 = 97.11\%$ . Apesar de não apresentarem efeito estatístico significativo, analisando visualmente a distribuição nos gráficos (Figura 3) de Cloretos e Sódio é possível observar uma leve queda na média de suas concentrações. De modo oposto Potássio possui um leve aumento na média de sua concentração. Ureia também aparenta aumentar a sua concentração ao longo do aumento da temperatura, o que é comum em anfíbios de hábito terrestre, que reabsorvem ureia na bexiga para manter o potencial osmótico favorável ao armazenamento de água na bexiga.

Para *L. vastus* a Osmolalidade não exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.1$ ,  $R^2 = 37,85\%$ . Cloretos exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ ,  $R^2 = 18,08\%$ , inclinação - 1,79. Ureia exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.10$ ,  $R^2 = 46,58\%$ . Sódio não exibiu

efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.10$ ,  $R^2 = 0.22\%$ . e Potássio exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.01$ ,  $R^2 = 40.18\%$ , inclinação 0.11. Peso exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.001$ ,  $R^2 = 99.01\%$ , inclinação -1.2317, e Volume de urina exibiu efeito estatisticamente significativo,  $p > 0.02$ ,  $R^2 = 76.92\%$ , inclinação -1.4157. Analisando visualmente a distribuição nos gráficos (Figura 3) de Cloretos e Sódio observamos uma leve queda na média na sua concentração. De modo oposto, Potássio apresenta um leve aumento na média na sua concentração. Ureia também aparenta aumentar a sua concentração ao longo do aumento da temperatura. Para o peso houve uma leve diminuição das médias e isso pode também ser explicada pela diminuição do volume de urina, que contribui para o peso total dos indivíduos. Como *L. vastus* é uma espécie de hábito mais aquático, ele possui à sua disposição no ambiente água e íons.

Tabela 1. Valores de média e desvio padrão das variáveis resposta ao longo do tempo.

Temperaturas: D1 dia: 26°C / noite: 24,3°C, D2 dia: 27,7°C / noite: 25,5°C, D3 dia: 29,1°C / noite: 27,3°C, D4 dia: 31,9°C / noite: 28,5°C, D5 dia: 33,3°C / noite: 29,9°C, D7 dia: 34,7°C / noite: 31,1°C, U1 dia: 26°C / noite: 24,3°C

<i>L.vastus</i>	D1	D2	D3	D4	D5	D7	U1
Osmolalidade (mmol/L)	296.25 ± 58.74	267.5 ± 7.51	315.33 ± 23.01	302 ± 7.87	304.5 ± 17.21	294.75 ± 20.43	306.5 ± 52.32
Volume urina (ml)	NA	NA	25.88 ± 32.41	23.45 ± 27.94	15.75 ± 12.61	6.98 ± 13.35	17.5 ± 12.87
Ureia (mmol/L)	5.84 ± 3.19	3.53 ± 2.23	9.2 ± 2.43	4.6 ± 1.24	4.51 ± 0.67	5.65 ± 4.89	6.01 ± 3.49
Potássio (mmol/L)	3.5 ± 0.42	3.28 ± 0.49	3.35 ± 0.49	3.7 ± 0.08	4.6 ± 0.57	4.3 ± 0.35	3.6 ± 0.36
Cloretos (mmol/L)	95.65 ± 30.93	86.23 ± 10.21	84.06 ± 10.94	85.14 ± 7.43	83.7 ± 5.47	72.83 ± 11.86	83.7 ± 18
Sódio (mmol/L)	105.5 ± 3.54	111.75 ± 6.7	109 ± 8.49	111 ± 6.53	112.5 ± 11.73	102.33 ± 2.52	107.67 ± 10.07
Peso (g)	166.41 ± 52.95	168.96 ± 57.21	165.7 ± 57.57	166.56 ± 56.37	161.4 ± 54.25	154.09 ± 49.63	161.45 ± 51.05
<i>R. diptycha</i>							
Osmolalidade (mmol/L)	273 ± 15.25	285.25 ± 31.53	307.25 ± 24.17	320.25 ± 35.11	324.5 ± 32.18	313.5 ± 18.38	289.67 ± 25.03
Volume urina (ml)	NA						
Ureia (mmol/L)	11.3 ± 2.77	12.5 ± 4.58	10.86 ± 1.95	12.22 ± 2.1	8.98 ± 5.85	13.15 ± 2.2	15.31 ± 1.27
Potássio (mmol/L)	3.9 ± 0.54	3.33 ± 0.55	3.88 ± 0.39	3.73 ± 0.21	3.95 ± 0.21	3.93 ± 0.33	3.33 ± 0.12
Cloretos (mmol/L)	89.49 ± 8.31	91.67 ± 12.26	86.96 ± 7.76	86.59 ± 11.5	84.78 ± 13.72	84.06 ± 6.8	85.51 ± 2.51
Sódio (mmol/L)	110.75 ± 9.03	108 ± 2	107.75 ± 6.55	104.33 ± 7.57	104.5 ± 0.71	106 ± 6.38	99.67 ± 3.06
Peso (g)	389.73 ± 159.16	391.39 ± 170.07	409.74 ± 192.92	429.16 ± 210.22	369.58 ± 175.61	376.44 ± 174.35	416.88 ± 155.18

Figura 3. Gráficos de média e desvios padrão da osmolalidade do plasma e seus respectivos componentes. Cada ponto é um indivíduo.

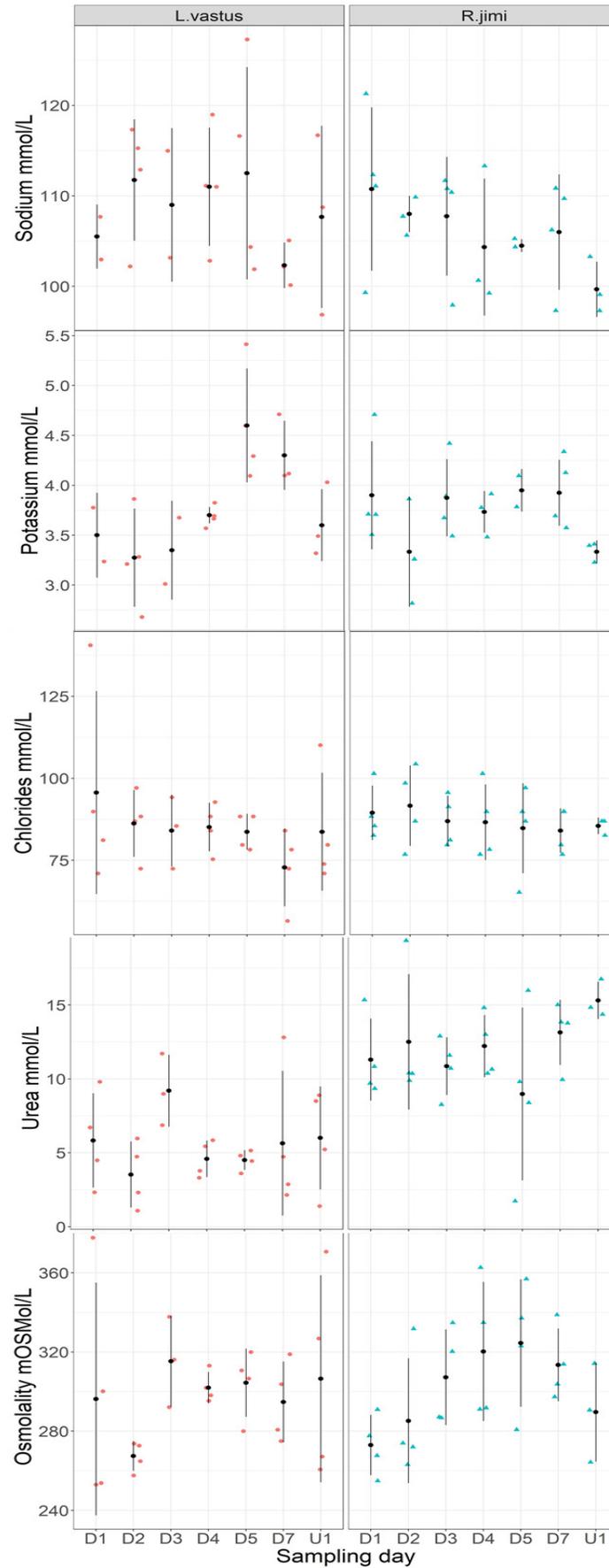
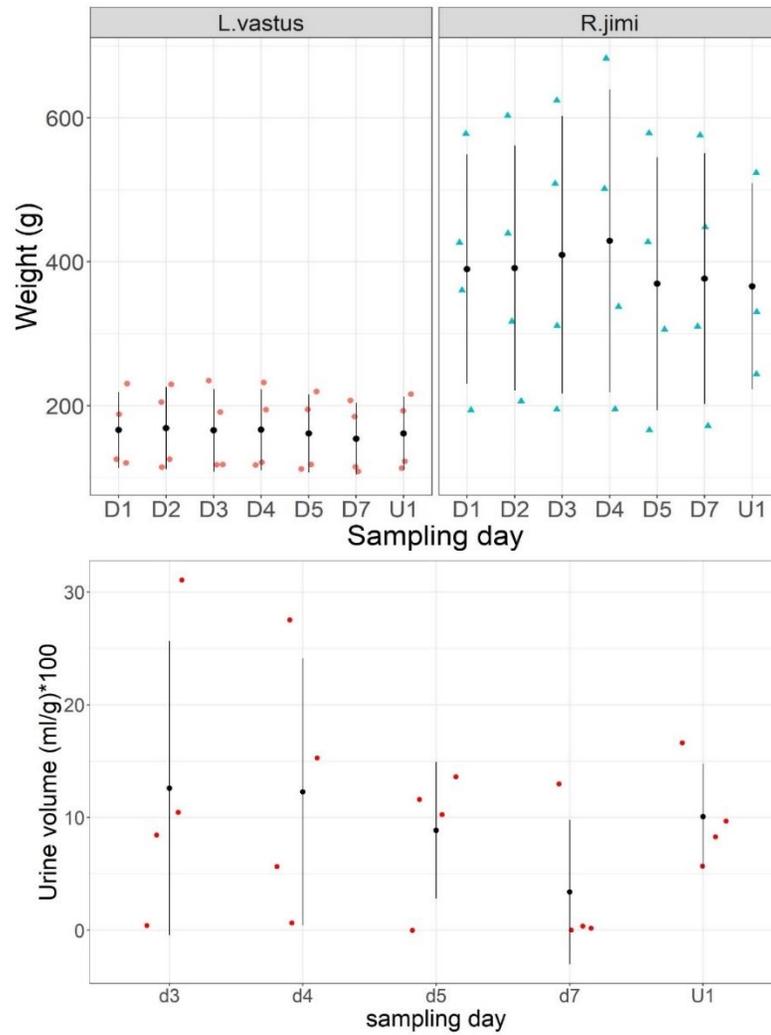


Figura 4. Média e desvio padrão de peso e volume de urina ao longo do tempo. *R. diptycha* não apresentou urina ao longo do experimento. Cada ponto é um indivíduo.



## 2. Estado geral e situação de coleta – Recém-captura - experimento definitivo

Após a coleta os 15 indivíduos de *R. diptycha* e 14 indivíduos de *L. labyrinthicus* foram mantidos em período de quarentena, pois, principalmente para *R. diptycha*, eles foram encontrados visivelmente debilitados (magros). Então, na tentativa de garantir que todos os indivíduos estivessem em uma situação nutricional e hídrica semelhante, para o início da experimentação, eles foram alimentados a cada 2 dias, e a água era repostada ou trocada todos os dias. No período de coleta a média de peso (g) dos indivíduos de *R. diptycha* foi de 234,3 g e para *L. labyrinthicus* 334,7 g. Após o período de quarentena o peso foi de 249,1g para *R. diptycha*, equivalente a 11.2% de ganho de peso em média e para *L. labyrinthicus* o peso pós quarentena foi de 306,1 g, equivalente a 11% de perda de peso em média. Como os indivíduos possuíam tamanhos corpóreos diferentes o peso de coleta (CL) foi padronizado pela área superficial, o que facilita comparações futuras (Tabela 2). Para *R. diptycha* a média de peso padronizado foi 0,825 g/cm<sup>2</sup>, e para *L. labyrinthicus* 0,76 g/cm<sup>2</sup>.

A faixa de temperatura do ar encontrada nos locais de coleta foi de 19,9 a 26°C e a de umidade relativa do ar foi de 74 a 87%. Os indivíduos de *L. labyrinthicus* foram sempre encontrados seguindo-se atividade de vocalização, dentro ou nas margens dos corpos de água. *R. diptycha* foi encontrado dentro dos corpos de água, nas suas margens, ou se deslocando em áreas que não possuíam água nas proximidades. Em sua maioria os indivíduos de *R. diptycha* não foram encontrados vocalizando. Não foi medida a temperatura dos indivíduos no local de coleta, pois ao chegarmos próximos eles já tentavam escapar, então a captura tinha de ser rápida. Também não houve coleta de urina, pois os indivíduos como modo de defesa urinavam no momento exato da captura.

Com o sangue retirado na coleta podemos determinar a osmolalidade e as concentrações de osmólito ureia e íons monovalentes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) no plasma em situação de recém-captura para cada espécie (objetivo específico 1, Tabela 2). Para *L. labyrinthicus* a média da osmolalidade encontrada foi de 264,38 (mOsmol/kg), as médias das concentrações de cloretos foram 41,09 (mmol/l), de sódio 140,60 (mmol/l), de potássio 1,06 (mmol/l), e de ureia 4,70 (mmol/l). Para *R. diptycha* a média da osmolalidade encontrada foi 262,5 (mOsmol/kg), as médias das concentrações de cloretos foram 40,93 (mmol/l), de sódio 126,8 (mmol/l), de potássio 0,75 (mmol/l), e ureia 8,70 (mmol/l).

Tabela 2. Variáveis na recém-captura. Média e desvio padrão das variáveis resposta peso e parâmetros sanguíneos osmorregulatórios (osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia) recém-captura no plasma dos indivíduos das espécies *L. labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*.

Medida de recém captura	Plasma = Variáveis respostas MD±SD						
	Espécies	Peso (g/cm <sup>2</sup> )	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Ureia (mmol/l)
<i>L. labyrinthicus</i>	0,825 ± 0,129	264,38 ± 12,99	41,09±16,74	140,60±21,50	1,06±0,92	4,70±3,15	14
<i>R. diptycha</i>	0,76±0,15	262,5±26,2	40,93±16,01	126,80±30,36	0,75±0,85	8,70±6,72	15

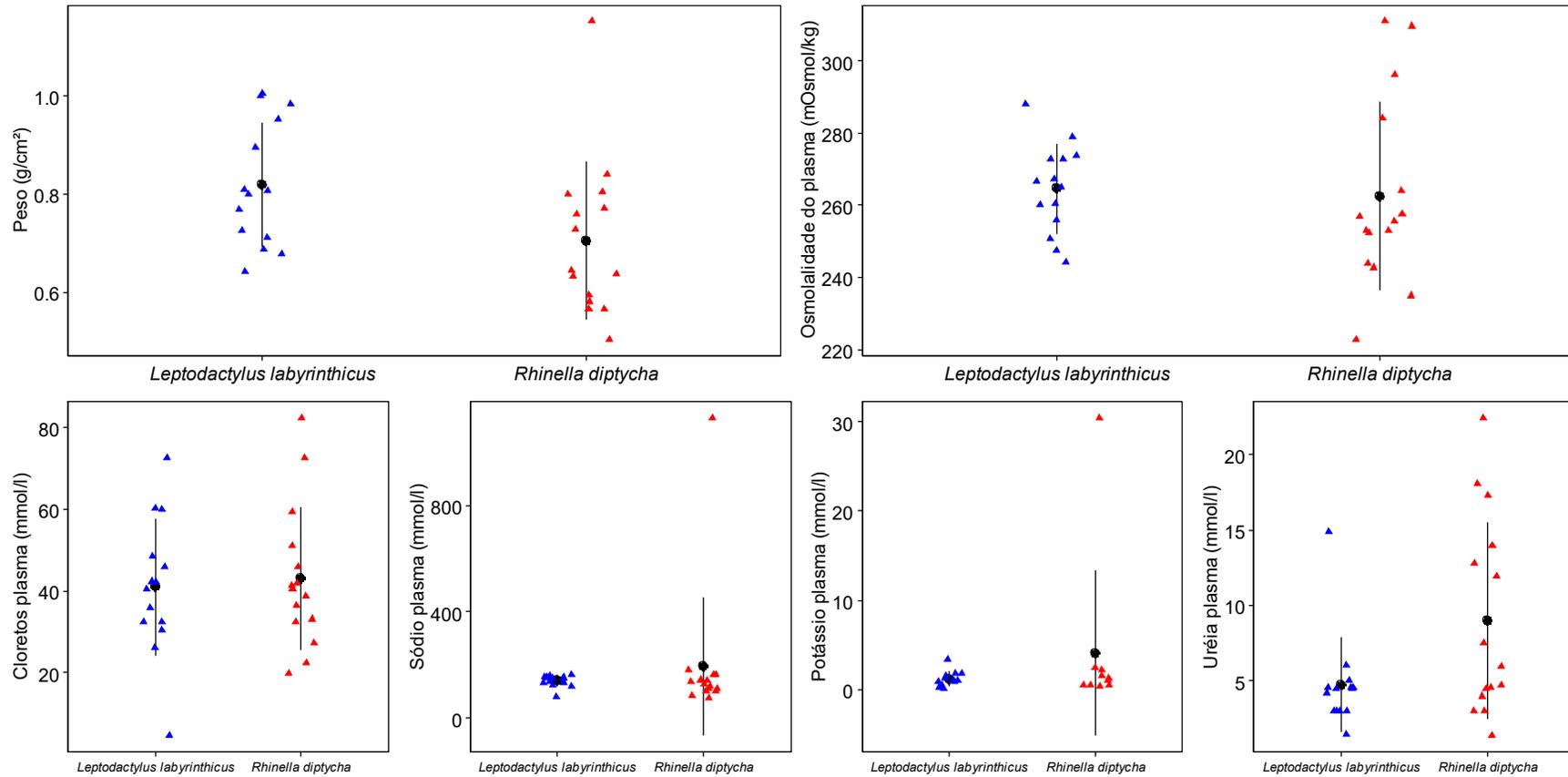
Uma forma de melhor visualizar e entender a relação dos indivíduos e as variáveis respostas para recém-captura é através do gráfico de média, desvio padrão e dispersão dos indivíduos (Figura 5). Ambas as espécies apresentaram considerável variação individual no Peso padronizado pela área superficial (Peso (g/cm<sup>2</sup>)). Ao compararmos visualmente as duas espécies, observamos que *R. diptycha* tem uma relação peso/área menor, sugerindo um estado debilitado de magreza na recém-captura, pois os indivíduos dessa espécie geralmente possuem tamanho corporal maior que *L. labyrinthicus*. Também vale ressaltar que *L. labyrinthicus* é uma espécie de anuro de hábito mais aquático, e foi encontrada, neste projeto, sempre próxima a um corpo de água, como dito anteriormente. Isto implica que os indivíduos estavam sempre hidratados, o que também pode estar refletido nos valores individuais de osmolalidade do plasma para esta espécie, pois há pouca variação em torno da média desta variável. Já para de *R. diptycha*, a variação individual da osmolalidade do plasma foi alta, evidenciada por um desvio padrão acentuado. As médias de osmolalidade do plasma para as duas espécies estão em uma faixa semelhante de valores (Tabela 2).

Quando olhamos especificamente para os componentes da osmolalidade estudados neste projeto (Figura 5), percebemos quem cloretos e ureia no plasma tem maior influência na variação das medidas da osmolalidade para *R. diptycha*, e para *L. labyrinthicus* a concentração de cloretos é a mais importante. Também podemos observar que as concentrações de sódio e potássio são baixas e, portanto, contribuem menos na relação da osmolalidade, além de apresentarem menor variação individual para os indivíduos das duas espécies.

As duas espécies apresentam, de forma geral, padrões semelhantes nas médias e dispersão das variáveis respostas de recém captura. Apenas peso e ureia apresentam diferenças.

Figura 5. Gráficos de média, desvio padrão e dispersão dos indivíduos na recém-captura.

Média (bola preta), desvio padrão (barra vertical) e valores individuais (triângulos) das variáveis resposta peso e parâmetros sanguíneos osmorregulatórios (osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia) recém-captura no plasma dos indivíduos das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* (n=14) e *Rhinella diptycha* (n= 15).



### 3. Experimento variação gradual da temperatura.

#### 3.1. Aspectos gerais do experimento

Como dito no material e métodos, este experimento (grupo tratamento = indivíduos dentro da câmara climática) consistiu em um aumento gradual da temperatura, até a temperatura de 40° C, e os indivíduos continuavam sendo alimentados e foi deixada água livre a disposição. Já os indivíduos do grupo controle foram mantidos em sala separada, com temperatura ambiente, também foram alimentados e tinham água livre a disposição.

Para *Leptodactylus labyrinthicus* o processo de manutenção tratamento e controle parece não ter afetado drasticamente seu estado geral, pois apenas um indivíduo (grupo tratamento) morreu ao longo do tempo do experimento. Na maioria das vezes, os indivíduos se alimentavam livremente sem nenhum estímulo a mais, como mexer abruptamente o alimento ou conter os indivíduos para alimentação forçada. Para *Rhinella diptycha* o processo de manutenção dos grupos tratamento e controle parece ter sido estressante, pois os indivíduos trocavam constantemente de pele, e 3 indivíduos do grupo controle e 2 do grupo tratamento morreram ao longo do processo. No grupo controle de *Rhinella diptycha* houve uma infestação de larvas de mosca na pele dos indivíduos que eram removidas assim que detectadas. Os indivíduos do grupo controle de *R. diptycha* não aceitavam o alimento e para os dois grupos desta espécie, era na maioria das vezes necessária a contenção para alimentação forçada.

As médias, desvio padrão, testes de premissas e análises estatísticas das variáveis respostas peso, hematócrito, osmolalidade do plasma e concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia estudadas para *L. labyrinthicus* encontram-se em detalhes nas tabelas 3 e 4, e para *R. diptycha* encontram-se em detalhes nas tabelas 5 e 6. Quando não houver grupo controle e indivíduos faltantes no grupo tratamento da variável, significa que algum indivíduo morreu ao longo do experimento, e assim não foi possível fazer medidas em todos os níveis de tratamentos experimentais; ou que não foi possível retirar o sangue ou urina em todos os níveis de tratamentos experimentais; ou a medida foi retirada da análise por ser um *outlier* extremo (método de análise de *outlier* descrito nos materiais e métodos).

### 3.2. Variável resposta: Peso padronizado pela área superficial

O objetivo era identificar se o peso muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados em campo e no experimento.

Para os indivíduos de *L. labyrinthicus* do grupo Tratamento houve uma diminuição nas médias ao longo do aumento de temperatura (Tabela 3). A média de peso encontrada na recém-captura foi de 0,87 g/cm<sup>2</sup> e a média do primeiro dia do experimento (XP1) foi de 0,85 g/cm<sup>2</sup>, indicando a semelhança do estado dos indivíduos nestes dois pontos de medida (CL e XP1). Ao longo do tratamento as médias vão diminuindo chegando no último nível de tratamento (XP6) a 0,73 g/cm<sup>2</sup>. Após o tempo de recuperação pós-experimento (URC1), em que os animais foram mantidos na mesma temperatura do nível de tratamento XP1, houve um leve aumento no valor da média.

Na comparação estatística entre os níveis de tratamento (Trat vs Trat - detalhes de valores na Tabela 4) a ANOVA de medidas repetidas indicou diferença significativa, ou seja, influência da variável preditora temperatura (valor de  $p = 3.301e-07$ ). Quando comparado nível a nível via teste de Tukey, houve diferença estatística entre os níveis: Recém-captura (CL) foi diferente de XP2, XP4, XP5, XP6, e URC1, evidenciando assim a diminuição do peso ao longo do tratamento; XP1 foi diferente de XP4, XP5, XP6 e URC1, como dito anteriormente CL e XP1 são níveis semelhantes; XP6 foi diferente de XP1, XP2, XP3 evidenciando assim que possivelmente a diminuição significativa seja a partir de XP4, onde a temperatura alta diurna é de 34°C, pois não houve diferença significativa entre este nível e os seguintes.

Para os indivíduos de *L. labyrinthicus* do grupo Controle (Cont vs Cont - detalhes de valores na Tabela 4.) houve uma estabilidade geral nas médias, apesar de um decaimento nos primeiros níveis de tratamento. Vale ressaltar que esse grupo não sofreu manipulação da variável preditora temperatura e que eles também passavam pelo mesmo processo de alimentação, contenção para coleta de sangue e urina, e limpeza dos recintos individuais e da sala, da mesma forma que o grupo Tratamento. A ANOVA de medidas repetidas indicou diferença significativa (valor de  $p = 0.01$ ). Quando comparado nível a nível via teste de Tukey houve diferença estatística entre os níveis de Recém-captura (CL) e XP1, XP2, XP3 e XP4. Os valores das médias de peso (Tabela 3.) foram diminuindo, para CL foi 0,69 g/cm<sup>2</sup> e para XP4 a média foi 0,66 g/cm<sup>2</sup>, nos próximos níveis de tratamento as médias se mantiveram estáveis nessa mesma faixa de medida.

Na comparação estatística entre os grupo Tratamento e Controle de cada nível (Trat vs Cont - detalhes de valores na Tabela 4), o teste-t pareado encontrou diferença significativa nos níveis de

tratamento CL, XP1, XP2, XP3 e XP4. Apesar das médias dos grupos XP5, XP6 e URC1 serem diferentes não foi encontrada diferença estatística devido possivelmente a sobreposição dos desvios padrão entre grupo Tratamento e o grupo Controle.

Para a espécie *R. diptycha* houve apenas comparações entre grupo Tratamento, pois como dito anteriormente houve morte dos indivíduos do grupo Controle. Para o grupo Tratamento houve aumento da média do peso (Tabela 5) do nível CL de 0,66 g/cm<sup>2</sup> para o nível de tratamento XP1 de 0,74 g/cm<sup>2</sup>, o que era esperado já que os indivíduos se encontravam debilitados na recém-captura e passaram por período de alimentação pré-experimento como explicado no material e métodos. Para os outros níveis de tratamento houve diminuição da média do peso chegando no XP6 a 0,59 g/cm<sup>2</sup> e quando o grupo foi transferido para o período de recuperação (URC1), em que os animais foram mantidos a mesma temperatura do nível de tratamento XP1, houve um leve aumento no valor da média do peso chegando a 0,63 g/cm<sup>2</sup>. Apesar do desvio padrão ter sido alto, foi encontrada pela ANOVA de medidas repetidas (valor de  $p = 1.245e-06$ ) diferença significativa, evidenciando a influência da temperatura na resposta do peso (Trat vs Trat - detalhes de valores na Tabela 6). Quando comparado nível a nível via teste de Tukey, houve diferença estatisticamente significativa entre XP1 e XP4, XP5, XP6 e URC1; Entre XP2 e XP4, XP5 e XP6; e entre XP6 e XP1, XP2 e XP3. Evidenciando assim que possivelmente a diminuição significativa seja a partir de XP4, onde a temperatura alta diurna era de 34°C, pois nos níveis anteriores não houve diferença.

Uma forma de melhor visualizar e entender a relação dos indivíduos e as variáveis respostas é através do gráfico de média, desvio padrão e dispersão dos indivíduos (Figura 6). Ambas as espécies apresentaram considerável variação individual no Peso padronizado pela área superficial (Peso (g/cm<sup>2</sup>)). Ao compararmos as duas espécies, observamos que *R. diptycha* tem uma relação peso/área menor, como sugerido anteriormente. Também podemos observar para as duas espécies no grupo Tratamento a tendência de diminuição de peso, apesar da alta variação individual. Para o grupo Controle de *L. labyrinthicus* conseguimos observar uma queda de CL para XP1, mas também observamos a estabilidade dos níveis subsequentes, e identificamos visualmente que há uma diferença entre as médias do grupo Controle e Tratamento, corroborando a hipótese de que a temperatura foi o fator que influenciou a perda de Peso.

### 3.3. Variável resposta: Hematócrito

O objetivo era identificar se a concentração do hematócrito muda em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados no experimento. Para ambas as espécies as médias estavam dentro da faixa esperada para vertebrados (Tabela 3 para *L. labyrinthicus* e Tabela 5 para *R. diptycha*). Além disso, não houve diferença significativa para ambos os grupos Tratamento (Trat vs Trat - detalhes de valores na Tabela 4 para *L. labyrinthicus* e Tabela 6 para *R. diptycha*). Já para *L. labyrinthicus* houve diferença significativa entre grupo Controle e grupo Tratamento (Trat vs Cont - detalhes de valores na Tabela 4), o teste-t pareado encontrou diferença significativa nos níveis de tratamento XP3, XP4 e XP6. Isso pode ser devido ao alto desvio padrão no XP4 no grupo controle (Figura 7).

De forma geral esta variável respondeu de acordo com o esperado, e uma retirada de 0.5 ml de sangue não influenciou significativamente na recomposição do sangue.

### 3.4. Variável resposta: osmolalidade e concentrações de ureia e eletrólitos (cloretos, sódio, potássio) no plasma

O objetivo era identificar se a osmolalidade e as concentrações de ureia e eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) no plasma mudam em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando os padrões encontrados em campo e no experimento. Para *L. labyrinthicus* houve aumento na média da osmolalidade (Tabela 3) de CL 262,28 (mOsmol/kg) XP1 285,71 (mOsmol/kg) para ambos os grupos, Tratamento e Controle. Também houve uma diminuição das médias ao longo dos níveis experimentais, chegando ao mínimo para grupo tratamento de 251,57 (mOsmol/kg) no nível XP6. Para o grupo Controle houve uma queda seguida de estabilidade a partir do nível de tratamento XP4.

Na comparação estatística entre os níveis de tratamento (Trat vs Trat - detalhes de valores na Tabela 4) o GLMM indicou diferença significativa, ou seja, influência da variável preditora temperatura (valor de  $p = 1.658e-08$ ). Quando comparado nível a nível via teste de Tukey, houve diferença estatística entre os níveis: medida de recuperação pós-experimento (URC1) foi diferente de CL, XP1, XP2, XP3, XP4, XP5 e XP6, evidenciando assim a diminuição da osmolalidade ao longo do tratamento, assim como XP1 ter sido diferente de XP6 é evidência dessa diminuição. Apesar de ter dado diferença estatística na comparação entre os grupo Controle e Controle de cada

nível (Cont vs Cont - detalhes de valores na Tabela 4), o GLMM com valor de  $p=0.03$ , o teste de Tukey não detectou diferença par a par e isso pode ser devido ao alto desvio padrão.

Para *L. labyrinthicus* houve diferença significativa entre grupo Controle e grupo Tratamento (Trat vs Cont - detalhes de valores na Tabela 4.), o teste-t pareado encontrou diferença significativa nos níveis de tratamento XP5 e URC1. Isso pode ser devido ao alto desvio padrão no grupo tratamento continuar diminuindo a média da osmolalidade e o grupo controle manter essas medias, evidenciando o efeito da temperatura no grupo Tratamento (Figura 8).

Para *R. diptycha* não foi encontrado diferença estatística para Osmolalidade do grupo Tratamento (Tabela 6). Isso pode ter ocorrido pela alta variação individual evidenciada pelo desvio padrão em cada nível (Figura 8)

Para *L. labyrinthicus*, foi encontrada diferença significativa para cloretos e ureia (Tabela 4). Não houve um padrão claro de aumento ou diminuição consistente das concentrações destas variáveis, elas flutuaram ao longo do experimento (Figura 8). Tanto ureia quanto cloretos apresentaram um aumento no primeiro dia de experimento (XP1), quando comparado com os valores recém-captura (CL). Ureia apresentou uma diferença significativa entre os grupos Tratamento e Controle, evidenciando um efeito do aumento gradual de temperatura. Sódio não apresentou efeito significativo do experimento de aumento gradual de temperatura, enquanto potássio apresentou efeito significativo (Tabela 4), porém este efeito aparenta ter sido causado por um aumento súbito no valor deste parâmetro no nível XP3, que não se manteve nos níveis seguintes (Figura 8). Isto indica que este aumento súbito provavelmente não foi uma resposta fisiológica ao experimento de aumento de temperatura.

Para *R. diptycha*, o mesmo padrão encontrado em *L. labyrinthicus* se repetiu (Tabela 5 e 6 e Figura 8). Cloretos e ureia apresentaram flutuação significativa ao longo experimento, resultando em diferença estatisticamente significativa para estas variáveis (Tabela 6). Ureia apresentou um aumento no primeiro dia de experimento (XP1) comparado com o parâmetro medido no recém - captura (CL). Potássio também apresentou o padrão de aumento súbito da concentração no nível XP3, que não foi mantido nos níveis subsequentes (Figura 8), assim a significância estatística encontrada para este parâmetro parece ser resultado deste aumento súbito. Sódio não apresentou efeito significativo do experimento de aumento de temperatura.

Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis resposta: peso, hematócrito, osmolalidade, concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia no plasma dos indivíduos da espécie *L. labyrinthicus* no experimento de aumento gradual da temperatura.

O tamanho amostral de cada variável é apresentado ao final da tabela. *Grupo tratamento* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1= dia e noite 25°C). *Grupo controle* se refere aos indivíduos mantidos em sala separada, sob variação ambiente da temperatura. *CL* se refere às medidas de recém-captura.

<i>L. labyrinthicus</i>		Plasma = Variáveis resposta MD±SD						
Variável preditora	Grupo indivíduos	Peso (g/cm <sup>2</sup> )	Hematócrito (%)	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Ureia (mmol/l)
CL	tratamento	0,87±0,11	-	262,28±13,03	45,45±13,13	147,8±15,11	1,36±1,09	4,12±0,79
	controle	0,69±0,06	-	264,25±10,75	45,82±16,55	136±11,4	0,8±0,78	5,8±6,1
XP1	tratamento	0,85±0,12	36,5±6,4	285,71±18,17	41,86±10,68	152,2±18,20	1,29±0,86	19,25±11,4
	controle	0,62±0,05	35,7±6,4	283,75±11,98	43,80±12,24	152,6±10,2	0,8±0,53	10,62±9,2
XP2	tratamento	0,80±0,09	39,8±6,8	278,57±20,48	19,33±4,29	148,7±2,37	0,92±0,4	16,8±7,8
	controle	0,64±0,05	35,1±6,5	276,25±14,88	21,40±6,34	147±9,9	1±0,63	5,3±3,4
XP3	tratamento	0,82±0,08	36,7±4,6	267,4±23,35	60,68±12,96	136,5±5,74	3,44±1,19	7,2±5,9
	controle	0,64±0,04	28,3±1,7	258±16,75	65,60±10,02	117,7±30,9	3,5±0,94	2,6±0,5
XP4	tratamento	0,78±0,08	38,5±4,5	264,1±16,29	32,82±9,44	142,6±14,9	1,42±0,69	7,2±2,24
	controle	0,66±0,04	25,2±7,3	258±34,82	38±17,26	133±6	1,5±0,89	3,4±1,4
XP5	tratamento	0,75±0,06	34±4,1	264,8±7,47	20,53±4,79	144,2±5,5	1,18±0,21	7,08±1,9
	controle	0,65±0,04	28,3±4,4	253,50±4,04	35,30±12,13	133,6±8,4	1,9±0,63	1,9±0,9
XP6	tratamento	0,73±0,06	39±5,1	251,57±20,33	33,59±6,31	151,8±16,1	0,95±0,8	8,7±5,02
	controle	0,65±0,03	27,3±2,7	250,25±13,8	43,30±15,27	145,9±26,8	2,1±0,29	2,3±0,8
URC1	tratamento	0,78±0,05	37,1±5,4	231,85±5,04	46,34±5,12	154,2±17,5	1,69±0,44	5,8±2,40
	controle	0,68±0,04	31,8±3,6	253,25±10,43	48,90±5,40	157,8±22,5	1,5±0,31	4,6±0,76
Nº amostral	tratamento	8	6	7	7	7	7	7
	controle	4	4	4	4	4	4	4

Tabela 4. Resumo das análises estatísticas (variáveis repostas: Peso, hematócrito, e osmolalidade, cloretos, sódio, potássio e ureia do plasma, entre os grupos de *L. labyrinthicus* e seus respectivos testes de premissas.

Trat vs Trat / Cont vs Cont = comparação do mesmo grupo de indivíduos entre níveis de tratamento; Trat vs Cont = comparação, dos indivíduos da câmara climática com os indivíduos da sala controle, entre níveis de tratamento. *Trat* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1= dia e noite 25°C). *Cont* se refere aos indivíduos mantidos em sala separada sob variação ambiente da temperatura.

<i>L. labyrinthicus</i>		Plasma = Variáveis repostas						
Comparação entre grupos	Teste estatístico	Peso (g)	Hematócrito (%)	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Ureia (mmol/l)
Trat vs Trat Cont vs Cont	Shapiro-Wilk	normal	normal	normal	normal	Não normal	Não normal	Não normal
Trat vs Trat Cont vs Cont	Levene's	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Não Homogêneo
Trat vs Trat Cont vs Cont	ANOVA medidas repetidas	Significativo: Trat = 3.301e-07 Cont = 0.01	Não Significativo Cont = 0.056	-	-	-	-	-
Trat vs Trat Cont vs Cont	GLMM	-	-	Significativo Trat = 1.658e-08 Cont = 0.03	Significativo Trat = 2.2e-16 Cont = 0.0002	Significativo Cont = 0.02	Significativo Trat = 3.487e-08 Cont = 2.106e-09	Significativo Trat = 1.261e-08
Trat vs Trat Cont vs Cont	Tukey	Trat= XP2 - CL = 0.02 XP4 - CL = <0.01 XP5 - CL = <0.01 XP6 - CL = <0.01 URC1 - CL = <0.01 XP4 - XP1 = 0.03 XP5 - XP1 = <0.01 XP6 - XP1 = <0.01 URC1 - XP1 = 0.02 XP6 - XP2 = 0.04 XP6 - XP3 = <0.01 Cont = XP1 - CL = < 0.001 XP2 - CL = 0.006 XP3 - CL = 0.01 XP4 - CL = 0.005	-	Trat= CL - URC1 = 0.02 URC1 - XP1 = 0.0001 URC1 - XP2 = 0.0001 URC1 - XP3 = 0.004 URC1 - XP4 = 0.01 URC1 - XP5 = 0.01 XP1 - XP6 = 0.007	Trat= CL - XP2 = 0.0005 CL - XP5 = 0.0005 URC1 - XP2 = 0.0003 URC1 - XP5 = 0.0003 XP1 - XP2 = 0.005 XP1 - XP3 = 0.01 XP1 - XP5 = 0.006 XP2 - XP3 = 0.0001 XP3 - XP4 = 0.0001 XP3 - XP5 = 0.0001 XP3 - XP6 = 0.0001 Cont = XP2 - XP3 = 0.0014 XP3 - XP5 = 0.0457	Cont = XP3 - URC1 = 0.05	Trat= XP3 - XP6 = 0.0001 XP3 - URC1 = 0.005 XP3 - XP4 = 0.0009 XP3 - XP5 = 0.0003 XP3 - XP2 = 0.0001 XP3 - XP1 = 0.0006 XP3 - CL = 0.0005 Cont = XP3 - XP4 = 0.006 XP3 - XP5 = 0.02 XP3 - XP2 = 0.0003 XP3 - XP1 = 0.0001 XP3 - CL = 0.0002	Trat= CL - XP1 = 0.0001 CL - XP2 = 0.001 XP1 - XP3 = 0.003 XP1 - XP4 = 0.003 XP1 - XP5 = 0.004 XP1 - XP6 = 0.01 XP1 - URC1 = 0.0008 XP2 - XP3 = 0.02 XP2 - XP4 = 0.02 XP2 - XP5 = 0.03 XP2 - URC1 = 0.008
Trat vs Cont	Teste t pareado	CL - 0.2 XP1 - 0.007 XP2 - 0.02 XP3 - 0.02 XP4 - 0.04	XP3 - 0,01 XP4 - 0,02 XP6 - 0,004	XP5 - 0,009 UCR1 - 0,01	-	-	-	-
Trat vs Cont	Mann-Whitney	-	-	-	Não Significativo	Não Significativo	XP6 - 0,04	XP2 - 0,02 XP3 - 0,02 XP4 - 0,02 XP5 - 0,01 XP6 - 0,01

Tabela 5. Média e desvio padrão das variáveis resposta: peso, hematócrito, osmolalidade, concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia no plasma dos indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* no experimento de aumento gradual da temperatura.

O tamanho amostral de cada variável é apresentado ao final da tabela. *Grupo tratamento* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1= dia e noite 25°C). *CL* se refere as medidas de recém-captura.

<i>Rhinella diptycha</i>		Plasma = Variáveis resposta MD±SD						
Variável preditora	Grupo indivíduos	Peso (g/cm <sup>2</sup> )	Hematócrito (%)	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Ureia (mmol/l)
CL	tratamento	0,66±0,11	-	255,3±14,9	52,8±16,5	128,6±21,2	0,99±0,99	9,5±6,4
XP1	tratamento	0,74±0,07	31,7±3,71	265,3±33,5	49,5±5,8	148,5±7	1±0,3	21,5±4,2
XP2	tratamento	0,71±0,14	30,5±4,88	257,5±22	17,7±6,3	132,9±7,4	1±0,3	17±6,8
XP3	tratamento	0,69±0,15	32,1±4,4	258,3±11	45,4±25,8	134,1±18,2	4,4±2,2	17,5±7
XP4	tratamento	0,63±0,11	29,2±7,8	260,1±10,9	28±5,4	140,5±6,9	1,6±0,5	18,3±4
XP5	tratamento	0,62±0,11	30,9±7,4	269,5±15,8	28,9±14,5	124±14,6	2,1±0,7	14,1±5,1
XP6	tratamento	0,59±0,11	31,7±6,6	265,3±12,9	35,3±10,6	133±10,1	2,1±0,5	12,8±2,6
URC1	tratamento	0,63±0,13	30,4±6,9	245±22,7	46±6,8	135±15,8	2,2±0,5	18,4±8,8
Nº amostral	tratamento	8	5	6	6	6	6	6

Tabela 6. Resumo das análises estatísticas (variáveis repostas: Peso, hematócrito, Volume de Urina e osmolalidade, cloretos, sódio, potássio e ureia do plasma, entre os grupos de *Rhinella diptycha* e seus respectivos testes de premissas.

Trat vs Trat = comparação do mesmo grupo de indivíduos entre níveis de tratamento. *Trat* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1= dia e noite 25°C).

<i>Rhinella diptycha</i>		Plasma = Variáveis resposta MD±SD							
Comparação entre grupos	Teste estatístico	Volume urina (ml/g)	Peso (g)	Hematócrito (%)	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Uréia (mmol/l)
Trat vs Trat	Shapiro-Wilk	Não normal	normal	normal	normal	Não normal	normal	normal	Não normal
Trat vs Trat	Levene's	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Não Homogêneo	Homogêneo	Não Homogêneo	Homogêneo
Trat vs Trat	ANOVA medidas repetidas	-	Significativo: Trat = 1.245e-06	Não Significativo	-	-	-	-	-
Trat vs Trat	GLMM	Não Significativo Trat=0,06	-	-	Não Significativo	Significativo Trat= 0.0004	Não Significativo Trat=0,05	Significativo Trat= 5.227e-06	Significativo Trat = 0.008
Trat vs Trat	Tukey	-	Trat= XP1 - XP4 = 0.001 XP1 - XP5 = 0.0001 XP1 - XP6 = 0.0001 XP1 - URC1 = 0.002 XP2 - XP4 = 0.03 XP2 - XP5 = 0.004 XP2 - XP6 = 0.0007 XP3 - XP6 = 0.04	-	-	Trat= CL - XP2 = 0.001 CL - XP4 = 0.04 XP1 - XP2 = 0.004 XP2 - XP3 = 0.01 XP2 - URC1 = 0.01	-	Trat = CL - XP3 = 0.0001 XP1 - XP3 = 0.0001 XP2 - XP3 = 0.0001 XP3 - XP4 = 0.0003 XP3 - XP5 = 0.0048 XP3 - XP6 = 0.0053 XP3 - URC1 = 0.0087	Trat = CL - XP1 = 0.0049

Figura 6. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta peso dos indivíduos das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*, durante o período de experimento de variação gradual da temperatura. *Grupo tratamento* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°c/noite 20°c; XP2= dia 28°c/noite 23°c; XP3= dia 31°c/noite 26°c; XP4= dia 34°c/noite 29°c; XP5= dia 37°c/ noite 32°c; XP6= dia 40°c/35°c; URC1= dia e noite 25°c), *grupo controle* se refere aos indivíduos mantidos em sala separada sob a variação ambiente da temperatura e *CL* se refere as medidas obtidas na recém captura.

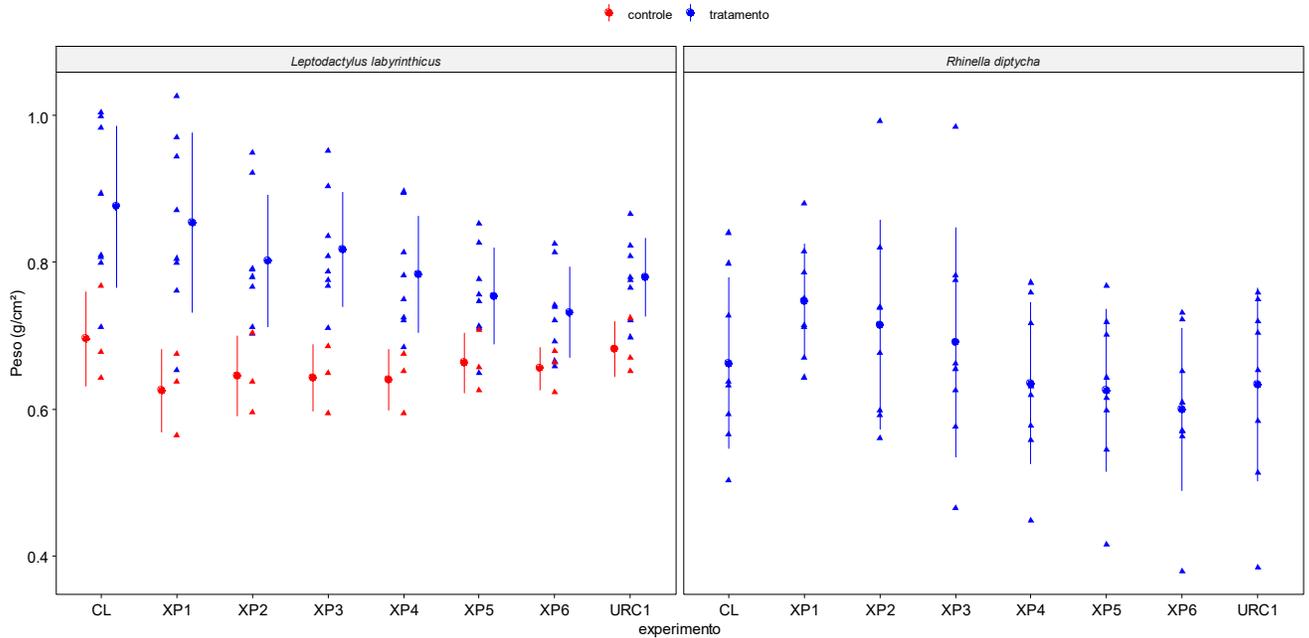


Figura 7. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta hematócrito das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*, durante o período de experimento de variação gradual da temperatura. *Grupo tratamento* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1= dia e noite 25°C). *Grupo controle* se refere aos indivíduos que foram mantidos em sala separada sob variação ambiente da temperatura

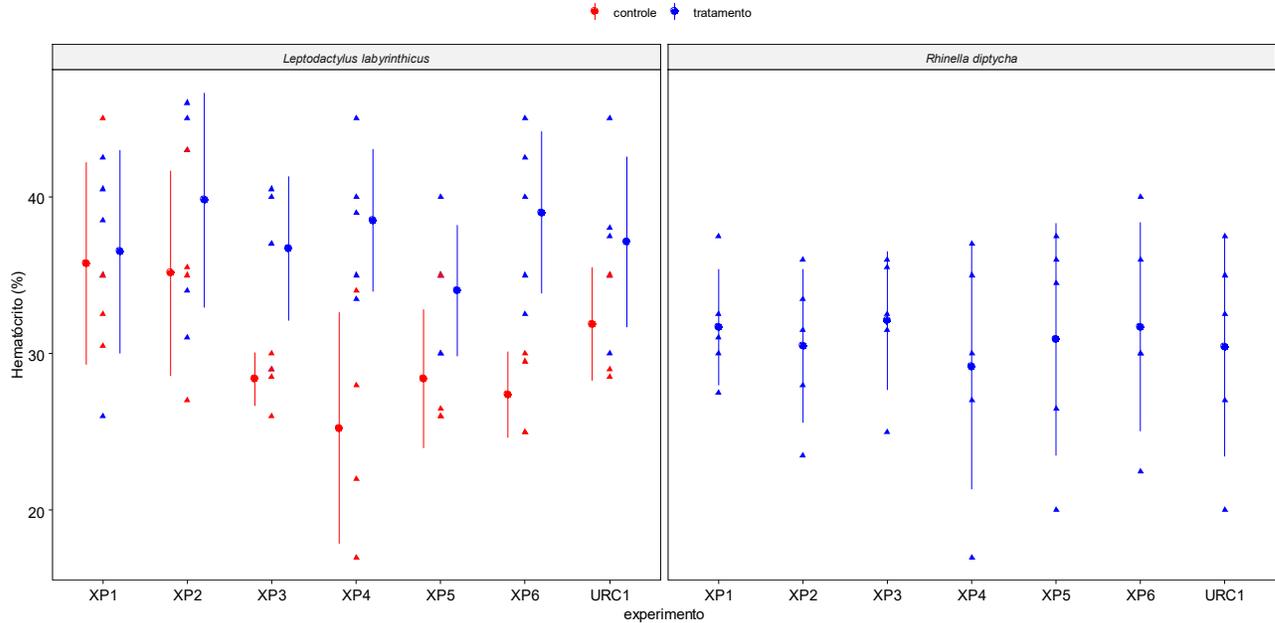
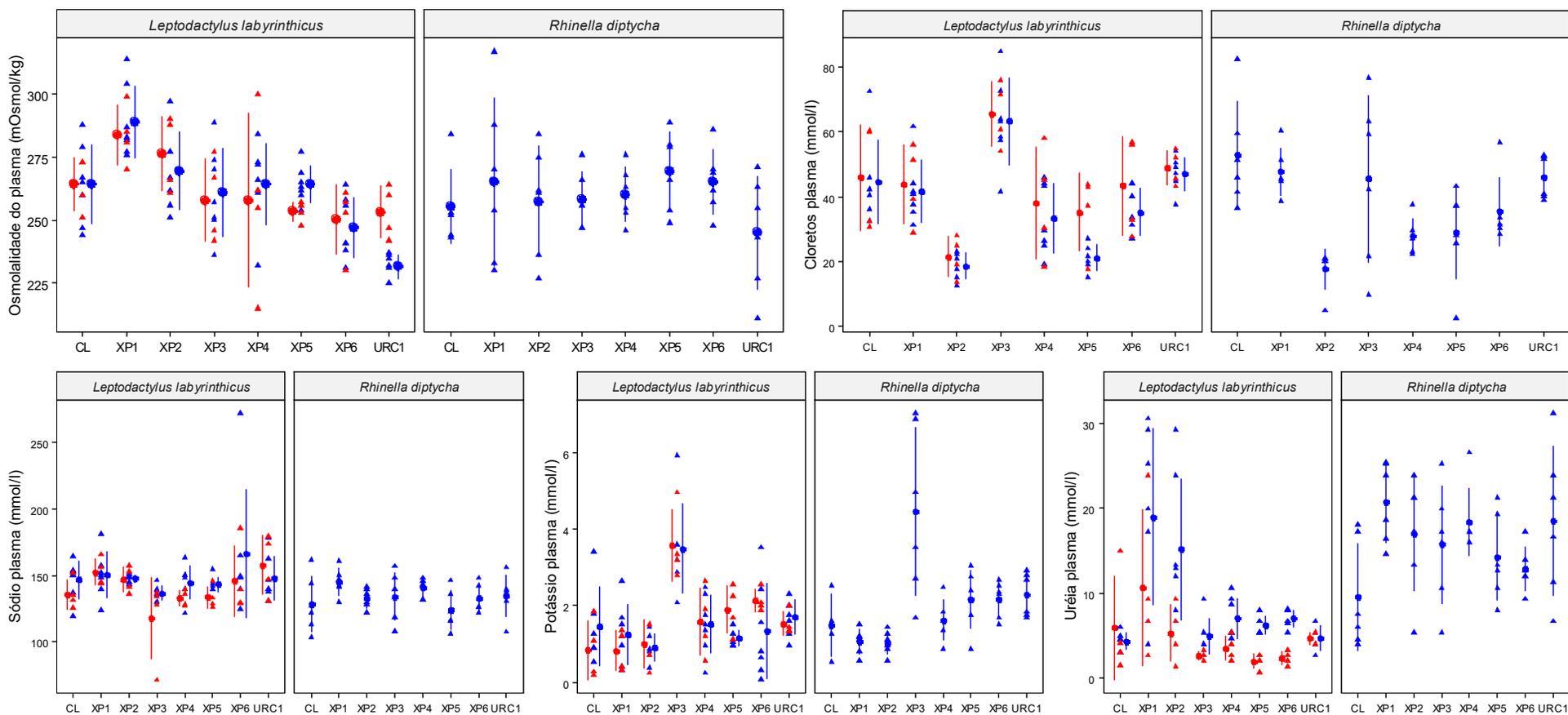


Figura 8. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) das variáveis resposta osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia no plasma dos indivíduos das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*, durante o período de experimento de variação gradual da temperatura.

*Grupo tratamento* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1= dia e noite 25°C). *Grupo controle* se refere aos indivíduos mantidos em sala separada sob variação ambiente da temperatura. CL se refere as medidas obtidas na recém-captura.

● controle ● tratamento



### 3.5. Variável resposta: osmolalidade e concentrações de ureia e eletrólitos (cloretos, sódio, potássio) na urina

O objetivo era identificar se a osmolalidade e as concentrações de ureia e eletrólitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) na urina mudam em resposta à mudança gradual de temperatura, comparando com os padrões encontrados no experimento. Em vários dias de experimento não foi possível obter urina de alguns dos indivíduos (Tabelas 7 e 8). Estes indivíduos foram removidos das análises de medidas repetidas dos parâmetros de osmolalidade, e o volume foi registrado como zero. Em *Leptodactylus labyrinthicus*, o volume de urina não foi afetado pelo experimento de aumento gradual de temperatura, não tendo sido encontrada diferença significativa (Tabela 9 e Figura 9). Osmolalidade, cloretos, sódio, potássio e ureia apresentaram variação estatisticamente significativa ao longo dos dias de experimento, comparando os níveis de tratamento entre si, porém não houve diferença entre o grupo Tratamento e o grupo Controle (Tabela 9 e Figura 10). A Osmolalidade apresentou uma queda ao longo do experimento, assim como cloretos e potássio (Figura 10). Sódio e ureia apresentaram alta variação, não sendo possível identificar uma tendência de aumento ou queda das concentrações (Figura 10).

Para *Rhinella diptycha* (Tabela 8), não foi possível realizar as análises estatísticas de medidas repetidas, devido à ausência de urina em algum momento para todos os indivíduos. Entretanto, é possível visualizar tendência de alta variação nos dados (Figura 10). Esta falta de urina é provavelmente consequência da estratégia de regulação osmótica desta espécie, que armazena e absorve água da bexiga para manter sua homeostase.

Tabela 7. Média e desvio padrão das variáveis resposta: volume de urina, osmolalidade, concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia na urina dos indivíduos da espécie *L. labyrinthicus* no experimento de aumento gradual da temperatura.

O tamanho amostral de cada variável é apresentado ao final da tabela. *Grupo tratamento* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1=dia e noite 25°C). *Grupo controle* se refere aos indivíduos mantidos em sala separada sob variação ambiente da temperatura.

<i>L. labyrinthicus</i>		Urina = Variáveis respostas MD±SD						
Variável preditora	Grupo indivíduos	Volume urina (ml/g)	Não houve urina (n°)	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Uréia (mmol/l)
XP1	tratamento	0,03±0,03	2	233,6±23,30	3,64±1,96	4,36±0,41	9,46±4,67	13,08±1,30
	controle	0,009±0,009	1	-	-	-	-	-
XP2	tratamento	0,04±0,07	1	193,5±69,26	3,40±1,43	3,24±1,63	4,31±2,58	0,72±0,63
	controle	0,03±0,03	0	-	-	-	-	-
XP3	tratamento	0,04±0,03	0	124,8±31,8	2,28±2,30	4,30±3,28	2,37±1,77	16,56±2,73
	controle	0,02±0,02	0	-	-	-	-	-
XP4	tratamento	0,02±0,01	2	44,65±19,3	0,62±0,44	8,04±0,79	0,60±0,40	5,73±0,92
	controle	0,02±0,04	3	-	-	-	-	-
XP5	tratamento	0,02±0,02	1	70,40±11,5	1,42±1,54	4,50±0,56	2,06±1,26	9,76±2,95
	controle	0,02±0,009	0	-	-	-	-	-
XP6	tratamento	0,02±0,02	1	52±5,4	0,08±0,17	2,90±1,26	0,51±0,40	5,14±0,62
	controle	0,02±0,03	1	-	-	-	-	-
URC1	tratamento	0,04±0,03	0	43,20±21,5	1,24±1,62	3,42±1,14	1,44±2,11	9,13±2,18
	controle	0,02±0,01	1	-	-	-	-	-
N° amostral	tratamento	7	-	5	5	5	5	5
	controle	4	-	-	-	-	-	-

Tabela 8. Média e desvio padrão das variáveis resposta: volume de urina, osmolalidade, concentrações de cloretos, de sódio, de potássio e de ureia na urina dos indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* no experimento de aumento gradual da temperatura.

O tamanho amostral de cada variável é apresentado ao final da tabela. *Grupo tratamento* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1=dia e noite 25°C). *Grupo controle* se refere aos indivíduos mantidos em sala separada sob variação ambiente da temperatura.

<i>Rhinella diptycha</i>		Urina = Variáveis resposta MD±SD							
Variável preditora	Grupo indivíduos	Volume urina (ml/g)	Não houve urina (n°)	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Uréia (mmol/l)	N° amostral presença urina
XP1	tratamento	0,08±0,06	2	157,6±70,1	6,1±3,1	5,9±2	6,7±3,1	13,4±3,8	8
XP2	tratamento	0,04±0,12	6	98,3±37	5,5±4	15,1±6,4	4,1±1,9	5,9±6,2	3
XP3	tratamento	0,06±0,06	3	116,6±67	1,6±1,7	3,4±3	2,9±2,7	11,4±4,2	6
XP4	tratamento	0,05±0,08	4	80,5±19,3	2,2±2	9,4±3	2,7±2,1	2,9±1,4	4
XP5	tratamento	0,07±0,10	3	133,6±65,8	4,4±2,3	8±6,4	4,8±2,9	14,07±7,5	5
XP6	tratamento	0,01±0,04	5	65±4,2	0,9±1,2	8,3±0,2	2±0,8	3,2±0,3	2
URC1	tratamento	0,01±0,03	5	103,5±30,4	5,4±1,7	4,8±1,7	4,5±2,1	14,8±5,2	2
N° amostral	tratamento	7	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 9. Resumo das análises estatísticas (variáveis repostas: Volume de Urina e osmolalidade, cloretos, sódio, potássio e ureia na urina), entre os grupos de *L. labyrinthicus* e seus respectivos testes de premissas.

Trat vs Trat = comparação do mesmo grupo de indivíduos entre níveis de tratamento; Trat vs Cont = comparação, dos indivíduos da câmara climática com os indivíduos da sala controle, entre níveis de tratamento.). *Trat* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2=dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1=dia e noite 25°C). *Cont* se refere aos indivíduos mantidos em sala separada sob variação ambiente da temperatura.

<i>L. labyrinthicus</i>		Urina = Variáveis repostas					
Comparação entre grupos	Teste estatístico	Volume urina (ml/g)	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Uréia (mmol/l)
Trat vs Trat	Shapiro-Wilk	Não normal	Não normal	Não normal	normal	normal	normal
Trat vs Trat	Levene's	Homogêneo	Não Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
Trat vs Trat	GLMM	Não significativo	Significativo Trat = 2.2e-16	Significativo Trat = 0.0006	Significativo Trat = 0.004	Significativo Trat = 6.232e-10	Significativo Trat = 2.2e-16
Trat vs Trat	Tukey	-	XP1 - XP3 = 0.0003 XP1 - XP4 = 0.0001 XP1 - XP5 = 0.0001 XP1 - XP6 = 0.0001 XP1 - URC1 = 0.0001 XP2 - XP3 = 0.03 XP2 - XP4 = 0.0001 XP2 - XP5 = 0.0001 XP2 - XP6 = 0.0001 XP2 - URC1 = 0.0001 XP3 - XP4 = 0.009 XP3 - XP6 = 0.02 XP3 - URC1 = 0.008	XP1 - XP6 = 0.01 XP1 - XP4 = 0.06 XP2 - XP6 = 0.03	XP1 - XP4 = 0.009 XP2 - XP4 = 0.0005 XP3 - XP4 = 0.007 XP5 - XP4 = 0.01 XP6 - XP4 = 0.0002 URC1 - XP4 = 0.0008	XP1 - XP2 = 0.0271 XP1 - XP3 = 0.0012 XP1 - XP4 = 0.0001 XP1 - XP5 = 0.0007 XP1 - XP6 = 0.0001 XP1 - URC1 = 0.0002	URC1 - XP1 = 0.03 URC1 - XP2 = 0.0001 URC1 - XP3 = 0.0001 URC1 - XP6 = 0.03 XP1 - XP2 = 0.0001 XP1 - XP4 = 0.0001 XP1 - XP6 = 0.0001 XP2 - XP3 = 0.0001 XP2 - XP4 = 0.004 XP2 - XP5 = 0.001 XP2 - XP6 = 0.01 XP3 - XP4 = 0.0001 XP3 - XP5 = 0.0001 XP3 - XP6 = 0.0001 XP4 - XP5 = 0.03 XP5 - XP6 = 0.01
Trat vs Cont	Mann-Whitney	Não significativo	-	-	-	-	-

Figura 9. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta Volume de urina das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*, durante o período de experimento de variação gradual da temperatura. *Grupo tratamento* se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1= dia e noite 25°C). *Grupo controle* se refere aos indivíduos mantidos em sala separada sob variação ambiente da temperatura.

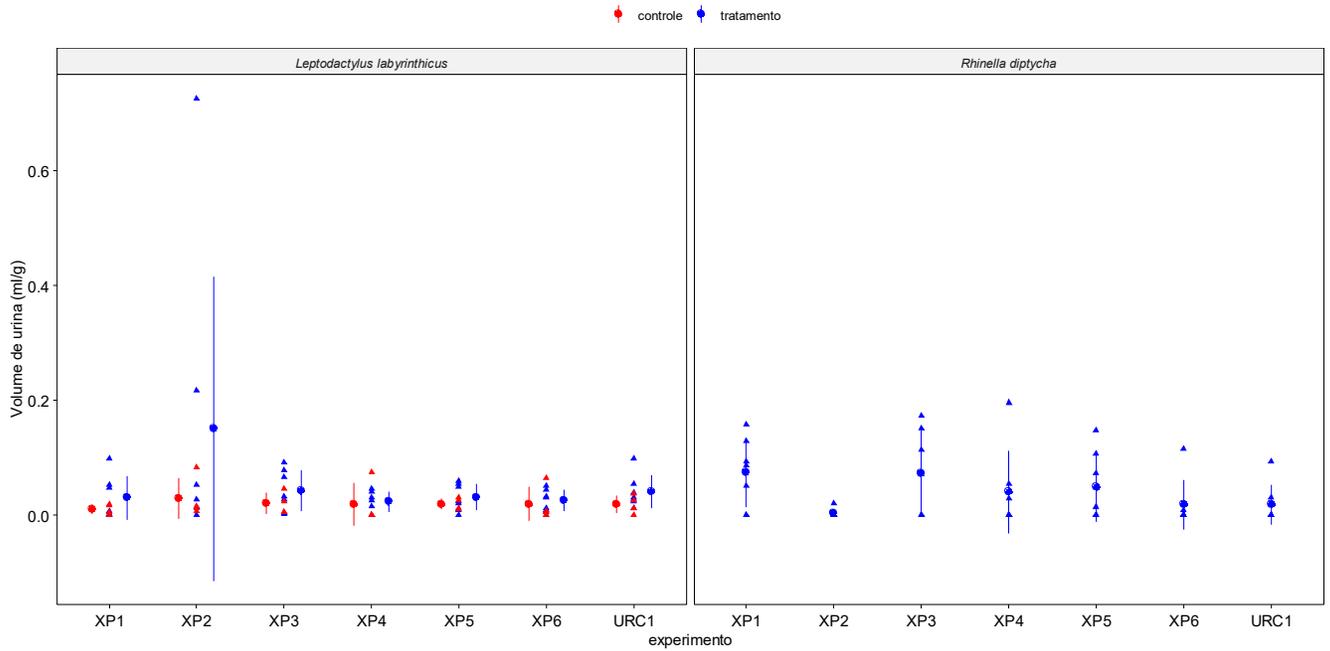
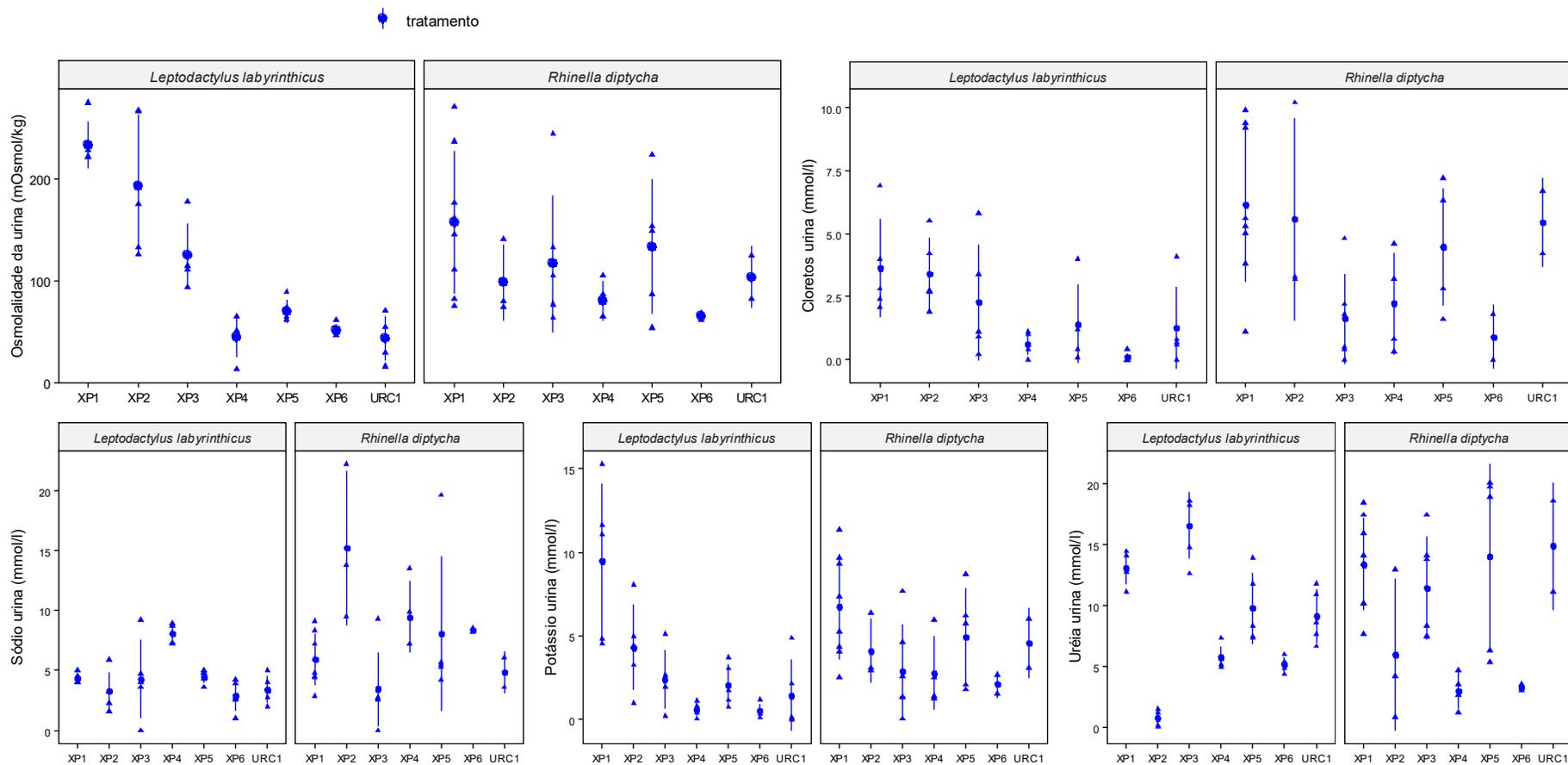


Figura 10. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) das variáveis resposta osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia na urina dos indivíduos das espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Durante o período de experimento de variação gradual da temperatura.

Grupo tratamento se refere aos indivíduos mantidos na câmara climática e submetidos a aumento de temperatura (temperaturas controladas: XP1= dia 25°C/noite 20°C; XP2= dia 28°C/noite 23°C; XP3= dia 31°C/noite 26°C; XP4= dia 34°C/noite 29°C; XP5= dia 37°C/ noite 32°C; XP6= dia 40°C/35°C; URC1= dia e noite 25°C).



#### 4. Experimento baixa de umidade do ar - *Leptodactylus labyrinthicus*

##### 4.1. Variável resposta: Peso padronizado pela área superficial

O objetivo era identificar se o peso muda em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento (URC1) ao limite de perda de 20% do peso inicial (URC2). Como esperado houve perda de peso comparando os dois níveis de tratamento URC1 0,77 g/cm<sup>2</sup> e URC2 0,60 g/cm<sup>2</sup> que também foi corroborada pelo teste-t pareado identificando diferença significativa de valor de  $p = 0,00001$  (Tabela 10, para valores detalhes de valores). O gráfico de dispersão de indivíduos (Figura 11) mostra que a variação individual, mas que mesmo assim as médias e desvios padrão não se sobrepõem, evidenciando a diferença da resposta entre os níveis de tratamento.

##### 4.2. Variável resposta: Hematócrito

O objetivo era identificar se o hematócrito muda em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento (URC1) ao limite de perda de 20% do peso inicial (URC2). Como esperado houve estabilidade na concentração do hematócrito comparando os dois níveis de tratamento URC1 34,9 % e URC2 37,8 % que também foi corroborada pelo teste-t pareado não identificando diferença significativa (Tabela 10, para valores detalhes de valores). O gráfico de dispersão de indivíduos (Figura 12) mostra que a variação individual e sobreposição dos desvios padrão.

##### 4.3. Variável resposta: osmolalidade e concentrações de ureia e eletrólitos (cloretos, sódio, potássio).

O objetivo era identificar se a osmolalidade e as concentrações de ureia e eletrólitos (cloretos, sódio, potássio) no plasma muda em resposta à exposição ao ar seco, comparando o início do experimento (URC1) ao limite de perda de 20% do peso inicial (URC2). Para a osmolalidade, queda nos valores das médias entre os níveis de tratamento. Para cloretos e ureia aumento, nos valores das médias entre os níveis de tratamento (Tabela 10, para valores detalhes de valores). Que também foi corroborado pela análise estatística, o teste- pareado identificou diferença significativa para osmolalidade, cloretos e ureia (Tabela 10, para valores detalhes de valores).

Sódio e potássio não apresentaram efeito significativo, porém este efeito aparenta ter sido causado por uma sobreposição dos desvios padrão, pois quando olhamos a Figura 13 podemos

identificar um leve aumento na média. Na Figura 13, podemos observar que a desidratação exercida pelo ar seco influencia em todas as variáveis analisadas, pois há uma clara diferença gráfica entre os níveis de tratamento, apesar de nos componentes da osmolalidade (cloretos, sódio, potássio e ureia) haver variação individual.

Tabela 10. Média e desvio padrão das variáveis resposta peso, hematócrito, osmolalidade e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia no plasma, e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos de *Leptodactylus labyrinthicus*, no experimento de desidratação por ar seco.

<i>L. labyrinthicus</i>	Experimento baixa umidade do ar = Variáveis resposta						
	MD±SD						
Variável preditora	Peso (g/cm <sup>2</sup> )	Hematócrito (%)	Osmolalidade (mOsmol/kg)	Cloretos (mmol/l)	Sódio (mmol/l)	Potássio (mmol/l)	Uréia (mmol/l)
URC1	0,77 ± 0,05	34,9±5,3	232,8±5,8	46,8±4,8	151,8±18,9	1,6± 0,4	8,4±1,4
URC2	0,60 ± 0,04	37,8±2	323,2±22	86,5±20,8	185,4±40,6	2,1±0,7	21,1±7,3
n° amostral	9	8	8	8	8	8	8
Shapiro-Wilk	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
Levene's	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Não Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Não Homogêneo
Teste T pareado	valor de <i>p</i> = 0,00001	Não significativo	valor de <i>p</i> = 9.524e-06	valor de <i>p</i> = 0.001	Não significativo	Não significativo	valor de <i>p</i> = 0.0003

Figura 11. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável peso ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) dos indivíduos de *Leptodactylus labyrinthicus*, no experimento de desidratação por ar seco (URC1 = indivíduos pré-experimento e URC2= indivíduos após perda de 20% do seu peso)

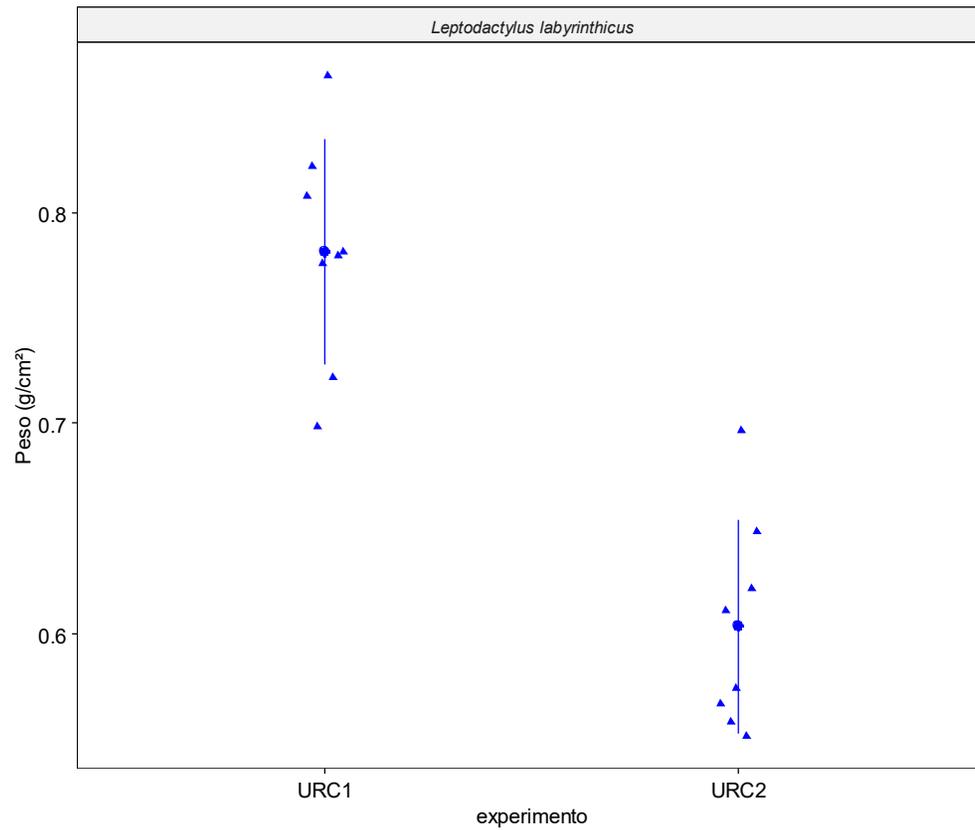


Figura 12. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável hematócrito dos indivíduos de *Leptodactylus labyrinthicus*, no experimento de desidratação por ar seco (URC1 =indivíduos pré-experimento e URC2= indivíduos após perda de 20% do seu peso inicial).

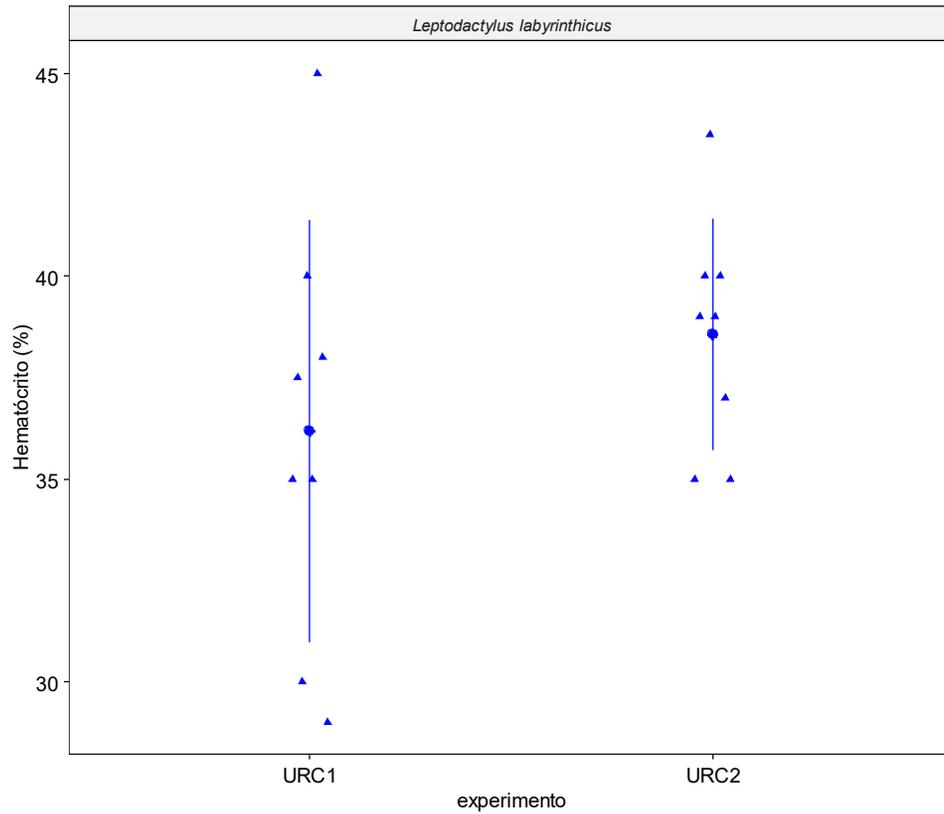
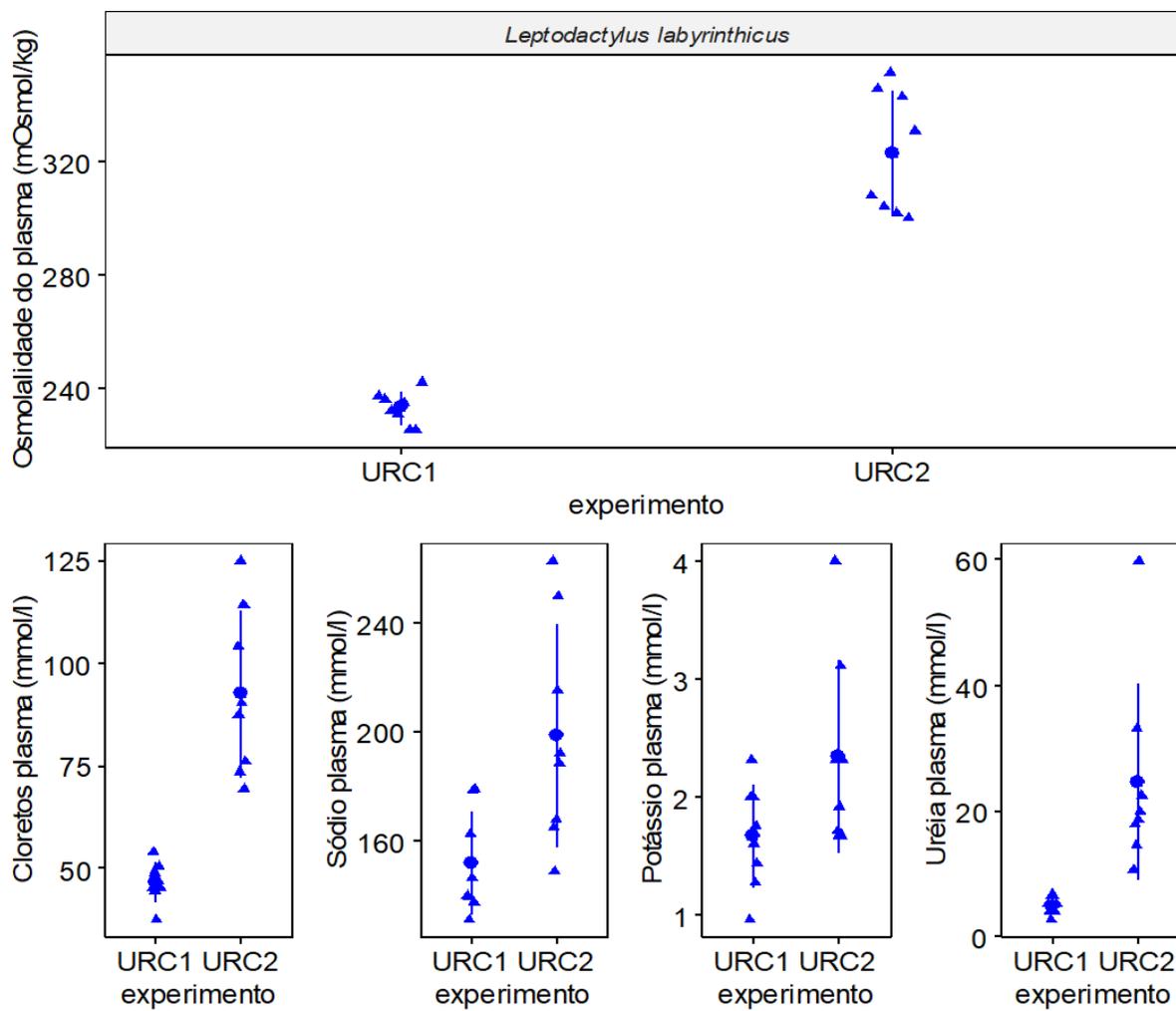


Figura 13. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) das variáveis resposta osmorregulatórias osmolalidade do plasma e concentrações de cloretos, sódio, potássio e ureia no plasma dos indivíduos de *Leptodactylus labyrinthicus*, no experimento de desidratação peso ar.



## 5. Temperatura Corpórea

Esta variável foi medida imediatamente antes de conter os indivíduos para manipulação experimental, com termômetro infravermelho e os indivíduos dentro dos seus respectivos recintos.

Na Tabela 12 encontram-se descritos os valores de temperatura controlada da câmara climática do período diurno, temperatura controlada da câmara climática do período noturno, temperatura aferida na câmara climática no momento das medidas das variáveis, médias e desvios padrão da temperatura corporal dos indivíduos na câmara climática, para todos os níveis de tratamento do experimento. Para a sala controle, temos a temperatura aferida no momento das medidas das variáveis, médias e desvios padrão dos indivíduos que se encontravam na sala controle para todos os níveis de tratamento do experimento. Como este grupo estava sob variação natural, não existe temperatura controlada.

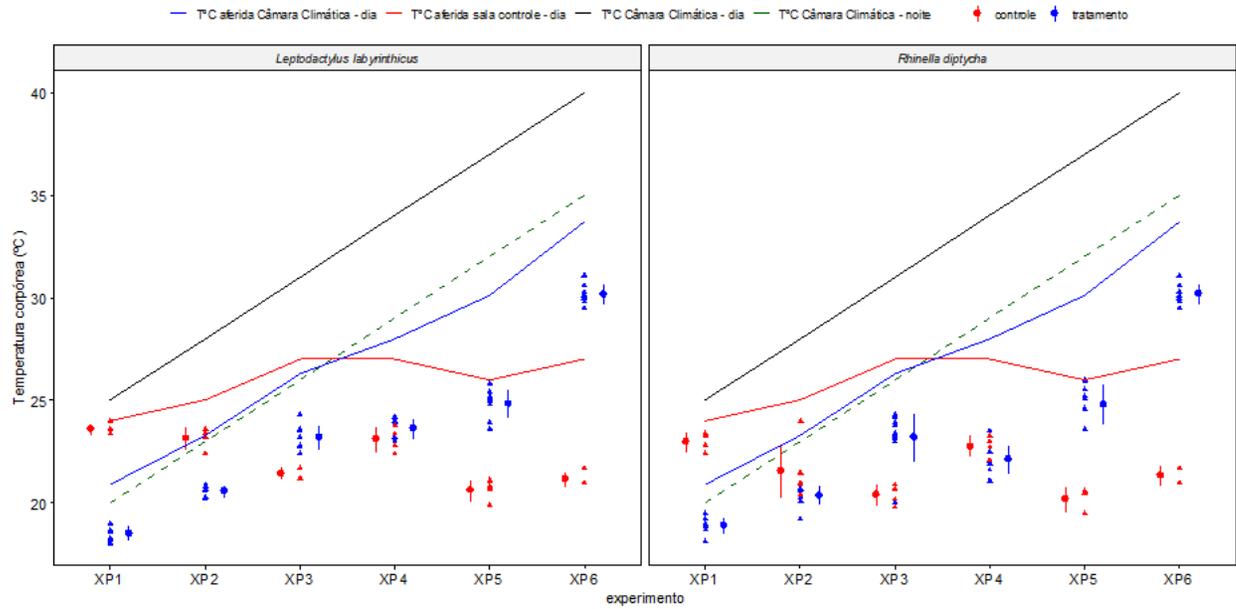
Para visualizar e entender a relação dos indivíduos e as variáveis respostas elaboramos um gráfico de média, desvio padrão e dispersão dos indivíduos (Figura 14). Para ambas as espécies houve aumento da temperatura corpórea no grupo tratamento, mas, inesperadamente, essa temperatura se manteve abaixo das temperaturas ambiente controladas, tanto para o dia quanto para a noite, mesmo a temperatura aferida sendo semelhante à temperatura controlada para o dia. Lembrando que as temperaturas foram aferidas a partir das 8 da manhã. Para o grupo controle também foi encontrada temperatura mais baixa que a aferida no momento da medida, mas, como esperado, a temperatura corpórea dos indivíduos acompanhava a flutuação da variação da temperatura do ambiente. Não houve muita variação individual, indicando uma constância nas temperaturas dos indivíduos.

Tabela 11. Temperatura corpórea de *L. labyrinthicus* e *R. diptycha*, da câmara climática e da sala controle aferidas durante o experimento de aumento gradual da temperatura. Manutenção dia e noite são as temperaturas controladas na câmara climática.

Experimento	T°C câmara climática					T°C sala controle		
	manutenção dia	manutenção noite	aferida dia	Indivíduos <i>L. labyrinthicus</i> MD±SD	Indivíduos <i>R. diptycha</i> MD±SD (n°)	aferida dia	Indivíduos <i>L. labyrinthicus</i> MD±SD	Indivíduos <i>R. diptycha</i> MD±SD (n°)
XP1	25	20	20	18.5 ± 0.3	18.9 ± 0.4 (10)	24	23.6 ± 0.3	22.9 ± 0.4 (5)
XP2	28	23	23.3	20.5 ± 0.3	20.3 ± 0.5 (10)	25	23.1 ± 0.5	21.5 ± 1.2 (5)
XP3	31	26	26.3	23.2 ± 0.6	23.2 ± 1.1 (10)	27	21.4 ± 0.3	20.4 ± 0.5 (4)
XP4	34	29	28	23.6 ± 0.5	22.1 ± 0.6 (9)	27	23.1 ± 0.6	22.7 ± 0.5 (4)
XP5	37	32	30.1	24.8 ± 0.7	24.8 ± 0.9 (9)	26	20.6 ± 0.5	20.2 ± 0.6 (3)
XP6	40	35	33.7	30.1 ± 0.5	30.2 ± 0.5 (9)	27	21.1 ± 0.3	21.3 ± 0.5 (2)
N° amostral	-	-	-	9	-	-	4	-

Figura 14. Temperatura corpórea de *L. labyrinthicus* e *R. diptycha*, da câmara climática e da sala controle aferidas durante o experimento de aumento gradual da temperatura.

Triângulos indicam os indivíduos, bola com barra indicam média e desvio padrão. Temperatura câmara climática dia e noite (linha) indicam temperatura controlada.



## Capítulo 2 - O efeito da variação térmica sobre o desempenho locomotor de *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*

### Introdução

Evolutivamente, os anfíbios constituem um dos primeiros grupos de vertebrados a exibir características que lhes permitiram fazer incursões no ambiente terrestre (e.g., membros locomotores e respiração pulmonar), mas possuem características no seu ciclo de vida que os mantiveram dependentes de corpos d'água (e.g., pele permeável e ovos anamnióticos) e que os tornam mais susceptíveis à desidratação (Burggren e Warburton, 2007; Wells, 2007; Wygoda, 1984).

A mudança climática está interferindo diretamente no ciclo da água, alterando a dinâmica de chuvas e temperatura dos ambientes. Os anfíbios são um dos principais grupos a sofrer com a mudança climática, devido a sua dependência direta de corpos de água para a sua manutenção no ambiente e reprodução das espécies (Buckeridge, 2008; Jones *et al.*, 1999; Blaustein *et al.*, 2010).

Um efeito importante, porém, comparativamente pouco estudado do estresse osmótico é a relação entre este e comportamento locomotor, que tem ligação direta com a sobrevivência dos animais. Desempenho locomotor pode ser usado como uma medida indireta da capacidade do indivíduo de buscar microhabitats adequados ou evadir-se de predadores, tendo, portanto, um impacto direto sobre o fitness do animal. Este efeito, tanto do stress térmico quanto hídrico, já conhecido há bastante tempo. Bennet (1990) fez uma revisão sobre os efeitos do stress térmico sobre o desempenho locomotor, encontrando que, para a maioria dos vertebrados estudados até então, o desempenho locomotor atinge um ótimo em certas temperaturas e depois decai rapidamente, e Rogowitz e colaboradores (1999) associaram desidratação por evapotranspiração cutânea com queda no desempenho locomotor em espécies de *Eleutherodactylus*.

O estresse hídrico e térmico em baixos níveis pode afetar o desempenho locomotor positivamente, estimulando o animal a aumentar sua locomoção em busca de microhabitats mais propícios, mas, em níveis mais altos, pode debilitar o animal a ponto de ele não conseguir se deslocar com eficiência. A resistência aos efeitos do estresse hídrico no desempenho locomotor pode ser um traço selecionado positivamente, por exemplo, em ambientes xéricos. Tingley e colaboradores (2012) demonstraram que populações de *Rhinella marina* de ambientes xéricos da Austrália tem uma maior resistência (medida como distância total percorrida, velocidade e número de saltos por metro) aos efeitos da dessecação do que coespecíficos de áreas méxicas, uma

indicação de rápida seleção deste traço, dado que *R. marina* é uma espécie que foi introduzida recentemente na Austrália. Isto é apoiado pelos dados de Prates e Navas (2009), que encontraram resultados semelhantes para *Rhinella granulosa* de ambientes de Mata Atlântica e da Caatinga.

Desta forma, o objetivo geral deste capítulo é descrever e comparar características do desempenho sob efeito da variação térmica em *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus*.

Objetivo específico: Identificar se o desempenho locomotor dos animais (número total de saltos, distância total percorrida, moda do tamanho do salto, total de salto por minuto e percentual do tempo em salto) muda em resposta à mudança gradual de temperatura.

## Material e Métodos

### 1. Ambientes amostrais e espécies amostradas

(Licença de coleta, transporte e manutenção: SISBIO N°63810-1 outorgado a Vanessa Maria Gomes Bonfim no ano de 2018)

Os indivíduos de *Rhinella diptycha* e *Leptodactylus labyrinthicus* foram coletados no período de chuvas de 26 de setembro a 18 de novembro de 2019, através de busca ativa em período noturno, na área do campus da USP – Ribeirão Preto, esta área está localizada em uma zona de transição de Mata Atlântica e Cerrado, apresentando corpos de água de pequeno e grande porte. No local de coleta foram puncionados 0,5 ml de sangue (seringa previamente heparinizada) para obtenção das medidas plasmáticas de recém-captura da osmolalidade e concentrações individuais dos osmólitos.

Do local de coleta até o Laboratório de Morfofisiologia de Vertebrados os animais foram mantidos individualmente em saco plástico inflado com ar contendo substrato úmido e folhas do local de coleta. No laboratório foram transferidos dos sacos para caixas (contendo folhas) de tamanho suficiente para movimentação lateral, mas que não possibilite o salto (como indicado pela RN29 do CONCEA) e então foram mantidos no Biotério de Tetrápodes Terrestres da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto, onde foram mantidos em cativeiro para realização dos experimentos.

### 2. Experimento piloto

Para determinação das taxas de variação da temperatura e para testar os equipamentos experimentais, foi feito experimento piloto, com a duração de 1 mês. Neste piloto foram coletados 4 indivíduos de *Rhinella diptycha* e 4 indivíduos de *Leptodactylus vastus* em ambiente de Caatinga (município de Xique-Xique). A variável temperatura foi variada controladamente, começando de 25°C de dia e 20°C de noite indo até 43°C de dia e 38°C de noite. Desta forma, podemos determinar o melhor setup experimental e corrigir eventuais problemas. Para a realização do experimento foi utilizada câmara climática (Eletrolab) instalada no Biotério de Animais Silvestres, foi aumentada a temperatura em 3° C para o dia e noite a cada 10 dias de experimento. Vale ressaltar que a continuidade do experimento nas temperaturas altas só foi mantida se identificada perda menor que 20% da massa corpórea inicial, como explicado anteriormente. Desta forma, a cada 10 dias de experimento foi feita a seguinte sequência de coleta de dados: manutenção por 7 dias na temperatura desejada, e no 7 dia realização da coleta de dados do desempenho locomotor.

Foram realizados teste de desempenho locomotor em 7 indivíduos dos 10 que estavam na câmara climática. Cada indivíduo foi estimulado a saltar ou caminhar em arena retangular (127 cm x 155 cm) por estímulo mecânico suave do uróstilo utilizando uma haste fina de madeira. O tempo total de duração do estímulo foi de 5 minutos, e o experimento foi filmado (no período de atividade dos indivíduos – noturno - com luz branca) para análise dos vídeos afim de obter parâmetros de medidas de desempenho locomotor: distância total de deslocamento, número de saltos, distância entre saltos e tempo até a primeira fadiga. Os resultados do experimento piloto foram utilizados para ajustar o protocolo experimental definitivo.

*L. vastus* faz parte do mesmo grupo filogenético e possui o mesmos hábitos de *Leptodactylus labyrinthicus*, uma das espécies focais deste projeto. A outra espécie utilizada no piloto, *R. jimi*, foi posteriormente sinonimizada com *R. diptycha*.

Após os resultados encontrados no experimento piloto a metodologia para o experimento definitivo foi ajustada. Os resultados encontrados estão detalhados na secção de resultados.

### 3. Protocolo experimental 2: Manutenção e tratamentos - experimento variação gradual da temperatura

Os indivíduos coletados foram mantidos em sala com variação da luz e temperatura natural de Ribeirão Preto por um período de quarentena de 30 dias, neste período os animais estiveram em ambiente controlado: a temperatura entre 25 e 20 graus, solo e ar 100% úmido e alimentação com baratas e tenébrios a cada 2 dias. Após estes 10 indivíduos de cada espécie foram transportados para câmara climática Eletrolab (local onde foi variado a temperatura). Porém, 7 indivíduos participaram do processo experimental de desempenho locomotor.

Anfíbios anuros são solitários, o único momento gregário é a época reprodutiva, onde os machos buscam por fêmeas reprodutivas para realizar o amplexo. Nesse período reprodutivo também pode haver competição entre machos, por este motivo os animais foram mantidos, individualmente, em caixa de polipropileno com dimensões 50cm de comprimento x 30cm de altura x 30cm de largura que foram higienizadas 2 vezes por semana com água e detergente neutro, solo era trocado e água *ad libitum* verificada diariamente, além disso a sala de manutenção e experimentação foi limpa 2 vezes por semana. Neste projeto não houve nenhum enriquecimento ambiental (nas caixas de manutenção e experimentação) que permita ao animal se abrigar ou fugir do local de experimentação, pois todos os animais deveriam estar na mesma condição de cativeiro

para que as diferenças específicas de comportamento (abrigo) não interferissem na resposta fisiológica (questão principal deste projeto).

Foram feitos experimentos no quais as condições de temperatura foram variadas gradualmente (Figura 1), chegando até valores mais extremos do que os encontrados em campo. Os experimentos tiveram duração total de 3 mês, com alteração da temperatura a cada 10 dias. Neste projeto é esperada alguma agitação (ex. saltos e tentativas de fuga) que pode ser indício de desconforto dos animais, pois Anfíbios tem características comportamentais de buscar (por deslocamento) ambientes úmidos em período secos. Esse desconforto esperado, não prejudica fisiologicamente os animais. O critério de determinação do limite suportado pelos animais foi o da perda de 20% do peso inicial, pois isso já é descrito para anfíbios como o limite máximo de desidratação na qual não há dano fisiológico (Burggren and Vitalis, 42005; Cartledge et al., 2006; Churchill and Storey, 1995).

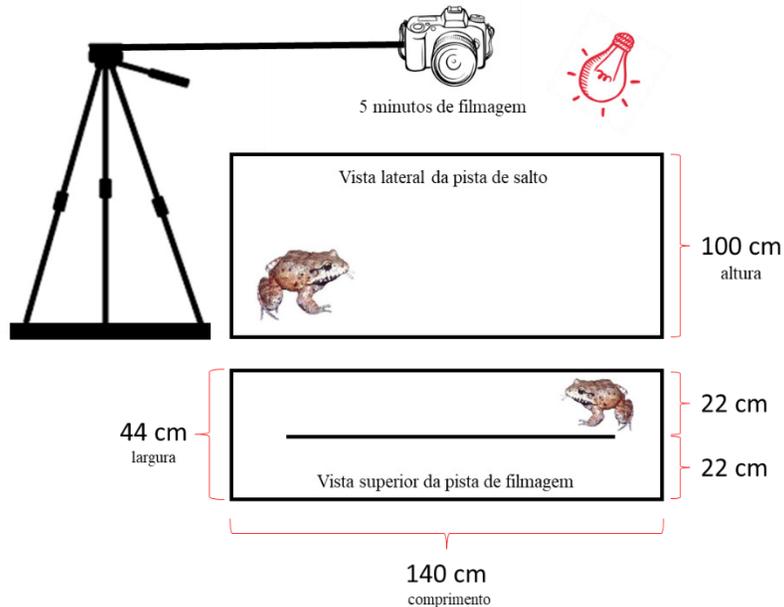
### 3.1.1. Alterações metodológicas pós resultado do piloto

Foi observado que o tamanho da arena utilizada dificultava a manipulação dos animais e medição das distâncias percorridas. Assim, a arena foi alterada, tendo seu tamanho diminuído, passando de um quadrado para um circuito em forma de 0, resolvendo assim os problemas citados. O tamanho da arena, embora tendo sido reduzido, ainda era maior que o maior salto observado, permitindo assim que os animais expressassem seu comportamento livremente. A iluminação do experimento também foi alterada, de luz branca para uma iluminação vermelha suave, mais indicada para filmagens de atividades noturna, pois afeta menos o comportamento dos animais. O tempo de cinco minutos foi mantido, pois o nº amostral experimental foi aumentado (4 indivíduos no piloto para 7 do experimento definitivo), o que permitiu que todos os 14 animais das duas espécies passassem pelo experimento de desempenho locomotor na mesma noite (período de atividade natural dos indivíduos). O piloto demonstrou que este tempo era suficiente para que fossem observadas alterações nas variáveis de desempenho locomotor ao longo da sessão de filmagem. Além disso, a ordem dos indivíduos foi sorteada a cada dia de experimento do desempenho locomotor.

Cada indivíduo foi estimulado a saltar ou caminhar em arena retangular por estímulo mecânico suave do uróstilo utilizando uma haste fina de madeira. O tempo total de duração do estímulo foi de 5 minutos, que foi filmado (no período de atividade dos indivíduos – noturno - com luz vermelha) para posterior análise visual do observador afim de obter parâmetros de medidas de

desempenho locomotor: a distância total de deslocamento, número de saltos e tempo em salto (Figura 15).

Figura 15. Esquema do experimento de desempenho locomotor dentro da câmara climática.



#### 4. Análises estatísticas

##### 4.1. Pré-tratamento dos dados

A filmagens foram analisadas por apenas um observador. As medidas de distância entre saltos foram feitas manualmente marcadas em cima de folha de acetato com caneta permanente sobre a tela do computador. Foi medida em centímetros de régua na tela e convertido para escala real com gabarito pré-determinado. Também foram marcados os intervalos de tempo de salto e contabilizados tanto o tempo quanto o número de saltos totais dentro de 5 minutos quando o número de saltos por minutos. Para a distância total percorrida estipulamos como medida o total de deslocamento por salto padronizado pelo tamanho rostro-cloacal (CRC) dos indivíduos. Assim, o deslocamento do indivíduo era medido em tamanhos corporais (DTS/CRC). A moda do comprimento do salto (DTS/CRC) é o comprimento mais frequente observado durante os 5 minutos de experimento.

## 4.2. Análises comparativas

Após os tratamentos dos dados foram calculadas as médias e desvio-padrão de todas as variáveis respostas sob o efeito da variável preditora temperatura (níveis de tratamento: CP1 = dia 25°C/noite 20°C; CP2 = dia 28°C/noite 23°C; CP3 = dia 31°C/noite 26°C; CP4 = dia 34°C/noite 29°C; CP5 = dia 37°C/ noite 32°C; CP6 = dia 40°C/35°C).

Foi realizada uma análise de *outliers* via *boxplot*, uma ferramenta gráfica exploratória estatística que permite visualizar a distribuição dos dados e a presença de valores discrepantes (*outliers*) sem pré-determinar a distribuição, fornecendo assim um meio complementar para desenvolver uma perspectiva entendimento o caráter dos dados. Foram retirados das análises apenas os indivíduos que estavam acima do limite máximo e abaixo do limite mínimo interquartil. Mesmo com as análises de *outliers*, fizemos análises de premissas de normalidade e de homogeneidade com e sem os *outliers* para verificar se a remoção, apesar de graficamente alterar a distribuição dos dados, não alterava a natureza geral destes. Os testes de premissas foram feitos para cada variável resposta e por nível de tratamento. Para a premissa de normalidade foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, e para a premissa de homogeneidade das variâncias foi feito o teste de Levene. Para aquelas variáveis que não atenderam às premissas foi feita uma transformação logarítmica. Mesmo com essa transformação, elas continuaram não atendendo às premissas, desta forma optamos em realizar testes não-paramétricos com os dados não transformados.

Os testes não-paramétricos para comparações com mais de dois níveis de tratamento foi realizada uma análise de Modelo Generalizado Misto (GLMM) com fator aleatório sendo o indivíduo. Este modelo ajusta os dados utilizando máxima verossimilhança restrita (REML) para encontrar o parâmetro  $\lambda$  que melhor se ajusta aos dados. No caso das nossas variáveis respostas, por serem contínuas, a família de funções de ligação indicada para o GLMM é a família gaussiana com a função identidade. Desta forma, o GLMM ajusta uma curva normal aos dados, sem perder as características da distribuição da variável. Para determinar que usaríamos o GLMM fizemos uma análise prévia de seleção de modelos, comparando (via ANOVA) um modelo complexo que continha indivíduo como fator aleatório (GLMM), e um modelo sem o indivíduo como fator aleatório (GLM). Como o valor de  $p$  desta comparação foi significativo, escolhemos o modelo mais complexo, incorporando assim o efeito da repetição dos indivíduos nas variáveis resposta. Nas análises do GLMM foram utilizados somente os indivíduos em que foi possível obter as medidas para todos os níveis de tratamento.

Os testes paramétricos comparativos usados foram o teste-t pareado, que compara dois níveis de tratamento por variável, para uma única amostra repetida. Para comparações com mais de dois níveis de tratamento foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas. Para verificar as diferenças entre os grupos, tanto para ANOVA de medidas repetidas quanto para o GLMM, foi feito um teste *post-hoc* de Tukey. Nas análises de medidas repetidas foram utilizados somente os indivíduos em que foi possível obter as medidas para todos os níveis de tratamento. Todas essas análises e cálculos foram realizados no *software* R (R CORE TEAM, 2017), utilizando R Studio (2015). No tópico resultados iremos indicar qual análise foi realizada para cada variável. Todas as Tabelas de resumo dos valores das variáveis respostas indicam as estatísticas e seus respectivos resultados.

## Resultados

Os resultados do experimento são apresentados abaixo, e serão discutidos em conjunto com os resultados do Capítulo 1, na Discussão Geral

### 1. Experimento piloto

No gráfico de distância total percorrida padronizada (Figura 16), podemos observar um padrão de atividade muito maior, em todos os dias, para *L.vastus*, comparado a *R. diptycha*. Ambas espécies apresentam uma tendência de aumento do deslocamento após o primeiro dia de experimento, porém em *L.vastus*, não é possível afirmar se essa tendência continua ao longo do experimento, devido à alta variação dos dados, muito maior que a observada em *R. diptycha*. A variação observada no primeiro dia de experimento também é muito menor, para ambas as espécies, do que a observada ao longo do gradiente de temperatura. Isso pode ser explicado pelo fato de que as temperaturas de dia e noite do primeiro dia de experimento são bastante próximas do observado na natureza no momento da coleta dos animais, ou pelo fato dos animais estranharem as condições de cativeiro e experimento, evidenciando assim uma menor atividade de deslocamento. O aumento no deslocamento pode ser indicativo do efeito da temperatura, que levaria o animal a buscar um micro-habitat mais favorável. O alto deslocamento observado em *L.vastus* pode ter sido causado pelo fato da arena ter um substrato seco, diferente do tipo de substrato úmido (córregos, nascentes, brejos, poças) em que essa espécie é comumente encontrada, o que aumentaria a busca por um micro-habitat favorável. Além disso, vale ressaltar que a biomecânica do salto de *L.vastus* permite uma maior amplitude e distancia de deslocamento por salto.

No gráfico de número de saltos (Figura 18) por dia de tratamento, vemos uma clara tendência de aumento para ambas as espécies, novamente com o primeiro dia apresentando uma variação menor que os demais. Nesta variável, *R. diptycha* e *L.vastus* apresentam uma variância bastante similar, diferente do observado para a distância percorrida total. Isto é indicativo de que os tamanhos dos saltos variam de forma diferente entre as espécies, especialmente porque para *R. jimi*, a distância percorrida aumentou pouco ao longo do experimento. O tamanho médio padronizado (Figura 17) de cada salto reforça esta hipótese, mostrando uma tendência de queda ao longo do experimento, o que indica que os animais passavam a dar saltos menores, porém mais frequentes, à medida que a temperatura do experimento aumentava. Isto também apoia a explicação de que a temperatura mais alta faz os animais buscarem um micro-habitat mais favorável, que pode

estar associado a um efeito cumulativo do stress térmico, que pode diminuir a capacidade dos animais de saltar distâncias maiores.

Vale ressaltar que em todo o período de manutenção em cativeiro foi disponibilizado água livre que era repostada todos os dias, assim não podemos indicar um efeito direto do stress hídrico. A figura 17 também pode indicar um padrão claro no tamanho de salto de *R. diptycha* pois a variação intraespecífica é baixa, isto pode ser explicado pela biomecânica do salto desta espécie, que possui os membros posteriores menores e o hábito terrestre desta espécie é mais caminhante do que saltador.

Esta hipótese, de diminuição da capacidade de salto por efeito cumulativo, é apoiada para *L. vastus*, ao examinarmos a distribuição temporal dos saltos por minuto, totalizando 5 minutos de estímulo (19) dentro de cada dia de experimento. Há uma clara tendência de diminuição da quantidade de saltos à medida que o animal se aproxima da fadiga. Entretanto para *R. diptycha*, observa-se um padrão oposto, uma tendência ao aumento do tamanho do salto. Também podemos identificar uma associação da diminuição do tamanho do salto em *L. vastus* referente ao minuto que ocorre a fadiga (Tabela 12). Outra variável que pode indicar um efeito da temperatura em *L. vastus* é o tempo de viragem (Tabela 12), pois em altas temperatura houve um aumento do tempo em decúbito dorsal indicando hiperpneia pós exercício.

Figura 16. Gráfico de médias (▲) e distribuição das medidas dos indivíduos (●) referente a distância percorrida total padronizada, ao longo do gradiente de aumento de temperatura.

A distância total percorrida (cm) se refere ao somatório de todas as medidas de saltos padronizados pelo comprimento rosto-cloacal dos indivíduos. Temperaturas: D1 dia: 26°C / noite: 24,3°C, D2 dia: 27,7°C / noite: 25,5°C, D3 dia: 29,1°C / noite: 27,3°C, D4 dia: 31,9°C / noite: 28,5°C, D5 dia: 33,3°C / noite: 29,9°C, D6 dia: 34,7°C / noite: 31,1°C.

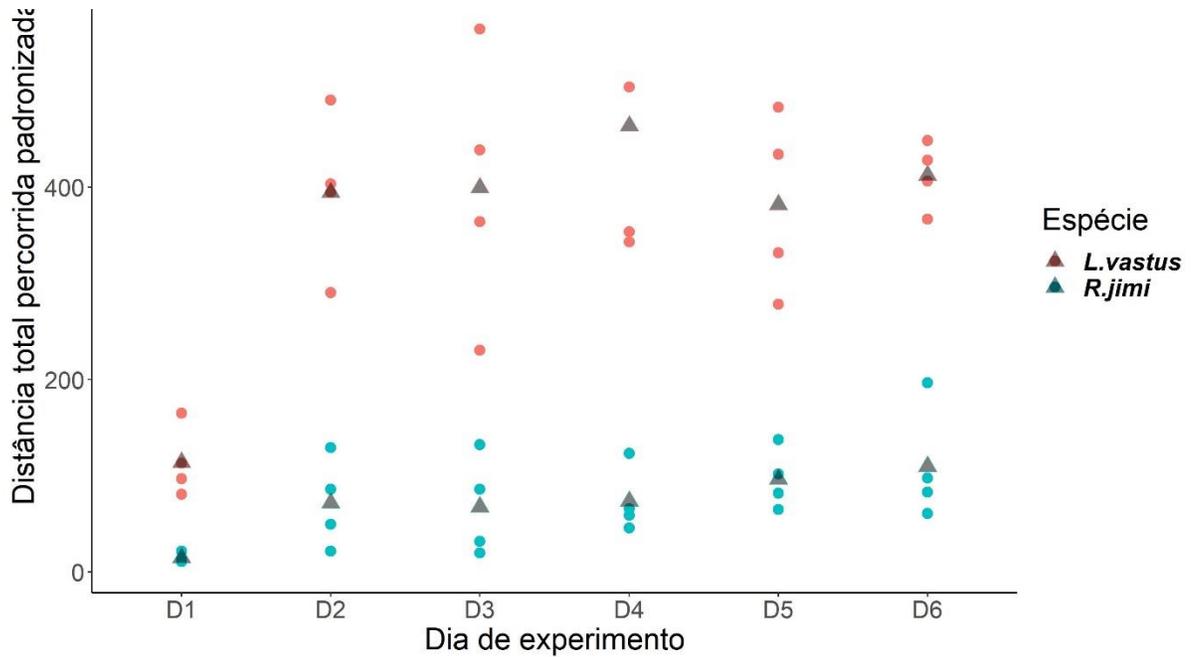


Figura 17. Gráfico de médias (▲) e distribuição das medidas dos indivíduos (●) referente a tamanho médio do salto (cm), padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, ao longo do gradiente de aumento de temperatura.

Temperaturas: D1 dia: 26°C / noite: 24,3°C, D2 dia: 27,7°C / noite: 25,5°C, D3 dia: 29,1°C / noite: 27,3°C, D4 dia: 31,9°C / noite: 28,5°C, D5 dia: 33,3°C / noite: 29,9°C, D6 dia: 34,7°C / noite: 31,1°C.

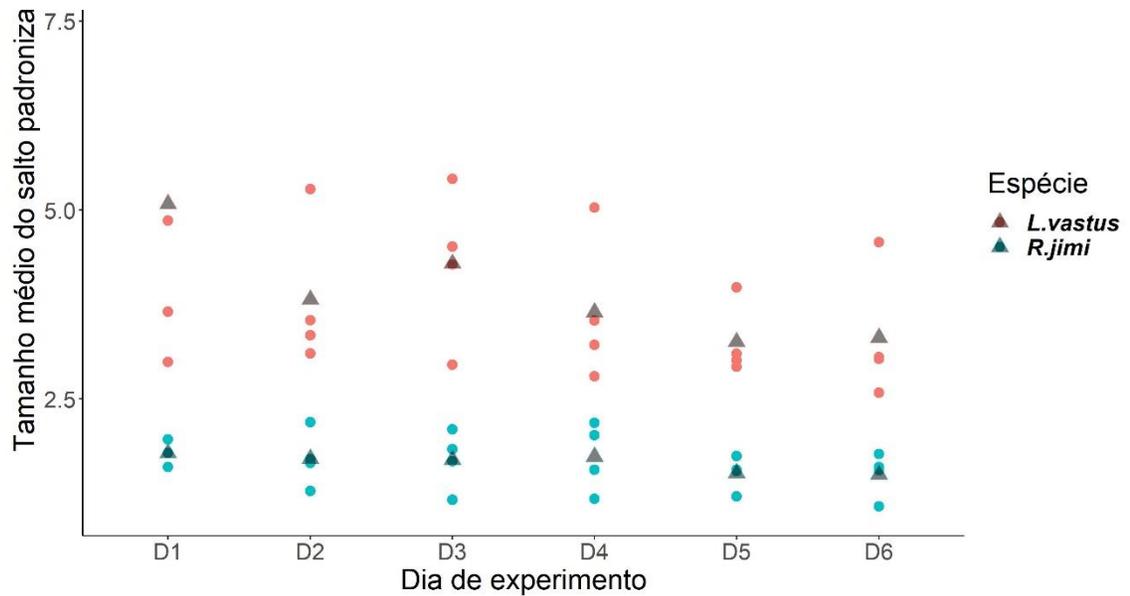


Figura 18. Gráfico de médias (▲) e distribuição das medidas dos indivíduos (●) referente a contagem do número de saltos (contagem), ao longo do gradiente de aumento de temperatura.

Temperaturas: D1 dia: 26°C / noite: 24,3°C, D2 dia: 27,7°C / noite: 25,5°C, D3 dia: 29,1°C / noite: 27,3°C, D4 dia: 31,9°C / noite: 28,5°C, D5 dia: 33,3°C / noite: 29,9°C, D6 dia: 34,7°C / noite: 31,1°C.

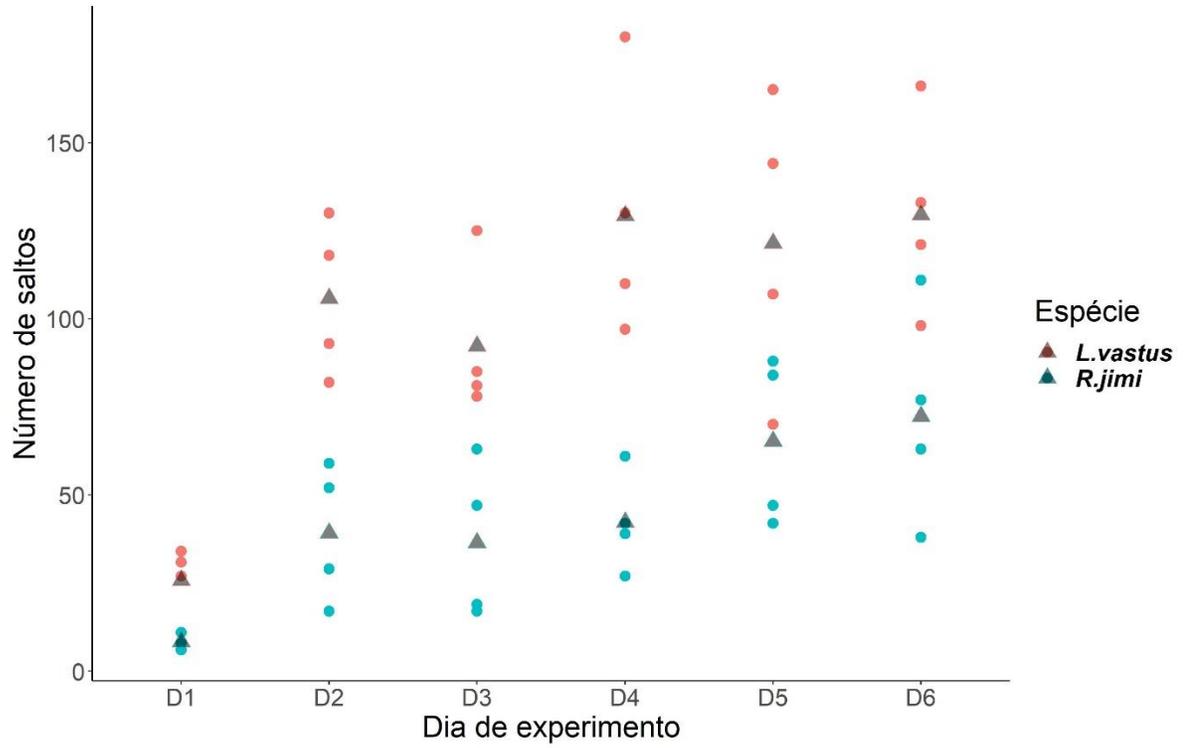


Figura 19. Gráfico de médias (●) e desvio padrão (barras verticais) referente ao tamanho de salto (cm) padronizado pelo comprimento rostro-cloacal (cm) de cada indivíduo medido no experimento D1, a cada minuto. Período total da do estímulo de salto 5 minutos.

Temperaturas: D1 dia: 26°C / noite: 24,3°C, D2 dia: 27,7°C / noite: 25,5°C, D3 dia: 29,1°C / noite: 27,3°C, D4 dia: 31,9°C / noite: 28,5°C, D5 dia: 33,3°C / noite: 29,9°C, D6 dia: 34,7°C / noite: 31,1°C.

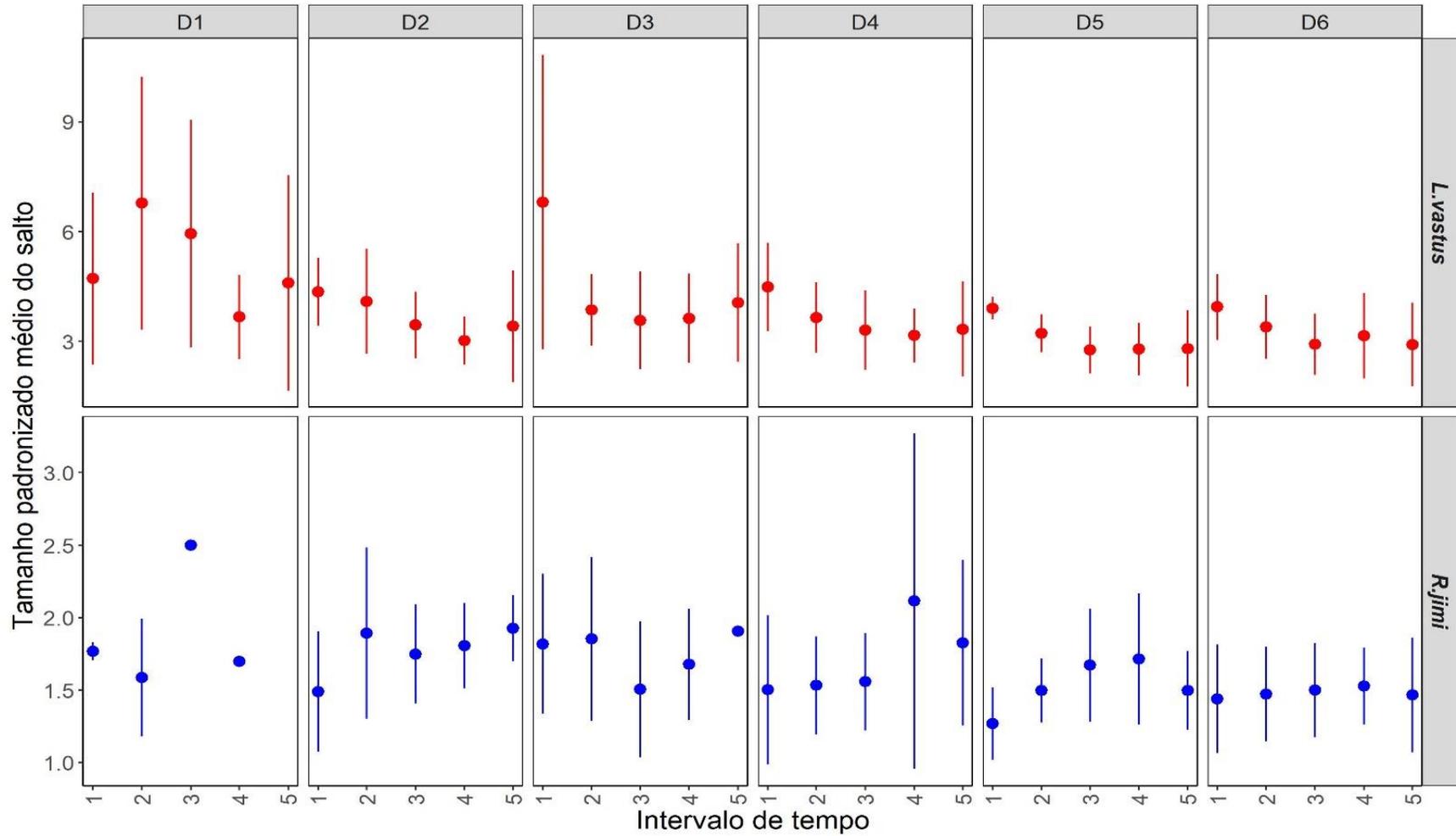


Tabela 12. Sumário das variáveis de desempenho locomotor sob aumento gradual da temperatura (média  $\pm$  desvio padrão): distância total percorrida, número de saltos, tamanho de salto, tempo de fadiga e tempo de viragem.

Todas as medidas de tamanho de salto foram padronizadas pelo comprimento rostro-cloacal de cada indivíduo medido no experimento D1. A distância total percorrida se refere ao somatório de todas as medidas de saltos padronizados. Tempo de fadiga se refere ao momento em que os indivíduos começaram a apresentar resistência ao estímulo ou se mantiveram parados hiperventilando. Tempo de viragem se refere ao intervalo de tempo que os indivíduos se mantiveram em decúbito dorsal após o tempo total de cinco minutos de estímulo. Temperaturas: D1 dia: 26°C / noite: 24,3°C, D2 dia: 27,7°C / noite: 25,5°C, D3 dia: 29,1°C / noite: 27,3°C, D4 dia: 31,9°C / noite: 28,5°C, D5 dia: 33,3°C / noite: 29,9°C, D6 dia: 34,7°C / noite: 31,1°C

Espécie	Tratamento	Distância				
		total média (cm)	Número de saltos médio (contagem)	Tamanho de salto médio (cm)	Tempo médio até a fadiga (min)	Tempo de viragem médio (seg)
L.vastus Nº4	D1	2,42 $\pm$ 1,44	14,9 $\pm$ 9,21	4,43 $\pm$ 2,6	Não teve	NÃO TEVE
	D2	2,1 $\pm$ 0,94	55,11 $\pm$ 33,39	3,73 $\pm$ 1,88	3,5	1 $\pm$ 0
	D3	2,42 $\pm$ 5,6	48,6 $\pm$ 30,28	4,33 $\pm$ 9,37	2,25	6 $\pm$ 12
	D4	2 $\pm$ 0,97	68,98 $\pm$ 44,02	3,59 $\pm$ 1,93	2,75	58,25 $\pm$ 46,95
	D5	1,87 $\pm$ 0,87	66,66 $\pm$ 42,79	3,14 $\pm$ 1,47	2,5	33,25 $\pm$ 37,89
	D6	1,82 $\pm$ 0,81	67,58 $\pm$ 41,32	3,18 $\pm$ 1,59	2,75	43 $\pm$ 40,9
R.diptycha Nº4	D1	1,63 $\pm$ 0,43	4,92 $\pm$ 2,86	1,81 $\pm$ 0,51	0,75	0 $\pm$ 0
	D2	1,57 $\pm$ 0,47	23,8 $\pm$ 15,99	1,83 $\pm$ 0,6	2,5	32,25 $\pm$ 38,34
	D3	1,6 $\pm$ 0,53	23,88 $\pm$ 17,03	1,85 $\pm$ 0,63	2	1 $\pm$ 0
	D4	1,49 $\pm$ 0,81	23,38 $\pm$ 15,07	1,74 $\pm$ 1,15	2,25	0 $\pm$ 0
	D5	1,28 $\pm$ 0,83	36,3 $\pm$ 23,55	1,48 $\pm$ 0,87	2	0 $\pm$ 0
	D6	1,28 $\pm$ 0,45	41,44 $\pm$ 27,97	1,52 $\pm$ 0,57	3	0 $\pm$ 0

## 2. Experimento de aumento gradual de temperatura

Os testes de premissa para as análises estatísticas (Tabela 14, 15 e 16) indicaram que as variáveis número total de saltos, número de saltos por minuto, tamanho do salto e moda do tamanho do salto apresentaram distribuição normal e homogênea para as duas espécies. Para tempo total em salto para *Rhinella diptycha*, o teste de Shapiro-Wilk rejeitou a premissa de normalidade, então foi feito um GLMM ao invés de uma ANOVA de medidas repetidas (Tabela 13).

Para *L. labyrinthicus* não foi encontrado efeito significativo do aumento de temperatura nos parâmetros de desempenho locomotor analisados: número total de saltos, número de saltos por minuto, tamanho do salto corrigido pelo comprimento rostro-cloacal, moda do tamanho do salto padronizado e tempo gasto em salto ao longo dos cinco minutos do experimento (Tabela 14 e 15). Para *R. diptycha* não foi encontrado efeito significativo do aumento de temperatura nos parâmetros analisado do desempenho locomotor: número total de saltos, número de saltos por minuto, tamanho do salto corrigido pelo comprimento rostro-cloacal e moda do tamanho do salto padronizado longo dos cinco minutos do experimento (Tabela 16). Já para o parâmetro porcentagem do tempo total em salto foi encontrado efeito significativo (Tabela 13). Entretanto, foi observada uma grande variação entre os indivíduos (Figura 20, 21, 22, 23, 24 e 25) para ambas as espécies em todas as variáveis, evidenciado pelos altos valores de desvio-padrão observados.

O percentual de tempo gasto em salto para *L. labyrinthicus* não apresentou efeito significativo (Tabela 14), indicando que os animais mantiveram sua capacidade locomotora mesmo nas temperaturas mais altas, sem indicativo de fadiga aumentada ao longo do experimento. O percentual de tempo gasto em salto, para ambas as espécies, aparenta apresentar um leve aumento seguido de queda (Figura 20), efeito que foi significativo para *R. diptycha* (Tabela 13). Não houve diferença entre os minutos iniciais e finais do experimento de locomoção (Tabela 14 e Figura 21). Para esta variável

Embora o tempo total gasto em salto tenha variado, o número total de saltos não apresentou efeito significativo para ambas as espécies (Figura 22, Tabela 15 e 16). Entretanto, é possível observar que os padrões exibidos pelas duas espécies foram semelhantes, com leve aumento e queda de CP4 para CP5 (Figura 22), embora as médias para cada espécie tenham sido bastante diferentes. Enquanto *L. labyrinthicus* apresentou uma média de total de saltos máxima de 96 saltos (Tabela 15), *R. diptycha* apresentou uma média máxima de 51 saltos (Tabela 16), embora o desvio-padrão desta última tenha sido consistentemente maior, indicando uma maior variação individual nesta espécie (Figura 22).

Ao observarmos a variação do número de saltos por minuto para cada dia do experimento (Figura 23), vemos que não há um padrão claro que seja indicativo de efeito do stress fisiológico causado pelo aumento de temperatura, para ambas as espécies.

O tamanho médio do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal) para *L. labyrinthicus* apresenta médias consistentemente maiores que *R. diptycha*, mas para ambas as espécies parece ter um leve aumento seguido de queda ao longo do experimento (Figura 24).

O mesmo padrão é visto para a moda do tamanho padronizado do salto (Figura 25) para ambas as espécies. O tamanho de salto mais frequente (moda) para *L. labyrinthicus* apresenta médias consistentemente maiores que *R. diptycha*, porém ambos não aparentam ter sido afetados pelo experimento de aumento de temperatura, não apresentando efeito significativo (Tabela 16 e 17). O percentual de tempo gasto em salto também não apresentou efeito significativo (Tabela 14 e 15), indicando que os animais mantiveram sua capacidade locomotora mesmo nas temperaturas mais altas, sem indicativo de fadiga aumentada ao longo do experimento, não havendo diferença entre os minutos iniciais e finais do experimento de locomoção (Figuras 24).

### 3. Comparação entre o primeiro dia de experimento e após período de recuperação

Examinando as variáveis de desempenho locomotor, não foi detectada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o primeiro dia de experimento e o teste de desempenho feito após o fim do experimento, para proporção do tempo gasto em salto (Figuras 26 e 27, Tabelas 18, e 20), quantidade de saltos (Figura 28, Tabelas 17 e 19), número de saltos por minuto (Figura 29, Tabelas 17 e 19), tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, Figura 30, Tabelas 17 e 19), e para o tamanho de salto mais frequente (moda do tamanho do salto, Figura 31, Tabelas 17 e 19). Este resultado indica que os indivíduos se recuperaram de um eventual stress fisiológico causado pelo aumento gradual de temperatura.

### 4. Temperatura Corpórea

A temperatura corpórea foi medida imediatamente antes da manipulação dos indivíduos para o experimento de desempenho locomotor, utilizando um termômetro infravermelho, com os indivíduos dentro dos seus respectivos recintos.

Na Tabela 21 encontram-se, para cada nível do tratamento, os valores de temperatura programados dentro da câmara climática, nos períodos diurno e noturno, além da temperatura aferida na câmara climática no momento dos experimentos. As temperaturas corporais médias (com seus desvios-padrão) dos indivíduos de ambas as espécies, no momento do início do

experimento de desempenho locomotor também são apresentadas na mesma. Os indivíduos da sala de controle não foram submetidos a este experimento.

Na figura 32 temos a temperatura corporal média dos indivíduos de ambas as espécies em função do nível do tratamento. Para ambas as espécies houve aumento da temperatura, mas, inesperadamente, essa temperatura se manteve consistentemente abaixo das temperaturas ambiente controladas, tanto para o dia quanto para a noite. Isso foi observado mesmo com a temperatura ambiente aferida sendo semelhante à temperatura controlada para o dia de experimento. Lembrando que as temperaturas foram aferidas a partir das 8 da manhã. Não houve muita variação individual, indicando uma constância nas temperaturas dos indivíduos.

Tabela 13. Média e desvio padrão das variáveis resposta porcentagem do tempo total em salto e porcentagem do tempo em salto por minuto, e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* no experimento de aumento gradual da temperatura. temperaturas controladas: CP1 = dia 25°C / noite 20°C; CP2 = dia 28°C / noite 23°C; CP3 = dia 31°C / noite 26°C; CP4 = dia 34°C / noite 29°C; CP5 = dia 37°C / noite 32°C; CP6 = dia 40°C / 35°C.

<i>Rhinella diptycha</i>	Variáveis resposta experimento de comportamento de salto	
Variável preditora	Tempo total salto (%) MD ± SD	∑ tempo salto minuto (%) (1min / 2min / 3min / 4min / 5min)
CP1	35,6 ± 31,44	31 ± 39,4 / 39,33 ± 28,32 / 30,67 ± 31,19 / 42,67 ± 31,94 / 34,33 ± 35,84
CP2	33,47 ± 33,32	28,33 ± 31,97 / 41 ± 27,48 / 38,33 ± 35,49 / 24 ± 42,6 / 35,67 ± 37,78
CP3	36,11 ± 34,23	46,39 ± 34,95 / 28,61 ± 37,94 / 37,78 ± 33,19 / 36,67 ± 39,31 / 31,11 ± 38,93
CP4	38,47 ± 31,24	54 ± 29,5 / 36,33 ± 38,29 / 32 ± 39,75 / 33,67 ± 37,66 / 36,33 ± 24,34
CP5	32,06 ± 34,62	47,78 ± 37,94 / 25,56 ± 29,32 / 36,94 ± 39,16 / 25,56 ± 37,08 / 24,44 ± 41,04
CP6	23,1 ± 23,8	37,22 ± 28,73 / 30 ± 32,23 / 17,5 ± 24,26 / 14,72 ± 25,48 / 16,11 ± 19,6
n° amostral	5	5
Shapiro-Wilk	Não normal	-
Levene's	homogêneo	-
GLMM	valor de p = 1.022e-11	-
Tukey	CP1-CP3 = 0.02 CP2-CP3 = 0.0007 CP1-CP6 = 0.0007 CP2-CP4 = 0.04 CP2-CP = 0.02 CP3-CP6 < .001 CP4-CP6 < .001 CP5-CP6 < .001	-

Tabela 14. Média e desvio padrão das variáveis resposta porcentagem do tempo total em salto, e porcentagem do tempo em salto por minuto; e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas. Para indivíduos da espécie *L. labyrinthicus*, no experimento de aumento gradual da temperatura. temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/ noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C.

<i>L. labyrinthicus</i> Variável preditora	Variáveis resposta experimento de comportamento de salto	
	Tempo total salto (%) MD±SD	∑ tempo salto minuto (%) (1min/2min/3min/4min/5min)
CP1	52,6±18,1	52,6±9/36,8±5,6/61,6±6,1/71±7,8/40,5±8,1
CP2	55,9±17,9	73,3±13,1/43,3±7,8/49,1±9/58,3±11,3/55,5±10
CP3	62,8±13,9	75,1±10,8/60,1±10,5/64,1±8,8/72,6±7,5/41,8±8,3
CP4	59,3±7,1	75,1±11/48,5±11,6/70,1±10,6/40,8±6,3/61,6±10,6
CP5	63,3±11,7	66±9,3/76,8±7/62,5±11,5/53,5±9,5/57,5±8
CP6	56,4±18,8	72,6±18,3/69,3±6,5/53,3±16,3/45,1±16,1/41,3±6
n° amostral	6	-
Shapiro-Wilk	normal	-
Levene's	homogêneo	-
ANOVA de medidas repetidas	Não significativo	-

Figura 20. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental porcentagem do tempo total em salto para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*.

Os indivíduos foram mantidos na câmara climática e submetidos a variação gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/ noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C).

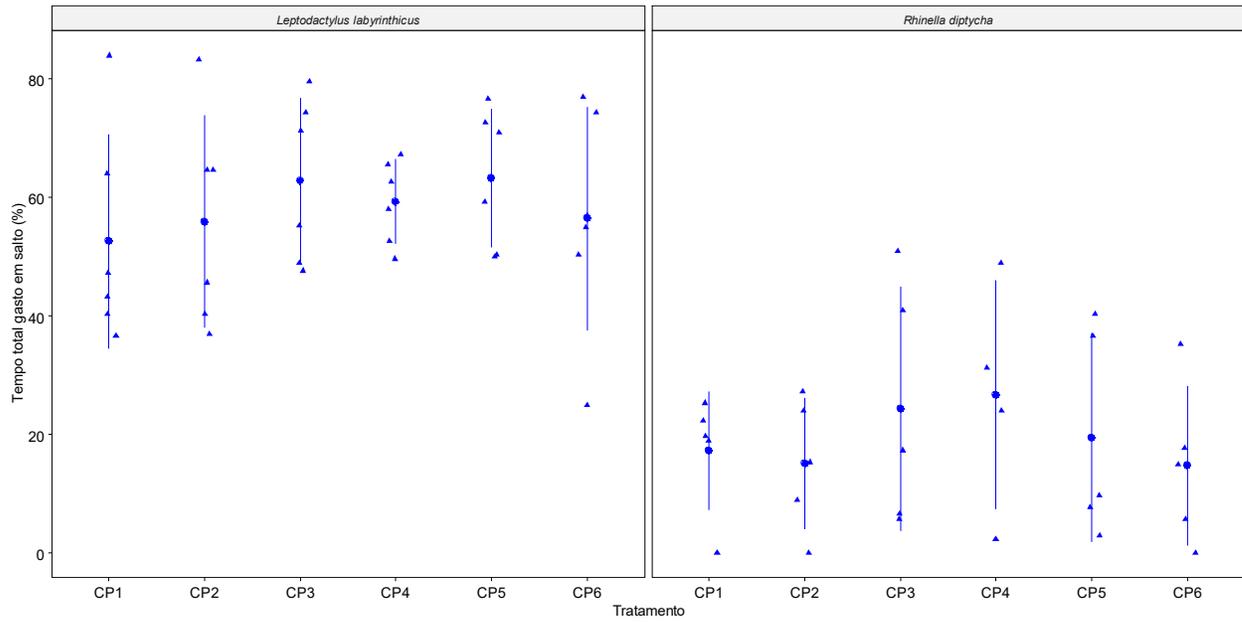


Figura 21. Média e desvio padrão da variável resposta comportamental porcentagem do tempo em salto por minuto para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*.

Os indivíduos foram mantidos na câmara climática e submetidos a variação gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/ noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C)

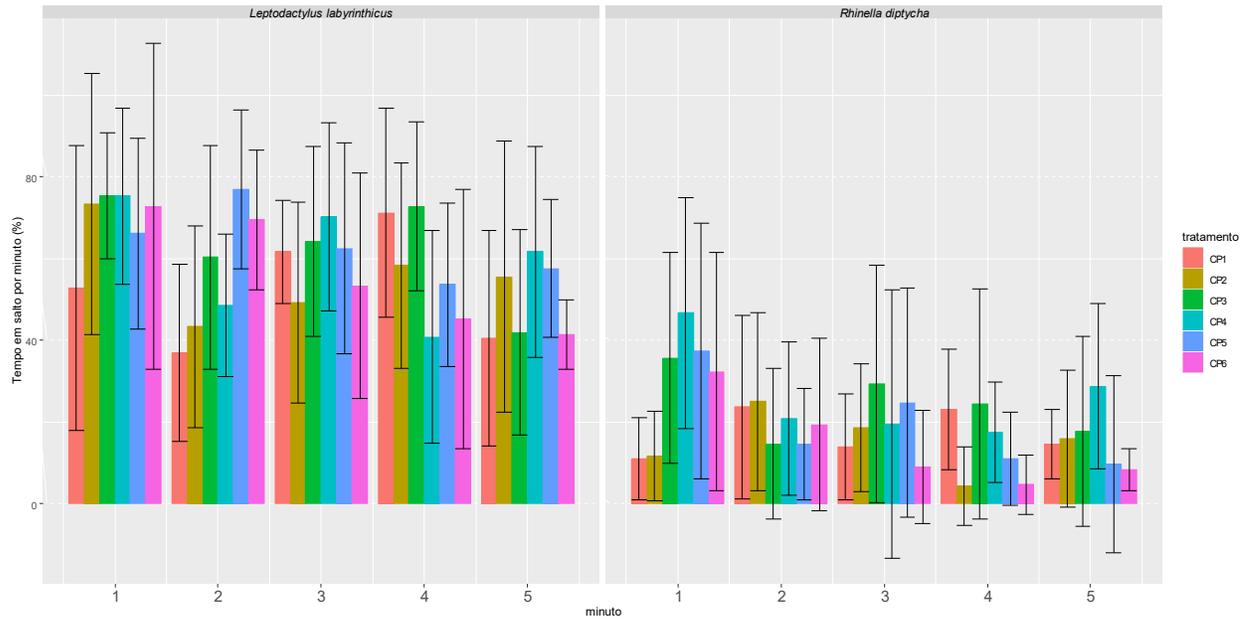


Figura 22. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental n° total de saltos para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*.

Os indivíduos foram mantidos na câmara climática e submetidos a variação gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/ noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C).

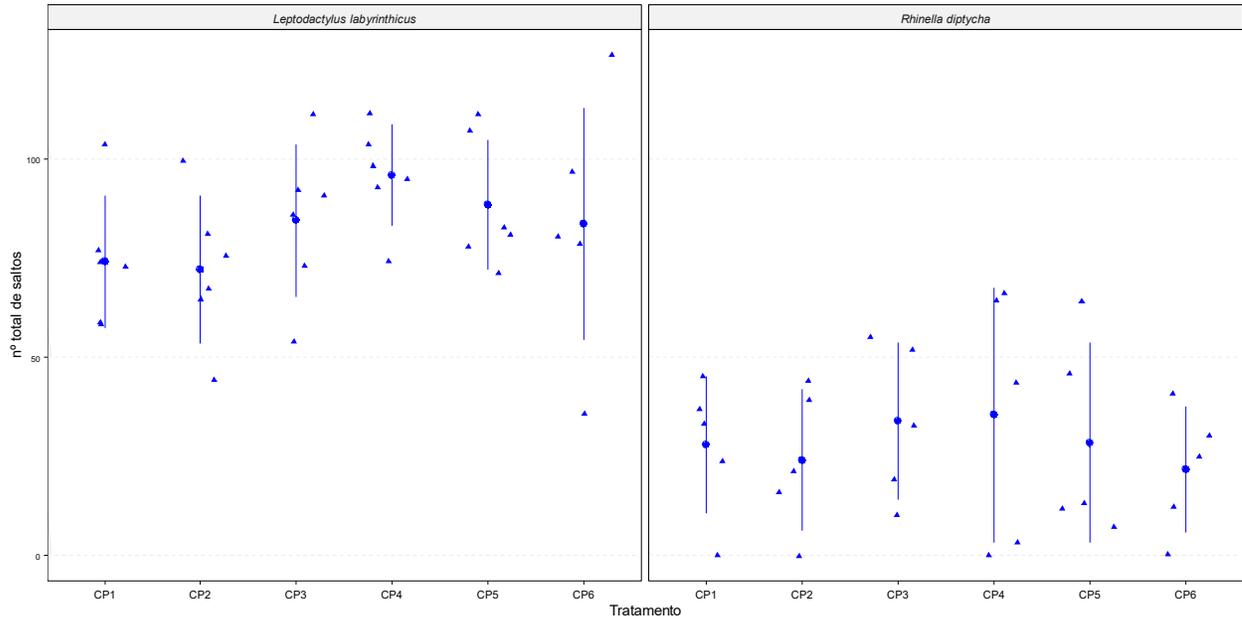


Figura 23. Média, desvio padrão da variável resposta comportamental nº de saltos por minuto para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*.

Os indivíduos foram mantidos na câmara climática e submetidos a variação gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/ noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C).

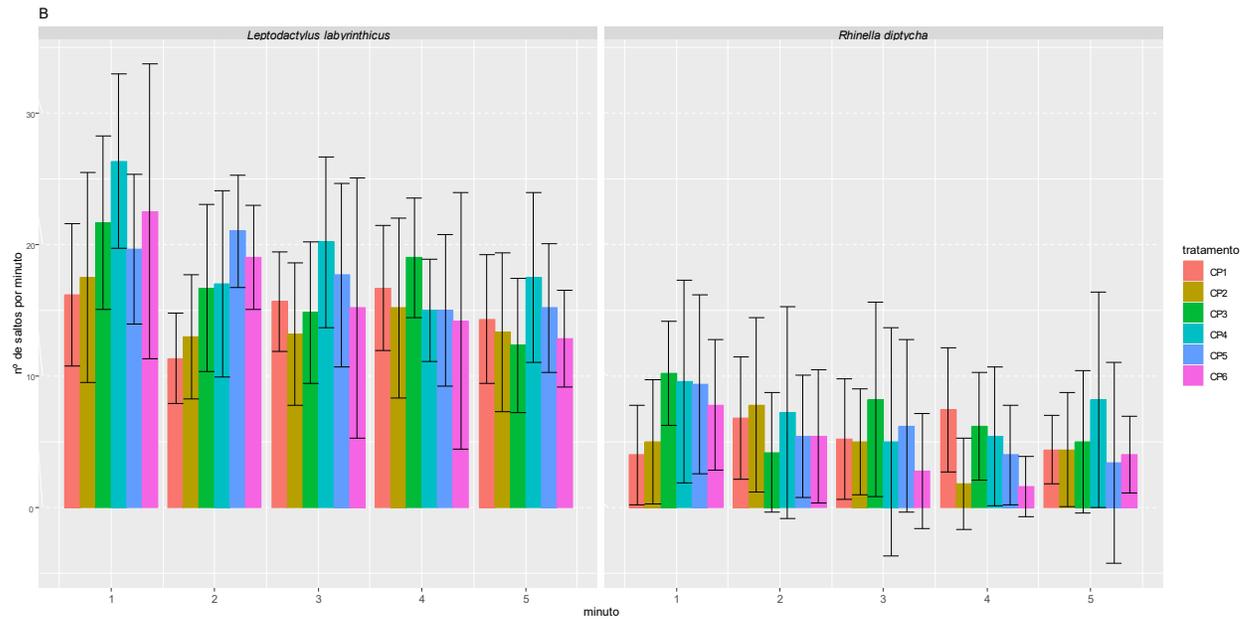


Tabela 15. Média e desvio padrão das variáveis resposta número total de saltos; somatório do número de saltos por minuto ( $\sum$  n° saltos minuto); tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC); e moda do tamanho de salto (Mo salto individuo); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissa.

Para indivíduos da espécie *L. labyrinthicus*, no experimento de aumento gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/ noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C).

<i>L. labyrinthicus</i>	Variáveis resposta experimento de comportamento de salto			
Variável preditora	Nº total de saltos (nº) MD±SD	$\sum$ nº saltos minuto (nº) MD±SD (1min/2min/3min/4min/5min)	DTS/CRC MD±SD	M <sub>o</sub> salto individuo (LL01/LL02/LL05/LL06/LL07/LL08 )
CP1	74±17	16±5 / 11±3 / 15±3 / 16±4 / 14±4	124,8±48	1 / 0,7 / 2 / 1,4 / 1,1 / 2,5
CP2	72±19	17±8 / 13±4 / 13±5 / 15±6 / 13±6	135,2±58	1,5 / 0,7 / 2,5 / 1,4 / 0,9 / 2
CP3	84,5±19	21±6 / 16±6 / 14±5 / 19±4 / 12±5	143,9±54	1,5 / 1,3 / 2,5 / 1,8 / 1,1 / 1,8
CP4	96±13	26±6 / 17±7 / 20±6 / 15±4 / 17±6	163,4±41	1,2 / 1,3 / 2,5 / 1 / 1,1 / 1,6
CP5	88,5±16	19±5 / 21±4 / 17±7 / 15±6 / 15±5	157,8±51	2 / 1,3 / 1,8 / 1,6 / 1,5 / 1,5
CP6	83,6±29	22±11 / 19±4 / 15±7 / 14±6 / 12±5	138,7±54	2 / 1,3 / 1,5 / 1,2 / 1,3 / 2
nº amostral	6	-	6	6
Shapiro-Wilk	normal	-	normal	normal
Levene's	homogêneo	-	homogêneo	homogêneo
ANOVA medidas repetidas	Não significativo	-	Não significativo	Não significativo

Tabela 16. Média e desvio padrão das variáveis resposta número total de saltos; número de saltos por minuto ( $\sum$  n° saltos minuto; salto individuo); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas. Para indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* no experimento de aumento gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C).

Variável preditora	Variáveis resposta experimento de comportamento de salto			
	Nº total de saltos (nº) MD±SD	$\sum$ n° saltos minuto (nº) MD±SD (1min/2min/3min/4min/5min)	DTS/CRC MD±SD	M <sub>o</sub> salto individuo (RD01/RD02/RD03/RD04/RD05/RD07)
CP1	45±45	8,5 ± 11,54 / 9,5 ± 7,82 / 8,33 ± 8,71 / 10,33 ± 8,33 / 8,33 ± 9,91	45 ± 44,88	1.3 / 0.9 / 0.8 / 1.2 / 0 / 1.2
CP2	37±37	8 ± 8,46 / 9,5 ± 7,23 / 7,83 ± 7,81 / 5 ± 8,44 / 7,17 ± 7,81	37,5 ± 36,72	1.3 / 0.9 / 0.8 / 1.2 / 0 / 1.2
CP3	51±46	14 ± 9,96 / 8,17 ± 10,53 / 11,5 ± 10,45 / 9 ± 7,77 / 8,67 ± 10,21	51,33 ± 46,45	1.3 / 0.9 / 1.2 / 1.0 / 0.7 / 1.2
CP4	51±48	12,83 ± 10,5 / 11,17 ± 12,09 / 8,5 ± 11,55 / 9,17 ± 10,36 / 9,5 ± 7,99	51,17 ± 48,14	1.3 / 0 / 1.2 / 1.4 / 1.0 / 1.9
CP5	45±47	12,5 ± 9,73 / 8,5 ± 8,41 / 10 ± 11,01 / 7,5 ± 9,22 / 7,17 ± 11,46	45,5 ± 47,57	1.1 / 1.1 / 1.0 / 1.2 / 0.8 / 1.6
CP6	36±38	10,33 ± 7,63 / 8,83 ± 9,56 / 5,67 ± 8,04 / 4,67 ± 7,79 / 6,5 ± 6,66	36 ± 38,05	1 / 0.9 / 1.0 / 1.4 / 0 / 1.6
nº amostral	5	5	6	6
Shapiro-Wilk	normal	-	normal	normal
Levene's	homogêneo	-	homogêneo	homogêneo
ANOVA de medidas repetidas	Não significativo	-	Não significativo	Não significativo

Figura 24. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*.

Os indivíduos foram mantidos na câmara climática e submetidos a variação gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/ noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C).

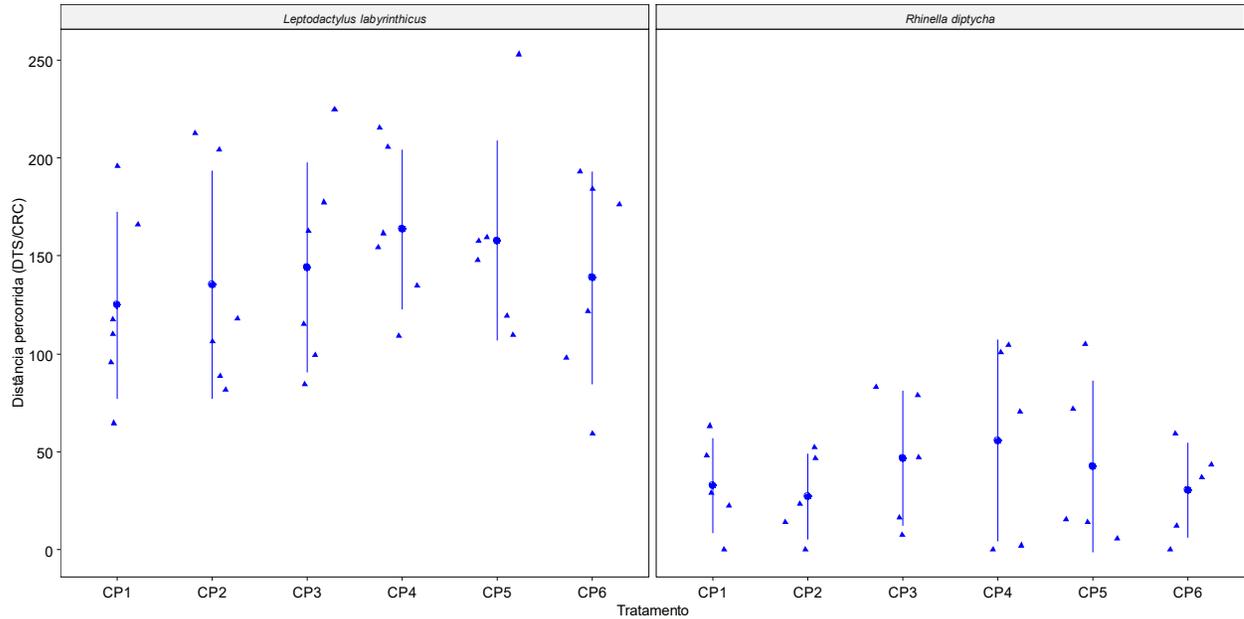


Figura 25. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental moda do tamanho do salto de cada indivíduo (Mo salto individuo padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) para as espécies.

Os indivíduos foram mantidos na câmara climática e submetidos a variação gradual da temperatura (temperaturas controladas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CP2= dia 28°C/noite 23°C; CP3= dia 31°C/noite 26°C; CP4= dia 34°C/noite 29°C; CP5= dia 37°C/ noite 32°C; CP6= dia 40°C/35°C).

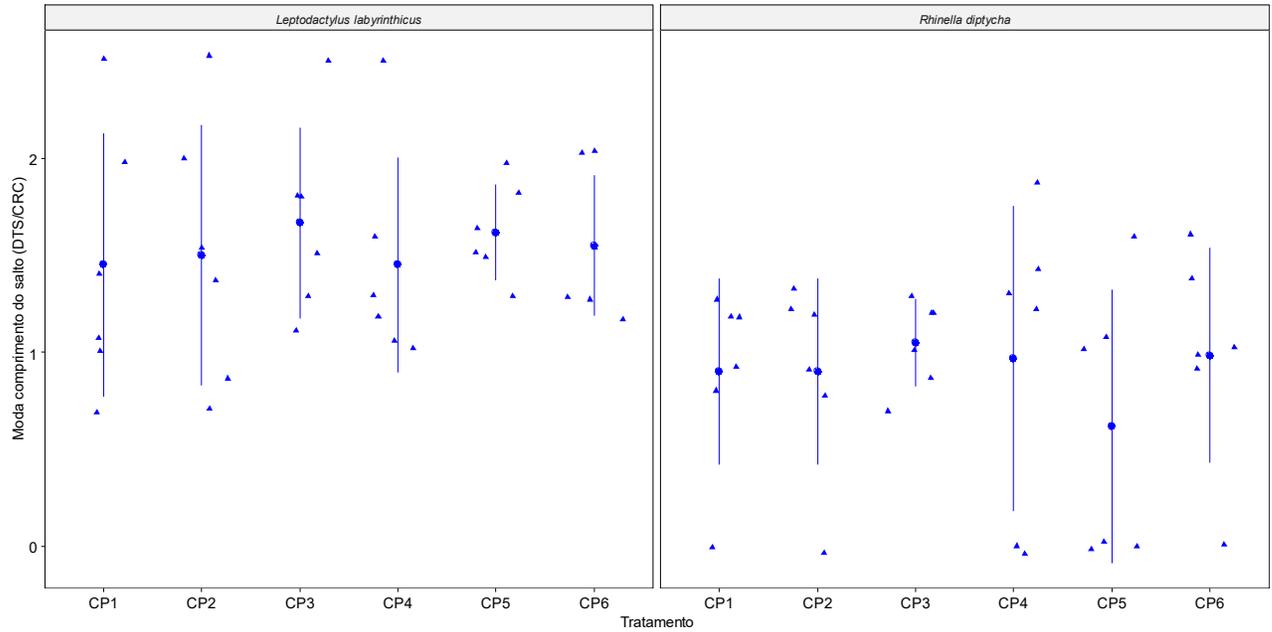


Tabela 17. Média e desvio padrão das variáveis resposta número total de saltos; número de saltos por minuto ( $\sum$  n° saltos minuto); tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal (DTS/CRC); e moda do tamanho do salto de cada indivíduo (Mo salto indivíduos). Comparação entre o primeiro dia de experimento de temperatura (CP1) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos da espécie *L. labyrinthicus* (temperaturas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CPURC1= temperatura ambiente).

<i>L. labyrinthicus</i>	Variáveis resposta experimento de comportamento de salto			
Variável preditora	Nº total de saltos (n°) MD±SD	$\sum$ n° saltos minuto (n°) MD±SD (1min/2min/3min/4min/5min)	DTS/CRC MD±SD	M <sub>o</sub> salto individuo (LL01/LL02/LL05/LL06/LL07/LL08)
CP1	74,1 ± 16,6	16,1 ± 5,4 / 11,3 ± 3,4 / 15,6 ± 3,7 / 16,6 ± 4,7 / 14,3 ± 4,9	124,8 ± 47,8	1 / 0,7 / 2 / 1,4 / 1,1 / 2,5
CPURC1	81,6 ± 27,2	22,3 ± 4,4 / 16 ± 4,9 / 16,5 ± 10,2 / 23 ± 4,6 / 13,1 ± 6,9	157,1 ± 47,5	1,5 / 1,3 / 3 / 1,6 / 1,3 / 2,5
n° amostral	6	6	6	6
Shapiro-Wilk	normal	-	normal	normal
Levene's	Homogêneo	-	Homogêneo	Homogêneo
Teste t pareado	Não significativo	-	Não significativo	valor de p =0.03

Tabela 18. Média e desvio padrão das variáveis resposta porcentagem do tempo total em salto, e porcentagem do tempo em salto por minuto. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas para indivíduos da espécie *L. labyrinthicus* (temperaturas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CPURC1= temperatura ambiente).

<i>L. labyrinthicus</i>	Variáveis resposta experimento de comportamento de salto	
Variável preditora	Tempo total salto (%) MD±SD	∑ tempo salto minuto (%) MD±SD (1min/2min/3min/4min/5min)
CP1	52.6±18	52.7±34.9 / 36.9±21.6 / 61.6±12.6 / 71.1±25.5 / 40.5±26.3
CPURC1	59.8±15.6	83.6±20.2 / 51.1±17.1 / 58.3±32.4 / 86.6±12.1 / 53.6±28.9
n° amostral	6	6
Shapiro-Wilk	Normal	-
Levene's	Homogêneo	-
Teste t pareado	Não significativo	-

Tabela 19. Média e desvio padrão das variáveis resposta número total de saltos; número de saltos por minuto ( $\sum$  n° saltos minuto), tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) e moda do tamanho do salto de cada indivíduo (Mo salto indivíduo). Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* (temperaturas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CPURC1= temperatura ambiente).

<i>Rhinella diptycha</i>	Variáveis resposta experimento de comportamento de salto			
Variável preditora	N° total de saltos (n°) MD±SD	$\sum$ n° saltos minuto (n°) MD±SD (1min/2min/3min/4min/5min)	DTS/CRC MD±SD	Mo salto indivíduo (LL01/LL02/LL05/LL06/LL07/LL08)
CP1	47±58	9,5 ± 10,79 / 9,5 ± 12,56 / 12,5 ± 18,93 / 12,75 ± 16,92 / 9,25 ± 12,69	68,7±102	1.3 / 0.9 / 0.8 / 0
CPURC1	54 ± 74	10,25 ± 13,91 / 9,25 ± 12,31 / 46,39 ± 34,95 / 42,92 ± 39,75 / 37,78 ± 33,19	89,2±131	1.3 / 0 / 1 / 0
n° amostral	4	4	4	4
Shapiro-Wilk	normal	-	normal	normal
Levene's	homogêneo	-	homogêneo	homogêneo
Teste t pareado	Não significativo	-	Não significativo	Não significativo

Tabela 20. Média e desvio padrão das variáveis resposta porcentagem do tempo total em salto e porcentagem do tempo em salto por minuto. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1); e resumo das análises estatísticas comparativas e seus respectivos testes de premissas, para indivíduos da espécie *Rhinella diptycha* (temperaturas: CP1= dia 25°C/noite 20°C; CPURC1= temperatura ambiente).

<i>Rhinella diptycha</i>	Variáveis resposta experimento de comportamento de salto	
Variável preditora	Tempo total salto (%) MD±SD	∑ tempo salto minuto (%) MD±SD (1min/2min/3min/4min/5min)
CP1	32.5 ± 40.4	29,58 ± 47,73 / 35,42 ± 35,02 / 27,08 ± 39,31 / 36,67 ± 42,8 / 34,17 ± 43,77
CPURC1	33.4 ± 44.6	31,67 ± 47,26 / 38,75 ± 39,96 / 31,67 ± 44,95 / 32,08 ± 46,38 / 32,92 ± 46,36
n° amostral	4	4
Shapiro-Wilk	normal	-
Levene's	homogêneo	-
Teste t pareado	Não significativo	-

Figura 26. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental porcentagem do tempo total em salto para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente).

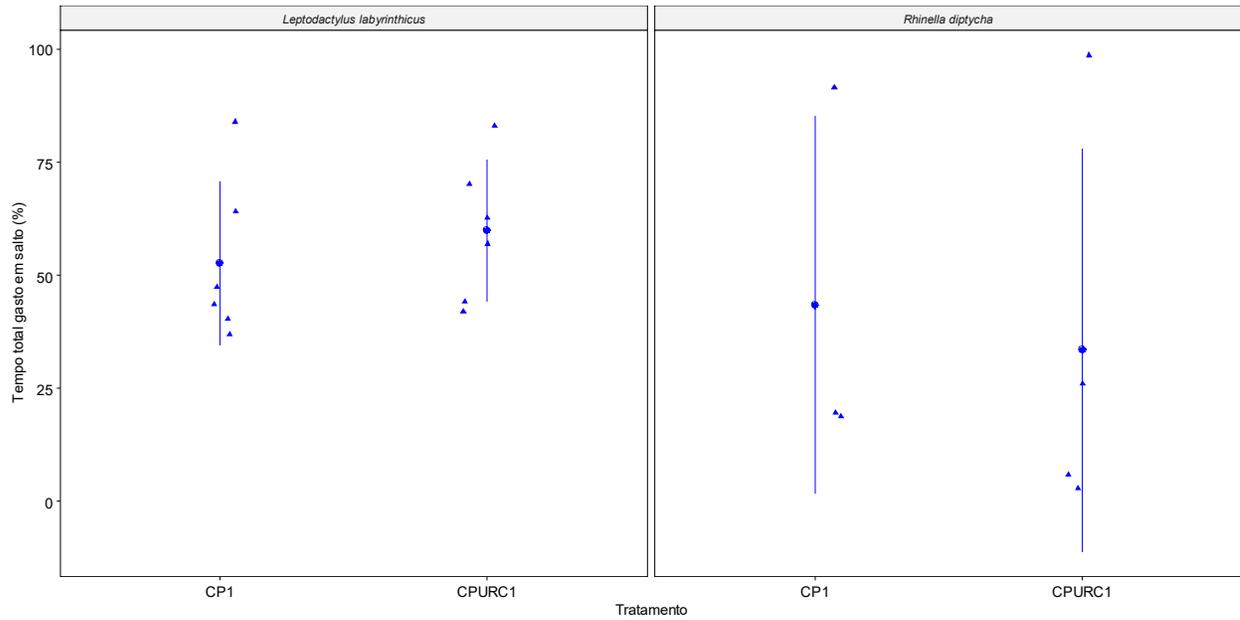


Figura 27. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental porcentagem do tempo em salto por minuto para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente).

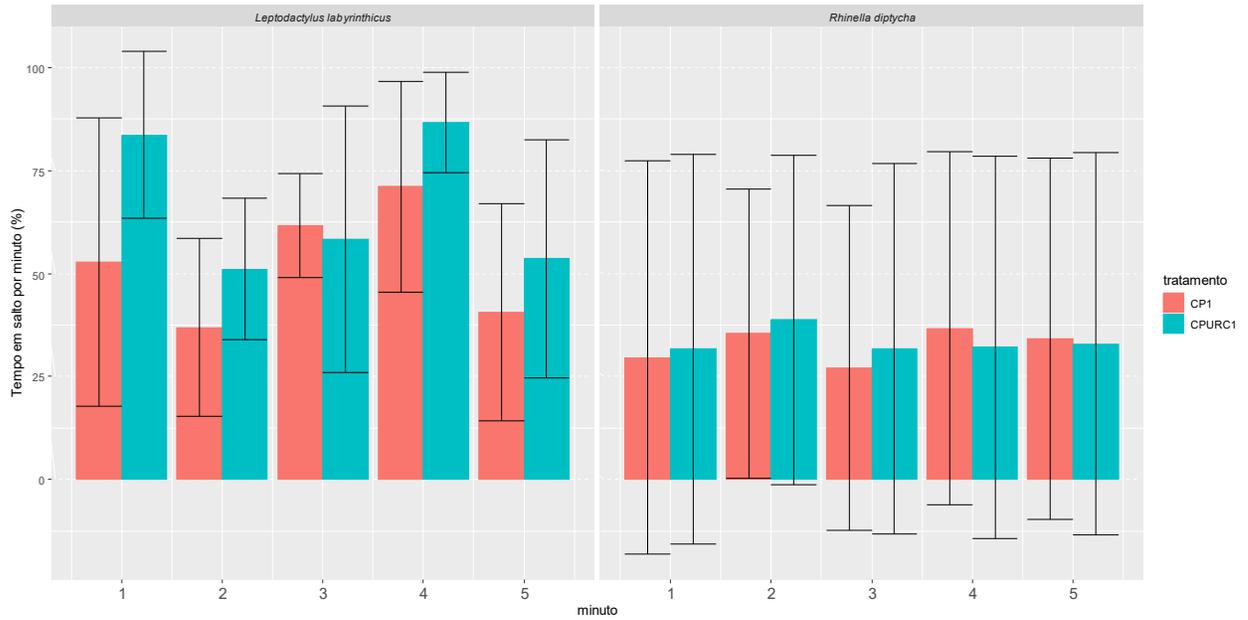


Figura 28. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental n° total de saltos para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/ noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente).

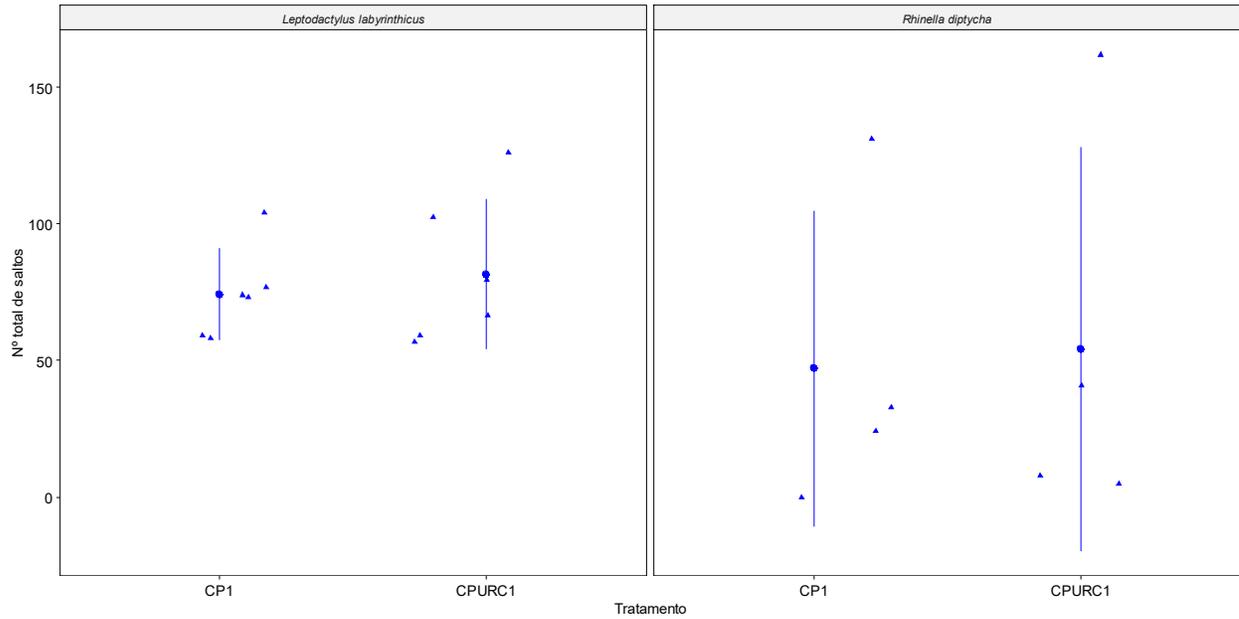


Figura 29. Média e desvio padrão da variável resposta comportamental nº de saltos por minuto para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente).

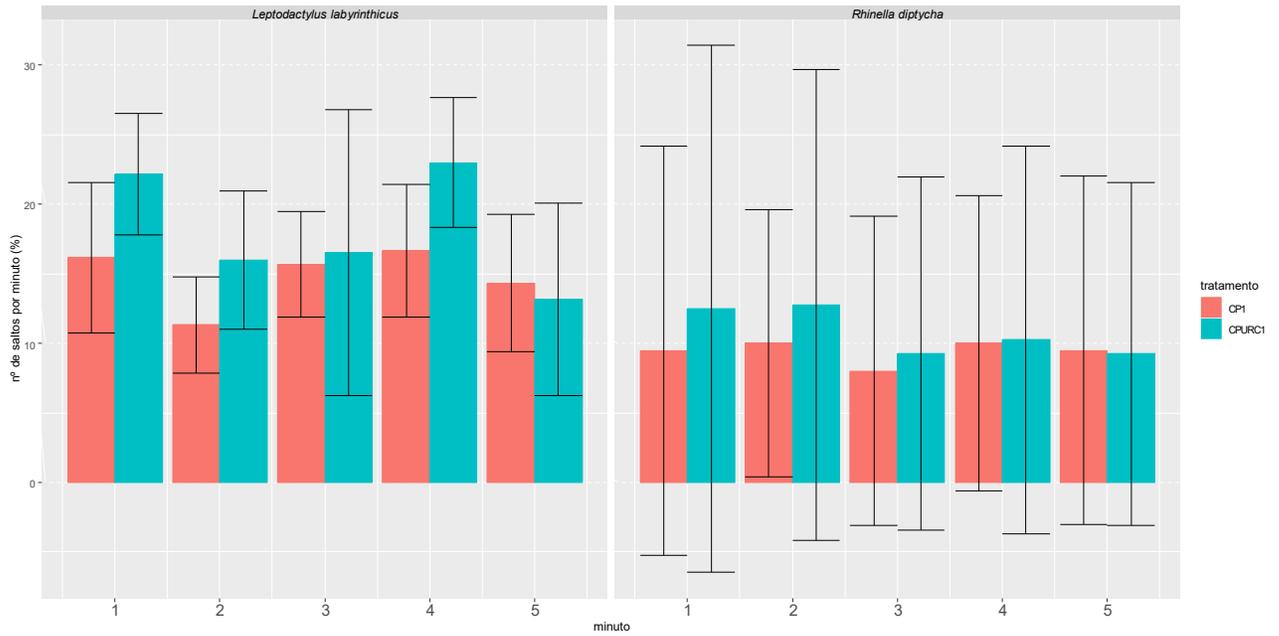


Figura 30. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental tamanho do salto (padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente).

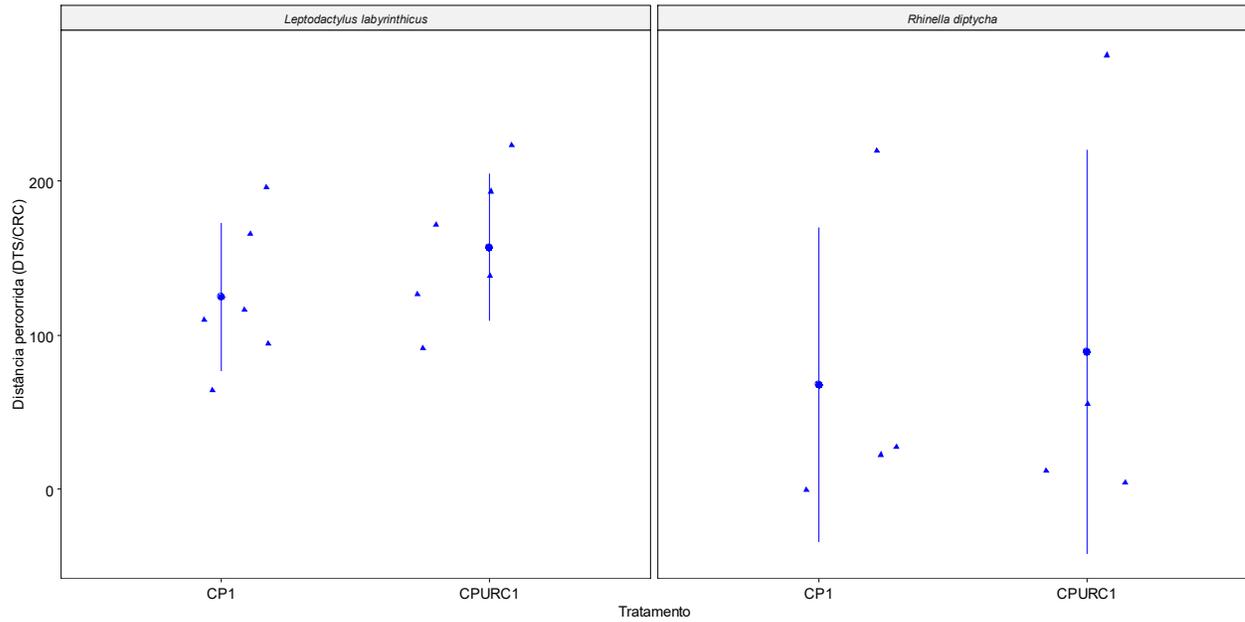


Figura 31. Média, desvio padrão e valores individuais (triângulos) da variável resposta comportamental moda do tamanho do salto de cada indivíduo (Mo salto indivíduo padronizado pelo comprimento rostro-cloacal, DTS/CRC) para as espécies *Leptodactylus labyrinthicus* e *Rhinella diptycha*. Comparação do primeiro dia de experimento de temperatura (CP1= dia 25°C/noite 20°C) e após o período de recuperação pós experimento de temperatura (CPURC1= temperatura ambiente).

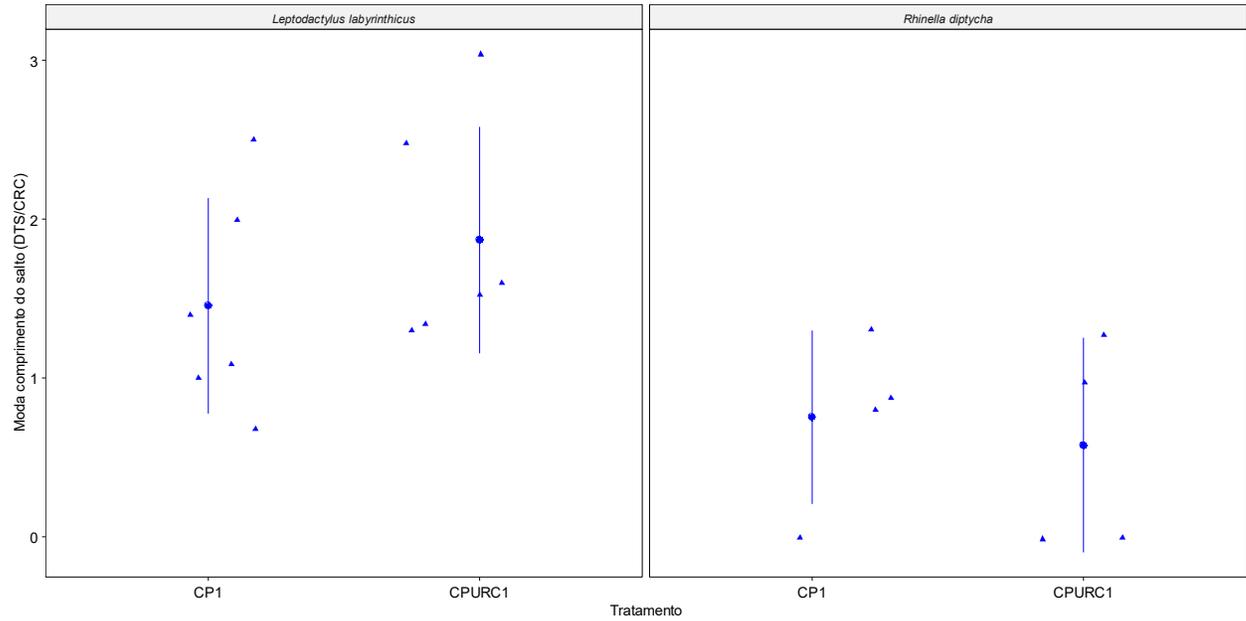
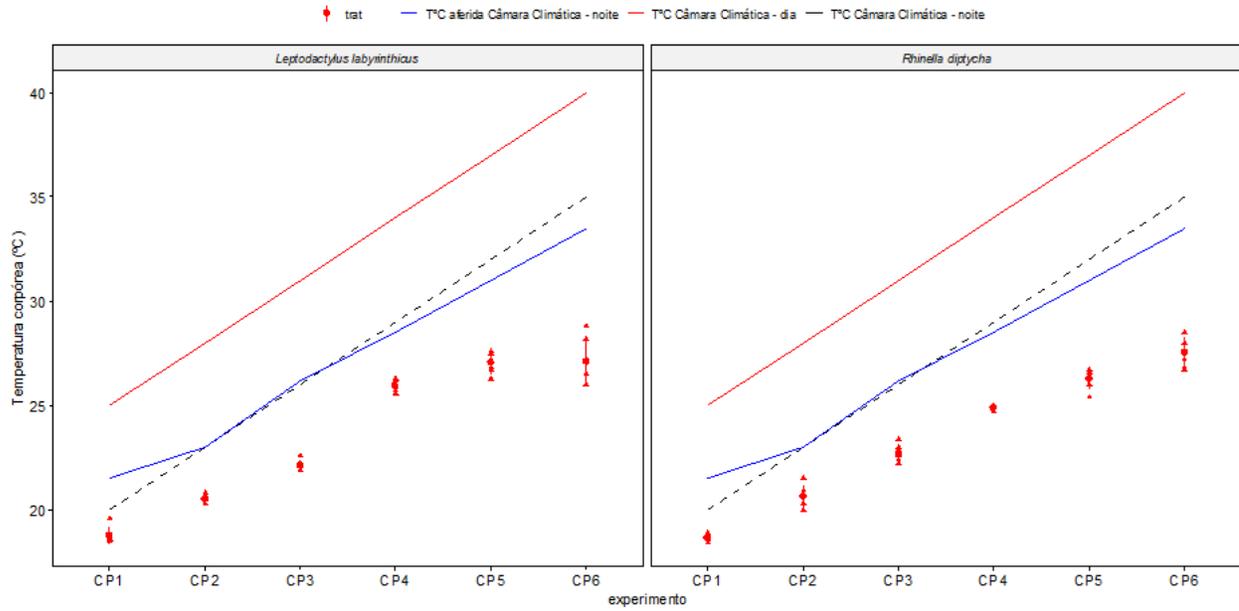


Tabela 21. Temperatura corpórea de *L. labyrinthicus* e *R. diptycha*, da câmara climática aferida durante o experimento de desempenho locomotor. Manutenção dia e noite são as temperaturas controladas na câmara climática.

Experimento	T°C câmara climática				
	manutenção dia	manutenção noite	aferida noite	Indivíduos <i>L. labyrinthicus</i> MD±SD	Indivíduos <i>R. diptycha</i> MD±SD
CP1	25	20	21.5	18,7 ± 0,4	18,63 ± 0,2
CP2	28	23	23	20,5 ± 0,2	20,65 ± 0,5
CP3	31	26	26.2	22,1 ± 0,28	22,7 ± 0,43
CP4	34	29	28.5	25,9 ± 0,27	24,8 ± 0,15
CP5	37	32	30	27 ± 0,5	26,30 ± 0,5
CP6	40	35	33.5	27 ± 1,1	27,53 ± 0,7
Nº amostral	-	-	-	6	6

Figura 32. Temperatura corpórea de *L. labyrinthicus* e *R. diptycha*, da câmara climática aferida durante o experimento de desempenho locomotor. Triângulos indicam os indivíduos, bola com barra indicam média e desvio padrão. Temperatura câmara climática dia e noite (linha) indicam temperatura controlada.



## Discussão geral

Como dito anteriormente, os anfíbios dependem da água para a sua sobrevivência, seja para a manutenção da homeostase hídrica do corpo ou como meio de reprodução e manutenção dos ovos para a perpetuação das espécies. Frequentemente essa dependência está mais relacionada ao micro-habitat do que aos aspectos gerais do ambiente. Por exemplo, tipo do solo, microbiota associada ao solo, umidade do solo e presença de corpos de água são mais diretamente relacionadas a absorção da água através da pele (Wells, 2007). Para *Pleurodema diplolistris*, uma espécie de anfíbio que vive em ambiente de Caatinga, a umidade mantida no solo de rios intermitentes é mais importante do que a umidade do ar em si, pois essa espécie se enterra nesses locais nos períodos de seca (Navas et al, 2004).

Outra característica importante para a sobrevivência das espécies no ambiente é a manutenção da microbiota cutânea (Woodhams et al., 2007). Este perfil microbiano depende das características do hábito de vida do anfíbio (Assis, 2011). Lauer *et al* (2007) mostraram que bactérias associadas à microbiota da pele da salamandra *Hemidactylium scutatum* liberam substâncias antifúngicas e Loudon 2013 mostrou que essa microbiota está diretamente ligada à associação entre espécies e micro-organismos encontrados no solo. Vaz e Navas 2016, mostraram que a comunidade microbiana foi alterada em cativeiro para *Scinax alcatraz*. Esta alteração pode levar a uma diminuição da ação anti-fúngica e antimicrobiana da microbiota, uma possível explicação para a alta mortalidade associada a parasitismo por larvas de moscas observada em *R. diptycha* neste trabalho. Além da ação da microbiota cutânea, Simmaco *et al.* (1998) discutem o papel de secreções com ação antimicrobiana, presentes na pele de vários grupos de anfíbios, como *Bufo bufo* e *Xenopus levis*. *X. labyrinthicus* possui uma secreção lipídica com ação tóxica e antimicrobiana por toda a superfície da pele (Gusmão *et al*, 2017), o que pode ser um motivo de maior resistência desta espécie a infecções de origem cutânea.

Nos experimentos feitos neste trabalho, as espécies estudadas realizam regulação osmótica dos seus fluidos corporais mediante estresse fisiológico causado por aumento gradual de temperatura. Podemos observar que embora os animais tenham sido alimentados da mesma forma no período após a captura e ao longo do experimento, houve perda significativa de peso. Embora tenha sido feito um experimento de desempenho locomotor de forma concomitante ao experimento de aumento de temperatura, as sessões de cinco minutos de experimentação não são suficientes para

explicar a variação observada, portanto podemos concluir que o gasto energético aumentado foi consequência da regulação osmótica e do maior gasto energético com temperaturas corpóreas mais altas. Isso implica que para estas espécies, um aumento da temperatura como o previsto pelo IPCC para as próximas décadas pode significar um desafio fisiológico importante, dado o gasto de energia aumentado necessário para manter a homeostase.

O hematócrito, porção do sangue composta por componentes celulares, não apresentou efeito significativo, indicando que os indivíduos eram capazes de se recuperar das sucessivas coletas de sangue, mesmo aqueles que sofriam punção cardíaca, indicando que as alterações vistas na osmolalidade eram causadas pela temperatura, e não pelas coletas de sangue.

A principal resposta observada nos parâmetros osmóticos do plasma das espécies estudadas foi a variação na osmolalidade, que aumentou em resposta ao desafio térmico induzido pelo experimento, indicando uma importante perda de água para o ambiente. O controle da osmolalidade do plasma e da urina é importante para manter as concentrações de íons nos tecidos adequadas aos processos fisiológicos do organismo. O principal componente da osmolalidade que apresentou variação foi a ureia, que é a principal excreta nitrogenada dos anuros. Os outros íons medidos (sódio, potássio) apresentaram pouca variação, à exceção de cloretos, que aumentaram de concentração em conjunto com ureia.

A análise do volume e da concentração osmótica da urina foi influenciada pela resposta fisiológica dos indivíduos de reabsorver a água presente na bexiga para regular a osmolalidade do plasma. Em vários indivíduos, principalmente de *Rhinella diptycha*, ao longo do experimento, não foi possível colher a urina, ou o volume não era suficiente para a análise. Esta ausência de urina é mais uma evidência de que os indivíduos estavam em situação de estresse fisiológico, e em si só é uma resposta importante do experimento. Nos indivíduos que apresentaram urina ao longo do experimento, as concentrações osmóticas variaram bastante, com a osmolalidade das concentrações de osmólitos decaindo ao longo do experimento. Entretanto, *Leptodactylus labyrinthicus* não apresentou diferença entre Controle e Tratamento, indicando que a variação encontrada pode ser resultado do estresse de manipulação. Estes indivíduos também estavam sempre em contato com água, o que pode ter auxiliado na regulação osmótica.

Esta regulação osmótica ativa, com absorção de água da bexiga e perda de peso é mais um indicativo de que estas espécies tenderão a sofrer com a mudança climática, já que junto com o aumento de temperatura, ocorrerão mudanças na cobertura vegetal, precipitação e presença de

corpos de água disponíveis. Esta escassez de água, junto com o aumento da temperatura tende a resultar em uma perda de habitat úmido, pois anuros são extremamente dependentes de água ao ar livre para se reproduzir, e *Leptodactylus labyrinthicus* tem um hábito aquático, passando a maior parte do tempo imerso em poças ou córregos. Além disso, a perda de peso observada ao longo do experimento indica que estes indivíduos precisarão se alimentar com mais frequência, se deslocando mais ou buscando alimentos mais energéticos, o que pode ser dificultado pela perda de habitat causada pelo desmatamento das regiões de ocorrência atuais dessas espécies.

No experimento de baixa umidade, os indivíduos de *Leptodactylus labyrinthicus* foram desidratados até 20% a menos do seu peso corporal inicial. As medidas de osmolalidade foram feitas novamente, permitindo uma comparação do indivíduo recém-captura e após o período de recuperação do experimento. O hematócrito não variou, mas a Osmolalidade aumentou, evidenciado pelo aumento do osmólito e íons, indicando que a perda de água causada pelo ar seco é um importante estressor fisiológico. Isto, associado aos resultados do experimento de aumento gradual de temperatura, indica que, nas regiões em que está previsto uma diminuição da precipitação e umidade do ar devido às mudanças climáticas, esta espécie estará sob constante estresse fisiológico, podendo ter sua distribuição alterada ou mesmo sofrendo extinções locais.

Os resultados expostos acima para o efeito do aumento gradual de temperatura sobre o desempenho locomotor indicam que estas espécies são capazes de tolerar bem um stress térmico crônico. O aumento gradual da temperatura utilizado neste experimento causou mudanças nos parâmetros fisiológicos de osmolalidade do plasma e da urina, conforme descrito no capítulo anterior, indicando que os animais estavam realmente submetidos a um stress fisiológico, tendo de ajustar seu metabolismo em resposta a este stress. Porém, não foi observado neste experimento um efeito macroscópico no desempenho locomotor destes animais, ao contrário do que seria esperado com base nos efeitos fisiológicos. É de se esperar que mudanças fisiológicas na regulação osmótica afetem o desempenho locomotor dos animais, ao afetar as concentrações de íons no plasma e urina (Moore e Gatten, 1989). Principalmente, a ausência de urina em *R. diptycha* é indicativo de stress hídrico, pois esta espécie utiliza a bexiga como armazenamento de água, reabsorvendo-a quando necessário para manter sua homeostase (Steen, 1929). Isto, em conjunto com a constante troca de pele que foi observada nesta espécie durante todo o experimento, implica em um gasto considerável de energia para manutenção da homeostase. Este gasto excessivo deixaria menos energia disponível para uso em locomoção, o que deveria diminuir ou o tamanho do salto, ou

número de saltos. Embora o salto seja um método de locomoção eficiente para Anura (Emerson, 1978), foi induzido neste experimento um salto constante (por estimulação mecânica constante do uróstilo) que, junto ao gasto de energia aumentado para manutenção da homeostase, deveria resultar em um aumento da fadiga (Moore e Gatten, 1989). Este aumento deveria se refletir na diminuição do número de saltos ou do tamanho dos saltos. Entretanto, isto não foi observado neste trabalho. *R. diptycha* é uma espécie resiliente, de hábito terrestre, que frequentemente se desloca grandes distâncias entre corpos de água, e que é capaz de aguentar períodos de seca e escassez de alimento. Isto é visto pelo estado de magreza em que os indivíduos estavam no momento da captura. A captura dos animais foi feita no período imediatamente após as primeiras chuvas da estação, em que os animais saíam de seus esconderijos para se alimentar e reproduzir após um longo período de baixa atividade, mostrando que *R. diptycha* é uma espécie resistente ao estresse fisiológico prolongado.

Por ter a pele muito úmida e um hábito semi-aquático, a manutenção de *L. labyrinthicus* em cativeiro necessita de um corpo de água constante no recinto do animal, o que pode ter contrabalançado os efeitos do estresse térmico por aumento gradual de temperatura, pelo fato de que os animais estavam sempre em contato com água, ajudando a manter a homeostase hídrica.

Estes resultados mostram que as duas espécies estudadas mantêm sua homeostase e sua capacidade de deslocamento mediante estresse causado por aumento gradual de temperatura. No cenário atual de mudanças climáticas, esta capacidade de resistir a temperaturas mais altas representa uma importante vantagem de sobrevivência, dado que as projeções atuais de aquecimento global estão próximas de 1,5°C nas próximas décadas (IPCC). Embora as espécies tenham apresentado resistência ao estresse térmico de longa duração, isto se dá principalmente pela sua capacidade de regular a osmolalidade do seu plasma e urina, um investimento energético grande, e que depende da disponibilidade de água no ambiente.

Uma temperatura mais alta resulta em uma evapotranspiração maior, causando perda de água e massa corporal. As previsões de aumento de temperatura também estão associadas a mudanças ecológicas, principalmente associadas ao desmatamento, que leva a perda de habitat. O alto desmatamento atual observado nos biomas de Cerrado e Mata Atlântica, habitats destas espécies, tende a perturbar o ciclo hidrológico, principalmente reduzindo as taxas de precipitação, e assim levando à seca de corpos de água como rios, lagos e poças temporárias. *L. labyrinthicus*, por ter hábito aquático, depende de corpos de água ao livre em todas as fases da sua vida. Além disso, por

terem uma pele muito úmida e fina, eles não têm uma grande capacidade de se deslocar de uma poça para outra em grandes distâncias, pois perdem água muito rapidamente quando expostos ao ar, sendo, portanto, extremamente sensíveis à diminuição da precipitação e aumento da temperatura previstos pelo IPCC. *R. diptycha* tem um hábito terrestre, e apresenta uma pele mais grossa e seca, tendo uma resistência cutânea à evapotranspiração maior que *L. labyrinthicus*, sendo frequentemente encontrado a grandes distâncias de corpos de água. Isto, associado à sua capacidade de reter água dentro da bexiga, o torna uma espécie mais resistente às mudanças climáticas e à perda de habitat devido ao desmatamento e secas, porém ainda depende muito de corpos de água abertos, principalmente para sua reprodução.

A variação encontrada entre a temperatura corporal e a temperatura ambiente, embora inesperada, pode significar uma capacidade de resistência a mudanças de temperatura ambiental, porém nosso delineamento experimental não permite fazer inferências sobre isso.

## Conclusão

Os experimentos feitos neste trabalho ressaltam a fragilidade da situação atual dos anuros mediante o cenário atual de mudanças climáticas e perda de habitat. Mesmo *Rhinella diptycha*, uma espécie de hábito terrestre, tida como resistente a seca, apresentou mudanças severas nos seus parâmetros de regulação osmótica, com perda de peso e alteração das concentrações de osmólitos no plasma. O mesmo padrão foi visto para *Leptodactylus labyrinthicus*, uma espécie extremamente dependente de corpos de água ao ar livre. Ambas as espécies têm uma distribuição ampla, porém seus habitats estão ameaçados pelo desmatamento, que diminui a cobertura vegetal e conseqüentemente perturba os padrões locais de precipitação. Além disso, o desmatamento também afeta a disponibilidade de alimento para estes indivíduos, que embora generalistas, acabam precisando se deslocar mais para encontrar alimentos, o que se torna um problema quando estes indivíduos já estão em uma condição fisiológica debilitada devido ao stress causado pelo aumento de temperatura.

O stress fisiológico causado pelo aumento de temperatura, associado à menor disponibilidade de água e alimentos, pode tornar a sobrevivência destes animais inviável nas novas condições ambientais que estão surgindo devido à mudança climática global, urgindo medidas de conservação para mitigar estes impactos e impedir a extinção de populações destas espécies.

## Referências

- AGOSTINHO, C. A., FORESTI, F., LIMA, S. L., & JIM, J. (2013). Reproduction and population size of *Leptodactylus labyrinthicus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). **Russian Journal of Herpetology**, 9(1), 15-20.
- AGRE, P. The aquaporin water channels. **Proc. Am. Thorac. Soc.** v. 3, p. 5-13, 2006.
- ASSIS, A. B. (2011). Análise sobre a microbiota cutânea de anfíbios em fragmentos de floresta atlântica e sua eficácia contra agentes patogênicos. **Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 104p.**
- ASSIS, V.R.; TITON, S.C.M.; BARSOTTI, A.M.G.; TITON JR.; B.; GOMES, F.R. Effects of acute restraint stress, prolonged captivity and transdermal corticosterone application on immune competence and plasma levels of corticosterone on the cururu toad (*Rhinella icterica*). **Plos One** v. 10 n. 4, e0121005.; 2015.
- BEEBEE, T.; GRIFFITHS, R. A. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? **Biological Conservation** n. 125 p. 271-285. 2005.
- BENGA, G. 2009. Water Channel Proteins (Later Called Aquaporins) and Relatives: Past, Present, and Future. **Life**, v. 61 n. 2, p. 112–133. 2009.
- BENNETT AF, HUEY RB. 1990. Studying the evolution of physiological performance. **Oxford Surv. Evol. Biol.** 7:251–84
- BENTLEY, A. J; YORIO, T. Do frogs drinks? **Journal of Experimental Biology** n. 79, p. 41-46. 1979.
- BLAUSTEIN, A. R; HAN, B. A.; RELYEA, R. A.; JOHNSON, P. T. J.; BUCK, J. C.; GERVASI, S. S.; KATS, L. B. The complexity of amphibian population declines: Understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. **Annals of the New York Academy of Sciences** n. 1223 p. 108-19. 2011.
- BLAUSTEIN A. R.; WALLS S. C.; BANCROFT B. A.; LAWLER J. J.; SEARLE C. L.; GERVAST S. S. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. **Diversity** n. 2010, p. 281–313. 2010.
- BUCKERIDGE, M. **Biologia & Mudanças Climáticas no Brasil: Rima.** 2008.
- BURGGREN, W. W. Developmental physiology, animal models, and the August Krogh principle. **Zoology** n. 102 p.148-156. 1999.
- BURGGREN, W. W. ; WARBURTON, S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. **ILAR Journal**, v. 48 p. 260-269. 2007.

- CAREY, C.; HEYER, W. R.; WILKINSON, J.; ALFORD, R. A.; ARNTZEN, J. W.; HALLIDAY, T.; HUNGERFORD, L.; LIPS, K. R.; MIDDLETON, E. M.; ORCHARD, S. A.; RAND, A. S. Amphibian declines and environmental change: Use of remote-sensing data to identify environmental correlates. **Conservation Biology**, n. 15, p. 903-913. 2001.
- CARTLEDGE, V. C.; WITHERS, P. C.; MCMASTER, K. A.; THOMPSON, G. G.; AND BRADSHAW, S. D. Water balance of field-excavated aestivating Australian desert frogs, the cocoon-forming *Neobatrachus aquilonius* and the non-cocooning *Notaden nichollsi* (Amphibia: Myobatrachidae). **The Journal of Experimental Biology**, n. 209 p.3309-21. 2006.
- CHAPLIN, MARTIN. (2001). Water: its importance to life. **Biochemistry and Molecular Biology Education**. 29. 54 - 59.
- CHRISTENSEN, C. U. Adaptations in the water economy of some anuran amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology** n. 47A, p. 1035-1049. 1974.
- DABÈS, L.; BONFIM, V.; NAPOLI, M. F.; AND KLEIN, W. Water balance and spatial distribution of an anuran community from Brazil. **Herpetologica** n. 68, v. 443-455. 2012.
- DODD, C. Kenneth (Ed.). **Amphibian ecology and conservation: a handbook of techniques**. Oxford University Press, 2010.
- DUELLEMAN, W. E. AND TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill, New York. 1986.
- ELIAS, H. AND SHAPIRO, J. Histology of the skin of some toads and frogs. **American Museum Novitates** n. 1819, p. 1-27. 1957.
- EMERSON, S. B. (1978). Allometry and Jumping in Frogs: Helping the Twain to Meet. **Evolution**
- GABOR CR, FISHER MC, BOSCH J. Elevated Corticosterone Levels and Changes in Amphibian Behavior Are Associated with *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) Infection and Bd Lineage. **PLoS ONE** v.10 n.4, e0122685. doi:10.1371/journal.pone.0122685 . 2015.
- GONDIM-SILVA F.A.T.; ANDRADE, A.R.S.; ABREU, R.O.; NASCIMENTO, J.S.; CORRÊA, G.P.; MENEZES, L.; TREVISAN, C.C.; CAMARGO, S.S.; NAPOLI, M.F. Composition and diversity of anurans in the Restinga of the Conde municipality, northern coast of the state of Bahia, northeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 16 n. 3, e20160157. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2016-0157>. 2016.
- GORDON, M. S.; SCHMIDT-NIELSEN, K.; AND KELLY, H. M. Osmotic regulation in the crab-eating frog (*Rana cancrivora*). **Journal of Experimental Biology**, n. 38 p. 659-678. 1961.
- GREENWALD, L. Sodium balance in amphibians from different habitats. **Physiological Zoology**, n. 45 p. 229-237. 1972.

GUSMÃO, K.A.G., DOS SANTOS, D.M., SANTOS, V.M. ET AL. Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae): characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis** **23**, 4 (2017).

HEYER WR. 1969. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution** **23**: 421–42

HOPKINS, G.R.; BRODIE JR.; E.D.; NEUMAN-LEE, L.A.; MOHAMMADI, S.; BRUSCH IV, G.A.; HOPKINS, Z.M.; FRENCH, S.S. Physiological responses to salinity vary with proximity to the ocean in a coastal amphibian. **Physiological and Biochemical Zoology**, n. 89, p. 322-330. 2016.

JANIN A, LÉNA J-P, JOLY P. Beyond occurrence: Body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. **Biological Conservation**, v. 144, p. 1008–1016. 2011.

JENSEN, L. J.; WILLUMSEN, N. J.; AMSTRUP, J. AND HVIID LARSEN, E. H.: Proton pump-driven cutaneous chloride uptake in anuran amphibia, **Biochim. Biophys. Acta**, n. 1618, p. 120–132, 2003.

JONES P.D; NEW M; PARKER D.E; MARTIN S; RIGOR I.G. Surface air temperature and its changes over the past 150 years. **Reviews of Geophysics**, v. 37, n. 2, p. 173-199. 1999.

JORGENSEN, C. B. Water economy in a terrestrial toad (*Bufo bufo*), with special reference to cutaneous drinking and urinary bladder function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, n. 109, p. 311-324. 1994.

KLEIN, W.; DABÉS, L. ; BONFIM, V. M. G. ; MAGRINI, L. ; NAPOLI, M. F. Allometric relationships between cutaneous surface area and body mass in anuran amphibians. **Zoologischer Anzeiger**, v. 263, p. 45-54. 2016.

KONNO N, HYODO S, TAKEI Y, MATSUDA K, UCHIYAMA M. Plasma aldosterone, angiotensin II and arginine vasotocin concentrations in the toad, *Bufo marinus*, following osmotic treatments. **Gen Comp Endocrinol**, n. 140, p. 86–93. 2005.

LAUER A, SIMON MA, BANNING JL, ANDRE E, DUNCAN K, HARRIS RN. (2007). Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can inhibit pathogenic fungi. **Copeia** **2007**: 630–640.

LOUDON, A., WOODHAMS, D., PARFREY, L. ET AL. Microbial community dynamics and effect of environmental microbial reservoirs on red-backed salamanders (*Plethodon cinereus*). **ISME J** **8**, 830–840 (2013)

MIOT, HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **J Vasc Bras**. n. 10, p. 275-8.2011.

MOORE, FRANKLIN R.; GATTEN JR, ROBERT E. Locomotor performance of hydrated, dehydrated, and osmotically stressed anuran amphibians. **Herpetologica**, p. 101-110, 1989.

NAGEL, W, SOMIESKI, P, KATZ, U. The route of passive chloride movement across amphibian skin: localization and regulatory mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1566, n. 1-2, p. 44-54, 2002.

NAVAS C. A., M. M. ANTONIAZZI, E C. JARED. 2004. A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. Pp. 298-305, in S. Morris and A. Vosloo, eds. **International Congress Series**. Vol. 1275. **Animals and Environments. Proceedings of the Third International Conference of Comparative Physiology and Biochemistry**. Elsevier, Cambridge and Oxford.

OGUSHI, Y.; AKABANE, G.; HASEGAWA, T.; MOCHIDA, H.; MATSUDA, M.; SUZUKI, M.; TANAKA, S. Water adaptation strategy in anuran amphibians: Molecular diversity of aquaporin. **Endocrinology** v. 151, p. 165-73. 2010a.

OGUSHI, Y.; TSUZUKI, A.; SATO, M.; MOCHIDA, H.; OKADA, R.; SUZUKI, M.; HILLYARD, S. D.; AND TANAKA, S. The water-absorption region of ventral skin of several semiterrestrial and aquatic anuran amphibians identified by aquaporins. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v. 299, p. :1150-1162. 2010b.

PEREYRA, MARTÍN & BLOTTO, BORIS L. & BALDO, DIEGO & CHAPARRO, JUAN CARLOS & RON, SANTIAGO & ELIAS-COSTA, AGUSTÍN & IGLESIAS, PATRICIA & VENEGAS, PABLO & THOMÉ, MARIA TEREZA & OSPINA-SARRIA, JHON & MACIEL, NATAN & RADA, MARCO & KOLENC, FRANCISCO & BORTEIRO, CLAUDIO & RIVERA-CORREA, MAURICIO & ROJAS-RUNJAIC, FERNANDO & MORAVEC, JIRÍ & DE LA RIVA, IGNACIO & WHEELER, W.C. & FAIVOVICH, JULIÁN. (2021). Evolution in the Genus *Rhinella*: A Total Evidence Phylogenetic Analysis of Neotropical True Toads (Anura: Bufonidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. 447. 1–156. 10.1206/0003-0090.447.1.1.

PONSSA ML, BARRIONUEVO JS, PUCCI ALCAIDE F, PUCCI ALCAIDE A. Morphometric Variations in the Skin Layers of Frogs: An Exploration Into Their Relation With Ecological Parameters in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), With an Emphasis on the Eberth-Kastschenko Layer. **Anat Rec (Hoboken)**. 2017 Oct;300(10):1895-1909.

PRATES, I.; NAVAS, C. A. Cutaneous Resistance to Evaporative Water Loss in Brazilian *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from Contrasting Environments. **Copeia** 2009(3), 618-622.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence, **Zoological Journal of the Linnean Society**, Volume 146, Issue 3, March 2006, Pages 407–452,

PEÑA-VILLALOBOS, I, NARVÁEZ, C, SABAT, P. Metabolic cost of osmoregulation in a hypertonic environment in the invasive African clawed frog *Xenopus laevis*. **Biology Open** 2016 : doi: 10.1242/bio.016543. 2016.

POUGH, F. H.; TAIGEN, T. L.; STEWART, M. M.; BRUSSARD, P. F. Behavioral modification of evaporative water loss by a Puerto Rican frog. **Ecology** v. 64, p. 244-252. 1983.

QUINN, G.; KEOUGH, M. J. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. 2002  
RIBEIRO, P. L.. NAVAS, C. A macrofisiologia e sua importância em estudos em mudanças climáticas. **Revista da Biologia**; v. 8, p. 1-4. 2012.

ROCHA G.C.; FERREIRA C.M.; TEIXEIRA P.C.; DIAS D.C.; FRANÇA F.M.; ANTONUCCI A.M.; MARCANTÔNIO A.S.; LAURETTO, M. Physiological response of American bullfrog tadpoles to stressor conditions of capture and hypoxia. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 30, n. 10, p.: 891-896, 2010.

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**, v. 169, p. 179-186, 1999.

ROMERO, L.M.; REED, J.M.; Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? **Comp. Biochem. Physiol. A** v. 140, p. 73–79 2005.  
SHOEMAKER, V. NAGY, K. A. Osmoregulation in amphibians and reptiles. **Annual Review of Physiology**; v. 39, p. 449-471, 1977.

SCHMIDT-NIELSEN, K. 2002. Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente. **Editora Santos**.

SILVA, WAGNER & GIARETTA, ARIIVALDO & FACURE, KATIA. (2005). On the natural history of the South American pepper frog, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Natural History*. 39. SILVANO, D. L. SEGALLA, M. V. Conservation of brazilian amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, p. 653-658. 2005.

SIMMACO, M., MIGNOGNA, G., & BARRA, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? **Biopolymers**, 47 6, 435-50.

STEVENSON, R.D.; Ecophysiology and conservation: the contribution of endocrinology and immunology – introduction to the symposium. **Integr. Comp. Biol.** v. 45, p. 1–3. 2005.

STEEN, William Brooks. On the permeability of the frog's bladder to water. **The Anatomical Record**, v. 43, n. 3, p. 215-220, 1929.

STEVAUX, Maria Nazaré. A new species of *Bufo Laurenti* (Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 235-242, 2002.

SUZUKI M, HASEGAWA T, OGUSHI Y, TANAKA S. Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: a review. **Comp Biochem Physiol A**, v. 148, p. 72–81. 2007.

SUZUKI M, TANAKA S. Molecular diversity of vasotocin-dependent aquaporin closely associated with water adaptation strategy in anuran amphibians. **J Neuroendocrino**; v. 122, p. 407–412. 2010.

SUZUKI, M, SHIBATA, Y, OGUSHI, Y OKADA, R. Molecular Machinery for Vasotocin-Dependent Transepithelial Water Movement in Amphibians: Aquaporins and Evolution. **Biol. Bull.**, v. 229, p. 109 –119. 2015.

TEIXEIRA P. C.; DIAS D. C.; ROCHA G. C.; ANTONUCCI A. M.; FRANCA F. M.; MARCANTONIO A. S.; RANZANI-PAIVA M.J.T.; FERREIRA C. M. Profile of cortisol, glycaemia, and blood parameters of American Bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus* exposed to density and hypoxia stressors. **Pesquisa Veterinaria Brasileira** v. 32, Supl.1, p. 91-98. 2012.

TINGLEY, R.; GREENLEES, M. J.; SHINE, R. (2012). Hydric balance and locomotor performance of an anuran (*Rhinella marina*) invading the Australian arid zone. **Oikos**, v. 121 n.12, p. 1959–1965. doi:10.1111/j.1600-0706.2012.20422.x

TOLEDO, R. C. JARED, C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 10,p. 593-608. 1993.

UCHIYAMA M, KONNO N. Hormonal regulation of ion and water transport in anuran amphibians. **Gen Comp Endocrinol**; v. 147, p. 54–61. 2006.

VAZ, RENATA. (2016). Effects of artificial environments on the profile of cutaneous microbial community of *Scinax alcatraz* (Anura: Hylidae). 10.11606/d.41.2016.tde-20072016-094441.

VIBORG, A. L. AND ROSENKILDE, P. Water potential receptors in the skin regulate blood perfusion in the ventral pelvic patch of toads. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, p. 39-49. 2004.

VIBORG, A. L. HILLYARD, S. D. Cutaneous blood flow and water absorption by dehydrated toads. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 78, p.:394-404. 2005.

WARBURG, M. R. **Ecophysiology of Amphibians Inhabiting Xeric Environments**. Springer. 1997.

Willmer, P. **Environmental physiology of animals**. 2005. Editora Blackwell Pub.

WELLS, K. D. **The Ecology and Behavior of Amphibians**. The University of Chicago. 2007.

WIKELSKI, M.; COOKE, S.J. Conservation physiology. **Trends Ecol. Evol.** v. 21 p. 38–46, 2006.

WOODHAMS, D. C., VREDENBURG, V. T., SIMON, M. A., BILHEIMER, D. B., SHAKHTOUR, B. S., SHYR, Y., BRIGGS, C. J., ROLLINS-SMITH, L. A. E HARRIS, R.N. (2007). Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana mucosa*. **Biological Conservation**, 138, 390-398.

WYGODA, M. L. Effects of tubocurarine chloride on rates of evaporative water loss in eastern spadefoot toads, *Scaphiopus holbrooki*. **Comparative Biochemistry and Physiology** v. 70 p. 243-246. 1981.

WYGODA, M. L. Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. **Physiological Zoology** 57:329-337. 1984.

XAVIER, A. L. NAPOLI, M. F. Contribution of environmental variables to anuran community structure in the caatinga domain of Brazil. **Phyllomedusa**, v. 10, n. 45-64. 2011.

ZINA, J., & HADDAD, C. F. B. (2005). Reproductive activity and vocalizations of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura: Leptodactylidae) in Southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, 5(2).