

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ZOOLOGIA)**

---

**ESTUDO SOBRE AS RESPOSTAS DIFERENCIADAS DE 3 ESPÉCIES DE  
ROEDORES À FRAGMENTAÇÃO DA MATA ATLÂNTICA, UTILIZANDO UMA  
ABORDAGEM INTEGRATIVA DO BALANÇO HÍDRICO**

**Alexandre Castellar**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Outubro - 2015**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ZOOLOGIA)**

---

**ESTUDO SOBRE AS RESPOSTAS DIFERENCIADAS DE 3 ESPÉCIES DE  
ROEDORES À FRAGMENTAÇÃO DA MATA ATLÂNTICA, UTILIZANDO UMA  
ABORDAGEM INTEGRATIVA DO BALANÇO HÍDRICO**

**Alexandre Castellar**

Orientado: Prof. Dr. Ariovaldo P. da Cruz-Neto

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

**Outubro - 2015**

591.1    Castellar, Alexandre  
C348        Estudo sobre as respostas diferenciadas de 3 espécies de roedores à fragmentação da Mata Atlântica, utilizando uma abordagem integrativa do balanço hídrico / Alexandre Castellar. - Rio Claro, 2015  
              114 f. : il., figs., gráfs., tabs.

              Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
              Orientador: Ariovaldo Pereira da Cruz-Neto

              1. Animais – Fisiologia. 2. Akodon montensis. 3. Euryoryzomys russatus. 4. Oligoryzomys nigripes. 5. Espessura medular relativa. 6. Aquaporina. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** Estudo sobre as respostas diferenciadas de 3 espécies de roedores a fragmentação da Mata Atlântica, utilizando uma abordagem integrativa do balanço hídrico

**AUTOR:** ALEXANDRE CASTELLAR

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ARIOVALDO PEREIRA DA CRUZ NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ARIOVALDO PEREIRA DA CRUZ NETO  
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Prof. Dr. DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE  
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. ELISABETH SPINELLI DE OLIVEIRA  
Departamento de Biologia, Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento (LECO), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. THOMAS PUETTKER  
Departamento de Ciências Biológicas, UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. RICARDO SIQUEIRA BOVENDORP  
Pós-doutorando do Departamento de Ecologia, UNESP, Instituto de Biociências de Rio Claro/SP

Data da realização: 09 de novembro de 2015.

## **Agradecimentos**

Para a execução desta pesquisa, desde a sua concepção, houve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do Projeto Temático “Effects of global climate change on the Brazilian fauna: a conservation physiology approach” (FAPESP 2008/57687-0).

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de doutorado (CNPq 158975/2011-1).

Ao Departamento de Zoologia, nas pessoas do Prof. Dr. Roberto Goitein, Prof. Dr. Augusto Shinya Abe, Prof. Dr. Edilberto Giannotti, Adriana Maria Rodrigues Franco, Emygdio de Paula Neto, Luiz Fernando Bonatti, Maria Cristina Crupi, e demais professores e funcionários pela convivência, presteza, e por fazerem parte de minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), nas pessoas do Prof. Dr. Denis Otávio Vieira de Andrade e de Rosemary D. Oliveira S. Cardoso, e aos demais membros do Conselho de Pós-Graduação e da Seção Técnica de Pós-Graduação.

Ao professor Dr. Ariovaldo P. Cruz Neto, agradeço pela confiança depositada, pela amizade e pela orientação.

Aos meus amigos de UNESP, que sempre estiveram comigo, mesmo aqueles que não estão mais em Rio Claro. Agradeço pelo grande auxílio, apoio, brigas, discussões, comemorações, trancas e por tudo que significaram em minha vida.

À Beatriz, por tudo que ela representa para mim, por estar ao meu lado nos melhores e também nos piores momentos. Saiba que eu te amo muito.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, que torceram e se preocuparam, estejam certos de que tenho vocês como amigos.

Aos meus pais e ao meu irmão, simplesmente por que vocês são tudo para mim. Se hoje eu me considero uma pessoa digna, e se hoje me considero realizado pela pessoa que me tornei e por tudo que conquistei, isso se deve a vocês. Muito obrigado simplesmente por serem vocês.



## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
RESUMO GERAL.....	06
ABSTRACT.....	07
INTRODUÇÃO.....	08

### **CAPÍTULO 1**

#### DIFFERENCES IN PHYSIOLOGICAL TRAITS ASSOCIATED WITH WATER BALANCE AMONG RODENTS, AND THEIR RELATIONSHIP TO TOLERANCE OF HABITAT FRAGMENTATION

Abstract.....	15
Resumo.....	16
Introduction.....	17
Materials and Methods.....	19
Study Species and Field Site.....	19
Experimental design.....	19
Water deprivation resistance and food intake.....	20
Renal Morphology.....	21
Immunohistochemistry.....	22
Statistical Analysis.....	23
Results.....	24
Water deprivation resistance and food ingestion.....	24
Renal Morphology.....	26
Immunohistochemistry.....	28
Discussion.....	30
Conclusions.....	36
Acknowledgments.....	37
Literature Cited.....	38

### **CAPÍTULO 2**

#### PLASTICIDADE DOS COMPONENTES DO BALANÇO HÍDRICO EM ROEDORES COM DIFERENTES TOLERÂNCIAS À FRAGMENTAÇÃO AVALIADA ATRAVÉS DE UM PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO DE ÁGUA.

Abstract.....	42
Resumo.....	43
Introdução.....	44
Métodos.....	45
Área de Estudo.....	46
Protocolo experimental.....	46
Perda de água evaporativa.....	47
Fluxo total de água.....	47
Morfologia Renal .....	48
Imunoistoquímica .....	49
Análise estatística.....	49
Resultados.....	50
Discussão.....	57
Conclusões.....	62
Agradecimentos.....	63
Referências Bibliográficas.....	64

### **CAPÍTULO 3**

#### **EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE OS CARACTERES FISIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO BALANÇO HÍDRICO EM ESPÉCIE DE ROEDOR TOLERANTE À FRAGMENTAÇÃO.**

Abstract.....	68
Resumo.....	69
Introdução.....	70
Métodos.....	72
Área de Estudo.....	72
Protocolo experimental.....	72
Perda de água evaporativa.....	73
Fluxo total de água.....	74
Morfologia Renal.....	74
Imunoistoquímica.....	75
Análise estatística.....	76
Resultados.....	76
Discussão.....	81
Conclusões.....	85
Agradecimentos.....	86
Referências Bibliográficas.....	87

## **CAPÍTULO 4**

### **BALANÇO HÍDRICO DE ROEDORES COM DIFERENTES TOLERÂNCIAS À FRAGMENTAÇÃO DO HABITAT: COMPARAÇÃO ENTRE POPULAÇÕES DE DIFERENTES HABITATS.**

Abstract.....	90
Resumo.....	91
Introdução.....	92
Métodos.....	93
Área de Estudo.....	93
Protocolo experimental.....	93
Perda de água evaporativa.....	95
Fluxo total de água.....	95
Morfologia Renal.....	96
Análise estatística.....	96
Resultados.....	97
Discussão.....	100
Conclusões.....	102
Agradecimentos.....	103
Referências Bibliográficas.....	104
CONCLUSÃO GERAL.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

## RESUMO GERAL

---

O uso de conceitos e metodologia da fisiologia para análise de problemas conservacionistas tem um longo histórico, e sua abordagem vai além de uma descrição de padrões de respostas, incluindo também a compreensão detalhada dos fatores mecânicos subjacentes aos problemas da conservação. A fragmentação e a degradação do habitat resultam em mudanças no ambiente físico, que afetam diretamente parâmetros fisiológicos associados ao balanço hídrico. Animais que habitam esses ambientes altamente modificados podem estar submetidos a um estresse hídrico, e para estes animais o uso de parâmetros do balanço hídrico como medida da capacidade fisiológica da manutenção da homeostase é de grande importância. Estudos dos efeitos da fragmentação da Mata Atlântica sobre a abundância e riqueza de espécies de roedores mostram a existência de respostas diferenciadas à fragmentação. A presente tese aborda este padrão de respostas sob uma ótica integrativa, através da análise dos parâmetros associados à manutenção do balanço hídrico, e com o objetivo de fornecer evidências sobre as possíveis causas mecânicas destas respostas. Para isso utilizamos um clássico protocolo de privação de água, somado à avaliação de efeitos da temperatura e à comparação entre diferentes populações de habitats com características climáticas diferentes. Seus resultados sugerem que as espécies *Akodon montensis*, *Euryoryzomys russatus* e *Oligoryzomys nigripes* possuem diferentes tolerâncias à privação de água, e que esta diferença pode estar relacionada à plasticidade fisiológica inerente a cada espécie. A análise dos componentes envolvidos no balanço hídrico evidenciou diferenças entre *A. montensis* e *E. russatus*, tendo a primeira apresentando maior plasticidade dos parâmetros avaliados, resultando em maior tolerância à privação de água. Somada à privação de água, a elevação da temperatura induziu uma série de alterações nos parâmetros avaliados em *A. montensis*, impondo maior pressão sobre a manutenção de seu balanço hídrico, desencadeando alterações fisiológicas para mitigar o estresse adicional causado pela temperatura elevada. As populações de *A. montensis* e *E. russatus* não apresentaram diferenças em suas plasticidades, apesar das diferenças climáticas entre seus habitats de origem. A diferença natural à tolerância a privação de água entre as espécies estudadas parece suficiente para atuar como uma das causas da resposta diferenciada à fragmentação.

**Palavras chave:** *Akodon montensis*. *Euryoryzomys russatus*. *Oligoryzomys nigripes*. Roedores. Balanço hídrico. Privação de água. Fragmentação do habitat. Mata Atlântica.

## ABSTRACT

---

The use of concepts and methodologies of Physiology to analyse conservation issues has long history, and its approach goes further than describing response patterns, including also detailed comprehension of the mechanistic factors underlying conservations problems. Fragmentation and degradation of habitat result in changes on the physical environment, which directly affect physiological traits associated with water balance. Animals that inhabit these highly modified environments might be under water stress, and for those animals, using traits of water balance as a measure of physiological capacity for maintaining homeostasis is of great value. Studies of the effects of the Atlantic Forest fragmentation on the abundance and richness of rodent species show the existence of differential response to fragmentation. This thesis addresses these patterns of responses under an integrative perspective through the analysis of parameters associated to the maintenance of water balance, and in order to provide evidences about the possible mechanistic causes of these responses. For that we used a classical protocol of water deprivation, added to the effects of temperature and to the comparison among different populations from habitats with distinct climate characteristics. The results suggest that the species *Akodon montensis*, *Euryoryzomys russatus* and *Oligoryzomys nigripes* hold different tolerances to water deprivation, and these differences might be related to the physiological plasticity intrinsic of each species. The analysis of the components involved in water balance revealed differences between *A. montensis* and *E. russatus*, the first one presenting a higher plasticity on the evaluated traits, which result on higher tolerance to water deprivation. Added to water deprivation, the rising of temperature induced a series of alterations on the evaluated parameters in *A. montensis*, imposing higher pressure on the water balance maintenance, triggering physiological changes to relieve the additional stress caused by higher temperatures. The populations of *A. montensis* and *E. russatus* didn't show differences in their plasticities, despite the climate differences between their original habitats. The innate differences to water deprivation tolerance between the studied species seem to be enough to act as one of the reasons for the distinct response to fragmentation.

**Keywords:** *Akodon montensis*. *Euryoryzomys russatus*. *Oligoryzomys nigripes*. Rodents. Water balance. Water-deprivation. Habitat fragmentation. Atlantic Forest.

## INTRODUÇÃO

---

### **O papel da fisiologia no estudo dos efeitos diferenciais da fragmentação.**

O papel da fisiologia para análise de problemas conservacionistas tem um longo histórico, mas somente em anos recentes os conceitos, paradigmas e métodos desta disciplina, de relevância para a análise dos problemas conservacionistas, foram sintetizados e condensados em uma disciplina, conhecida por Fisiologia da Conservação (Carey, 2005; Wikelski e Cooke, 2006; Chown e Gaston, 2008). A Fisiologia da Conservação é definida como o estudo das respostas fisiológicas dos organismos às alterações antrópicas no ambiente, que podem causar ou contribuir para o declínio das populações, e sua abordagem vai além de uma descrição de padrões, pois também inclui uma compreensão detalhada dos fatores mecanísticos subjacentes aos problemas da conservação (Wikelski e Cooke, 2006).

Via de regra, as populações animais podem reagir de três maneiras a uma mudança ambiental regional: 1) declínio da fração de indivíduos em estágio reprodutivo e extinção local, 2) migração dos indivíduos para áreas não afetadas (mudança na distribuição), ou 3) permanência da população na área impactada via adaptações fisiológicas e comportamentais. Essas adaptações devem permitir que os indivíduos mantenham o equilíbrio interno, ou homeostase, sob as novas condições (Donnelly, 1998; Helmuth et al, 2005).

### **O balanço hídrico**

Além do uso bem disseminado dos conceitos e métodos da endocrinologia (Romero, 2004; Walker et al, 2005; Carey, 2005; Wikelski e Cooke, 2006), a Fisiologia da Conservação também vem utilizando o balanço energético como indicativo da capacidade fisiológica de manter o equilíbrio interno (Wikelski e Cooke, 2006; McEwen e Wingfield, 2003, 2010). Apesar do uso do balanço energético ser baseado em uma forte base teórica, para algumas espécies em determinadas condições, questões energéticas podem ser de importância secundária e, assim, de utilidade limitada como índice de estresse fisiológico (Walsberg, 2003). Este é o caso, por exemplo, de mamíferos que habitam desertos, onde a água livre encontra-se disponível apenas em raras ocasiões de chuva, e cujo maior desafio durante boa

parte do ciclo anual é a aquisição e conservação da água, sendo o equilíbrio energético *per se* uma preocupação secundária (Walsberg, 2000).

Por exemplo, para a espécie de roedor *Thrichomys apereoides*, provenientes da mesma área geográfica na Caatinga (região semiárida e com regime de chuva imprevisível), mas de diferentes habitats em relação à umidade, Favaroni-Mendes e colaboradores (2004) encontraram diferenças morfológicas e fisiológicas nas variáveis associadas ao balanço hídrico que são indicativo de certo grau de adaptação para estes pequenos mamíferos, indo de encontro ao esperado para pequenos mamíferos da Caatinga, que supostamente não possuem capacidade fisiológica para a conservação de água (Mares et al, 1981).

Além dos animais de habitats áridos, animais que habitam ambientes altamente modificados, como áreas fragmentadas e florestas secundárias, podem vir a sucumbir à desidratação como resultado da degradação do ambiente (Jones et al, 1990). Nestas áreas, modificações que afetam componentes fundamentais do balanço hídrico (e.g. alteração da umidade do ar e do solo, da temperatura, etc.), podem levar a uma perturbação do equilíbrio interno (homeostase), representando um fator de estresse hídrico.

Assim, para estes animais cujos mecanismos de manutenção do balanço hídrico são constantemente desafiados, o uso de parâmetros relacionados ao balanço hídrico como medida da capacidade fisiológica da manutenção da homeostase é de grande importância.

O funcionamento ótimo de um animal requer a manutenção relativamente constante e bem definida de seus fluídos corpóreos (Schmidt-Nielsen, 2002). Animais que vivem em ambientes terrestres devem produzir através do metabolismo, ou obter através da ingestão direta ou do consumo de alimentos, uma quantidade de água suficiente para balancear as perdas de água que ocorrem através da pele e dos pulmões, e as perdas associadas com a excreção (Schmidt-Nielsen, 2002; McNab, 2002; Karasov e Martínez del Rio, 2009). Tendo em vista a complexidade de processos altamente interligados que regem o balanço hídrico dos animais, a avaliação deste parâmetro deve ser realizada de forma integrativa, abrangendo não somente aspectos fisiológicos orgânicos, mas também morfológicos, celulares e moleculares.

A estimativa do fluxo total de água, importante ferramenta na avaliação do balanço hídrico (Karasov e Martínez del Rio, 2009), vem sendo amplamente utilizada (Williams et al, 1997; Bozinovic et al, 2003; Coleman e Downs, 2009), e fornece dados sobre a taxa de utilização de recursos hídricos. Acompanhar o estado fisiológico dos animais encontrados em diferentes habitats pode fornecer indícios dos processos sutis que ocorrem na população e que são indicativos de mudanças prejudiciais no bem-estar destes animais (King e Bradshaw, 2010). A perda de água evaporativa é a mais importante via de utilização de recursos hídricos em mamíferos, e sua magnitude é afetada por fatores que influenciam a perda de água cutâneas e/ou respiratória, incluindo atividade e uma série de parâmetros ambientais, como a pressão de vapor de água e a temperatura ambiente (Cooper e Withers, 2008).

Além disso, a habilidade de regular a quantidade de água eliminada através da excreção é essencial para os mamíferos (Sands e Layton, 2008). Esta habilidade se torna ainda mais importante em ambientes onde o balanço hídrico é constantemente desafiado. Por exemplo, os ratos gambás do deserto da América do Sul (*Thylamys pusillus* em Diaz et al, 2001) e degus (*Octodon degus* em Bozinovic et al, 2003) reduzem as perdas de água através da produção de pequenos volumes de urina hiperosmóticas durante a estação seca. Já no roedor “springhare” (*Pedetes capensis*) a perda de água é reduzida produzindo urina concentrada e fezes secas (Peinke e Brown, 1999).

Em experimentos realizados em laboratório, Ribeiro e colaboradores (2004) demonstraram que para as espécies de roedores *Oligoryzomys nigripes* provenientes de áreas com remanescentes de Mata Atlântica aberta, localizadas na Caatinga, e *Nectomys squamipes* provenientes de áreas úmidas de Mata Atlântica, um período de 18hs de privação de água resulta, entre outras modificações, em aumento na osmolaridade da urina, bem como numa redução do volume total de urina para *Nectomys squamipes*. Apesar destas modificações, este mesmo estudo mostra que estas e outras espécies de oryzomyinos não possuem o alto grau de adaptação fisiológica a ambientes xéricos, observado em espécies que habitam desertos (Ribeiro et al, 2004).

A capacidade de concentração de urina, nos mamíferos, está diretamente relacionada com a estrutura renal (Schmidt-Nielsen, 2002; McNab, 2002; Karasov e

Martínez del Rio, 2009), sendo que uma série de índices morfológicos (e.g. relação córtex-medula, área medular relativa, relação medula interna/córtex e espessura medular relativa) são utilizados como indicadores desta capacidade (Beuchat, 1990; Diaz et al, 2006; Casotti et al, 2006; Coleman e Downs, 2009). Além disso, a nível celular, a capacidade de concentração de urina está relacionada com a presença de canais proteicos que constituem uma grande família de proteínas denominadas *aquaporinas*, e permitem a reabsorção da água (Nielsen et al, 2008). A análise destes canais proteicos vem sendo bastante utilizada, em conjunto com outras medidas, como índice da plasticidade fenotípica em relação ao balanço hídrico (Bozinovic et al, 2003; Gallardo et al, 2005).

### **A problemática da fragmentação e os objetos de estudo**

A fragmentação e a degradação do habitat resultam em mudanças no ambiente físico e biológico, produzindo uma ampla gama de efeitos sobre várias escalas espaciais e níveis de organização biológica. Além disso, alteram diferentes processos ecológicos, modificando os padrões de cobertura vegetal, influenciando espécies individuais e associações de espécies (Lindenmayer e Fischer, 2006), causando impacto na riqueza de espécies e no funcionamento do ecossistema (Fahrig, 2003; Tabarelli et al, 2004, Cottontail et al, 2009).

Em estudos a níveis globais, a temática dos efeitos da fragmentação sobre populações e comunidades é tratada no âmbito da ecologia, sendo estes efeitos deletérios, estando sempre associados à perda da biodiversidade. Todavia, estes estudos tratam da problemática da fragmentação em nível de populações e comunidades, ignorando as respostas individuais.

Em um contexto mais local, esta abordagem também é utilizada para apreciar a sensibilidade de uma determinada espécie à fragmentação. Por exemplo, a determinação do grau de sensibilidade é feita, dentre outras maneiras, pela análise de padrões de abundância e densidade da espécie alvo em áreas fragmentadas e não-fragmentadas (Fahrig, 2003; Henry et al, 2007; Brady et al, 2011). Esta abordagem assume que a fragmentação funciona como um “filtro seletivo”, permitindo a manutenção das espécies tolerantes e impedindo a manutenção de populações viáveis de espécies intolerantes.

Não obstante sua importância, a análise da problemática da fragmentação em nível de populações e comunidades não permite determinar os mecanismos subjacentes a estas respostas diferenciais. Ou seja, não sabemos quais aspectos que determinam a adaptabilidade da espécie frente aos efeitos da fragmentação, e como estas respostas se projetam a nível populacional. Portanto, em síntese, uma análise mais local dos efeitos da fragmentação requer análises das respostas individuais a estes efeitos e tal abordagem é normalmente conduzida por estudos fisiológicos.

De fato, uma das mais importantes contribuições dos estudos fisiológicos para o entendimento dos efeitos das mudanças antrópicas (incluindo-se a fragmentação) sobre a fauna é precisamente fazer o elo conceitual entre os efeitos destas mudanças a nível individual e populacional.

A Floresta Atlântica, considerada um dos ecossistemas mais ricos do mundo tanto por sua biodiversidade como pelo número de espécies endêmicas, vem sofrendo altas taxas de impacto, grande parte em decorrência da ação antrópica (Myers et al, 2000), e se resume hoje a cerca de 11,7% da cobertura vegetal original (Ribeiro et al, 2009). Grande parte dos fragmentos remanescentes é composta por florestas secundárias, em diferentes estágios de sucessão (Metzger, 2000; Metzger et al, 2009), e por pequenos fragmentos (Ranta et al, 1998; Ribeiro et al, 2009). Estes fragmentos podem apresentar uma série de mudanças na estrutura vegetal, como a proliferação de espécies pioneiras (Santos et al, 2008), a redução no número total de espécies arbóreas (Oliveira et al, 2004; Santos et al, 2008), dentre outros (Laurance et al, 2000; Tabarelli et al, 1999; Michalski et al, 2007; Cordeiro e Howe, 2001; Melo et al, 2006), fatores que podem levar a uma redução na disponibilidade e qualidade dos recursos (Pardini et al, 2010; Pinotti, 2010). Além disso, vários estudos têm documentado alterações nas condições abióticas em decorrência do efeito de borda (Asbjornsen et al, 2004), particularmente no regime de luz, temperatura e umidade relativa, que podem modificar significativamente as comunidades de animais e plantas que ocorrem nestes habitats (Collinge, 1996; Lienert, 2004).

Estudos conduzidos pela Dra. Renata Pardini (USP-SP) e colaboradores em áreas de Mata Atlântica de planalto do estado de São Paulo constituem uma das mais completas investigações sobre os efeitos da fragmentação da Mata Atlântica

sobre a abundância e riqueza de espécies de roedores (Pardini, 2004; Pardini et al, 2005; Pardini e Umetso, 2006; Umetso e Pardini, 2007; Umetso et al, 2008; Pardini et al, 2010). Dentre os diversos resultados obtidos nestes estudos, um padrão demonstrado de forma clara, e de interesse ao presente trabalho, foi à existência de respostas diferenciadas à fragmentação, com algumas espécies sendo mais tolerantes que outras a estes efeitos. Por exemplo, *Euryoryzomys russatus* foi uma espécie que apresentou forte declínio na abundância em resposta a fragmentação, ao passo que *Oligoryzomys nigripes* não teve sua abundância afetada, e *Akodon montensis* aumentou em número em ambientes fragmentados (Pardini, 2004).

Um fato interessante é que a espécie mais afetada (*E. russatus*) é considerada endêmica (espécie restrita a biomas florestais), ao passo que as espécies que não foram afetadas (*O. nigripes*), ou que aumentaram de abundância (*A. montensis*), são consideradas como não endêmicas, tendo distribuição mais ampla e sendo encontradas inclusive em áreas abertas como o Cerrado (Olifiers et al, 2005; Bueno, 2008; Umetso et al, 2008). Pardini e colaboradores (2010) sugerem que este fato pode estar associado ao nível de alteração da cobertura vegetal ocasionada pela fragmentação: para espécies especialistas de áreas florestadas, a extensa alteração na cobertura vegetal acarretaria mudanças na estrutura do fragmento (disponibilidade de recursos, temperatura, umidade, entre outros) que levariam a perda da resiliência destas espécies.

Estudos fisiológicos podem fornecer novas informações a cerca desta resposta diferenciada, fazendo o elo conceitual entre os efeitos destas mudanças a nível individual e populacional. É neste contexto que a presente tese está embasada, tratando da temática das respostas diferenciais à fragmentação apresentada por espécies de roedores da Mata Atlântica, sob uma ótica integrativa, através do uso de ferramentas e conceitos da fisiologia. Assim, no que tange a esta Tese, o balanço hídrico se apresenta como uma importante ferramenta da avaliação da capacidade fisiológica de algumas espécies de roedores, sendo aqui utilizada com o propósito de fornecer novas evidências a cerca da resposta diferenciada que estas espécies apresentam em frente à fragmentação. Para isso, no **Capítulo 1** avaliamos se as espécies *Akodon montensis*, *Oligoryzomys nigripes* e *Euryoryzomys russatus* apresentam diferentes tolerâncias à privação de água através de experimento clássico de privação (Mares, 1975, 1977; Cortés et al, 1988; Bozinovic et al, 2007), e

se as diferenças entre as elas são relacionadas a ingestão de alimento e a capacidade de concentração de urina, estimada através de índices morfológicos e avaliada através da presença de aquaporina-1 nos rins. Os resultados do Capítulo 1 sugerem que as espécies possuem diferentes tolerâncias à privação de água e, apesar de apresentarem baixa flexibilidade dos caracteres associados ao balanço hídrico, as pequenas diferenças entre as elas podem ser um mecanismo por trás da resposta diferencial à fragmentação.

No **Capítulo 2** realizamos análise integrativa dos componentes envolvidos no balanço hídrico, avaliando uma ampla gama de caracteres fisiológicos, morfológicos e celulares de *A. montensis* e *E. russatus*, através de protocolo de privação de água. Os dados obtidos no Capítulo 2 evidenciaram diferenças significativas entre as duas espécies, com *A. montensis* apresentando maior plasticidade dos parâmetros avaliados, representando uma vantagem adaptativa frente às alterações decorrentes da fragmentação do habitat. A maior plasticidade fisiológica da espécie *A. montensis* foi então testada no **Capítulo 3** através da análise dos efeitos da temperatura elevada (próximas às máximas registradas na área de estudo) sobre a tolerância à privação de água. Os resultados mostram claros efeitos da temperatura sobre alguns dos parâmetros avaliados, tendo desencadeado uma série de alterações nos parâmetros avaliados, numa tentativa de mitigar o maior estresse hídrico causado pelo aumento da temperatura. Porém, a espécie não foi capaz de produzir uma urina mais concentrada do que a exibida durante a privação de água à temperatura mais baixa, indicando que o protocolo de privação de água é capaz de induzir a máxima concentração de urina em *A. montensis*, independentemente de outros fatores estressores, como a temperatura elevada.

Diferentes populações estão sujeitas a diferentes pressões ambientais e no **Capítulo 4** apresentamos a comparação dos caracteres fisiológicos associados ao balanço hídrico entre populações de *A. montensis* e *E. russatus* provenientes de áreas com características climáticas diferentes. Apesar das diferenças entre os habitats, nenhuma diferença foi observada nos parâmetros avaliados.

## CAPÍTULO 1

### Differences in physiological traits associated with water balance among rodents, and their relationship to tolerance of habitat fragmentation. <sup>1</sup>

---

**Abstract:** Physiological concepts and tools can help us to understand why organisms and populations respond to habitat fragmentation in the way they do, and allow us to determine the mechanisms or individual characteristics underlying this differential sensitivity. Here, we examine food intake, relative medullary thickness and distribution/expression of water channel aquaporin-1 in three species of South American rodents that have been reported to have different levels of tolerance to habitat fragmentation (*Akodon montensis*, *Oligoryzomys nigripes* and *Euryoryzomys russatus*), using a classic water deprivation experiment to assess their abilities to cope with water shortage. We believe the mechanisms underlying this differential sensitivity are related to the organisms' capacities to maintain water balance, and therefore the species more tolerant to habitat fragmentation (*A. montensis* and *O. nigripes*) should have a higher capacity to maintain water balance. We found that *A. montensis* and *O. nigripes* were more tolerant to water deprivation than *E. russatus*, and this difference appears to be unrelated to differences in food ingestion rate. *O. nigripes* showed the highest values for RMT, followed by *A. montensis* and *E. russatus*. However all species showed RMT values that were 2.2% to 14.1% below the lower prediction limit when compared to other rodents through allometric relationships. Water deprivation seems to trigger changes in the distribution of aquaporin-1, mostly for *O. nigripes* and *E. russatus*, which may contribute to water balance maintenance. Our data suggest that these intrinsic physiological differences among these species could provide a mechanism for their differential tolerance of habitat fragmentation.

**Keywords:** *Akodon montensis*, *Euryoryzomys russatus*, *Oligoryzomys nigripes*, water deprivation, relative medullary thickness, food ingestion, aquaporin, habitat fragmentation.

---

<sup>1</sup>Capítulo disponível em: Castellar A, Bertoli PC, Galdino LH, Domeniconi RF, da Cruz-Neto AP. 2015. Differences in physiological traits associated with water balance among rodents, and their relationship to tolerance of habitat fragmentation. J Exp Zool, DOI: 10.1002/jez.1966, In press.

**Resumo:** Conceitos e métodos da fisiologia podem nos ajudar a compreender porque organismos e populações respondem à fragmentação do habitat da maneira que o fazem, e nos permitem determinar os mecanismos ou características individuais por trás da sensibilidade diferencial. Aqui nós examinamos a ingestão de alimento, a espessura medular relativa e a distribuição/expressão do canal de água aquaporina-1 em três espécies de roedores sul-americanos, que apresentam diferentes níveis de tolerância à fragmentação do habitat (*Akodon montensis*, *Oligoryzomys nigripes* and *Euryoryzomys russatus*), utilizando um experimento clássico de privação de água para avaliar as habilidades em lidar com a falta de água. Nós acreditamos que os mecanismos por trás desta diferente sensibilidade são relacionados à capacidade dos organismos em manter o balanço hídrico e, portanto, as espécies mais tolerantes à fragmentação (*A. montensis* e *O. nigripes*) devem apresentar maior capacidade de manter o balanço hídrico. Nossos resultados mostram que *A. montensis* e *O. nigripes* são mais tolerantes à privação de água que *E. russatus*, e que esta diferença não está relacionada a diferenças na taxa de ingestão de alimento. *O. nigripes* exibiu maiores valores de espessura medular relativa (EMR), seguido por *A. montensis* e *E. russatus*. Contudo todas as espécies apresentaram valores de EMR que ficaram 2,2% a 14,1% abaixo do limite inferior de predição, quando comparados com outros roedores por meio de suas relações alométricas. A privação de água parece desencadear modificações na distribuição da aquaporina-1, principalmente em *O. nigripes* e *E. russatus*, o que pode contribuir para a manutenção do balanço hídrico. Nossos resultados sugerem que as diferenças fisiológicas intrínsecas entre as espécies podem atuar como um mecanismo por trás da tolerância diferenciada à fragmentação do habitat.

**Palavras-Chave:** *Akodon montensis*, *Euryoryzomys russatus*, *Oligoryzomys nigripes*, privação de água, espessura medular relativa, ingestão de alimento, aquaporina, fragmentação do habitat.

## Introduction

Habitat fragmentation causes changes in the physical and biological environment producing several effects over many spatial scales and levels of biological organization, inducing broad and consistent negative effects on biodiversity (Fahrig, 2003). Density or abundance comparisons of target species between adjacent disturbed and undisturbed habitats can be used, among other applications, to appraise animals' sensitivity to habitat fragmentation. In this context, fragmentation acts as a "selective filter", which allows the maintenance of less sensitive species and prevents the maintenance of viable populations that are more sensitive to fragmentation (Henry et al, 2007).

Notwithstanding its importance, this population-based approach can be misleading (Henry et al, 2007), and does not allow us to determine mechanisms underlying this differential sensitivity, nor determine which individual characteristics provide greater tolerance for the species. A detailed knowledge of the relationship between animals and their environment is essential for our understanding of the consequences of habitat alteration and environmental perturbations (Wikelski and Cooke, 2006), and physiology, by providing a link between cause and effect, can thereby explain ecological patterns (Seebacher and Franklin, 2012).

The current definition of conservation physiology is "an integrative scientific discipline applying physiological concepts, tools, and knowledge to characterize biological diversity and its ecological implications; understanding and predicting how organisms, populations, and ecosystems respond to environmental change and stressors; and solving conservation problems across the broad range of taxa" (Cooke et al, 2013). Following this definition, physiology is considered in its broadest possible terms, encompassing analysis of the functional and mechanistic responses at all scales (Cooke et al, 2013). The conservation physiology approach goes further than merely describing patterns, it also includes a detailed analysis of mechanistic factors underlying conservation issues (Wikelski and Cooke, 2006), and allows us to understand why organisms respond to habitat fragmentation in the way they do.

A series of papers by Pardini and colleagues (Pardini, 2004; Pardini et al, 2005; Pardini and Umetso, 2006; Umetso and Pardini, 2007; Umetso et al, 2008; Pardini et al, 2010) showed that small rodents have different resiliencies to habitat fragmentation in the Atlantic Rainforest of Brazil. For example, the abundance of *Euryoryzomys russatus*, a forest specialist species endemic to this biome (Umetso

and Pardini, 2007), is correlated to landscape structure, abundance increasing with increase in forest quantity and connectivity, but decreasing markedly with the reduction of forest area and with the degree of connectivity among fragmented patches (Umetsu et al, 2008; Pardini et al, 2010). On the other hand, for rodents *Akodon montensis* and *Oligoryzomys nigripes*, which are generalists in respect to forest cover and have widespread distributions in several Brazilian biomes (Alho, 2005), abundance remains constant or even increases with the degree of fragmentation of the Atlantic Rainforest (Pardini, 2004; Umetsu et al, 2008).

Abiotic conditions in forest fragments changes dramatically, and to cope with such changes animals must change their physiology (Seebacher and Franklin, 2012; Cooke et al, 2013). For instance, microclimatic alterations occur in forest edges through increased penetration of sunlight and wind (Didham and Lawton, '99), leading to an increase in air temperatures (Cadenasso et al, '97), which acts synergistically with wind turbulence to reduce relative humidity, causing surface soil moisture to be diminished or even depleted (Williams-Linera et al, '98). Such variations present a severe challenge to the maintenance of water and energy homeostasis (Chappell, '80). Canale & Henry (2010) suggested that species which evolved in, and are restricted to, more homogenous habitats would display a lower capacity to change their physiology. Thus, one might expect that such species would be more affected by changes in abiotic conditions such as those brought about by fragmentation. Therefore, a comparative analysis of the traits associated with physiological capacity may help us to understand why some species are resilient to habitat fragmentation while others show decreased abundance in fragmented habitats.

In this paper we attempt to verify whether the different ecological resiliencies to habitat fragmentations displayed by the rodents *Euryoryzomys russatus*, *Akodon montensis* and *Oligoryzomys nigripes* are associated with differences in their capacity to maintain water homeostasis. Our hypothesis is that the mechanisms underlying this differential sensitivity are related to the capacity of each species to maintain water balance. Therefore *A. montensis* and *O. nigripes*, species with a widespread distribution that are considered more resilient to habitat fragmentation, should have a higher capacity to maintain water balance, compared to *E. russatus*. To test this hypothesis, we used classic and standardized water deprivation experiments to assess their abilities to maintain water homeostasis in response to

water shortage (Mares, '75; Mares, '77; Cortés et al, '88; Bozinovic et al, 2007). We employed an integrative analysis that incorporates analysis at the cellular, systemic and organismal levels (Bozinovic and Gallardo, 2006; Bozinovic et al, 2007), covering not only physiological but also morphological, cellular and molecular aspects. We also analyzed food intake and ability to concentrate urine, measured by the relative medullary thickness index and by distribution patterns of aquaporin.

## **Materials and Methods**

### *Study Species and Field Site*

Fifty adult, males and non-reproductive females of the three rodent species were captured during 2010-2012 with Sherman live traps and pitfall traps (with authorization of the ICMBio SISBIO – Process number: 33096-4) at the Morro Grande Forest Reserve (10.870 ha; Cotia, metropolitan region of São Paulo, Brazil - 23°35'S, 23°50' S; 46°45' W, 47°15' W), one of the largest and most well-preserved Atlantic Forest remnants of the São Paulo Atlantic Plateau. Detailed information about climate, geology, geomorphology, hydrography, land-use and land-cover are described in Metzger et al. (2006). The physiological traits of animals from well preserved areas shouldn't have been influenced by the effects of fragmentation. Thus, the way these animals respond to water deprivation can provide data about the differential tolerance to water deprivation.

After capture, we transported the animals to our laboratory at the State University of São Paulo in Rio Claro (UNESP, Rio Claro, Brazil) and kept them individually in cages (30 x 19 x 13 cm), at 22°C in a climatized room (Fitotrom – Eletrolab, Brazil), with RH ranging between 60-70%, and a light/dark cycle of 12h/12h. Animals were fed hamster mix and sunflower seeds, and water was provided *ad libitum*.

### *Experimental design*

All procedures were approved by the local *Ethical Committee for Animal Research* (CEUA-UNESP/Rio Claro, Brazil - Protocol: 3062). Thirty-seven rodents from three species were used for the resistance to water deprivation test (*E. russatus*, n=10; *O. nigripes*, n=16; and *A. montensis*, n=11). After these experiments

were completed, another group of thirteen animals (*E. russatus*, n=3; *O. nigripes*, n=4; and *A. montensis*, n=6) were used as a control group. Before the experiments, animals from both groups were acclimated during 7-15 days at 22°C, and this time period was sufficient to ensure the stabilization of body mass ( $M_b$ ) and food ingestion. This temperature was chosen based on data available in the literature, in order to compare our findings with the data available for other species.

We used classic water deprivation experiments (Mares, '75, '77; Cortés et al, '88; Bozinovic et al, 2007) to assess the rodents' abilities to cope with hydric stress. After an initial measurement of  $M_b$  (Initial Body Mass -  $M_{bi}$ ), we withheld water and fed the rodents *ad libitum* with commercial sunflower seeds until the experiments were finished. We recorded changes in  $M_b$  and measured food ingestion during this period. In the water-deprived group, we terminated the experiments when rodents lost approximately 30% of their  $M_{bi}$  or when we observed evident signs of loss of movements and/or nutritional deficiency. The time period (in days) elapsed between the beginning and the end of the experimental protocol (duration of the experiment in days – DE) was recorded. In the control group, the DE was considered as an average of the time observed for the water-deprived group. The control group remained with free access to food and water until the end of the experiment, and during this period showed no variation in  $M_b$  or food ingestion rate, therefore no data is available for weight loss and food intake rates for the control group.

At the end of the experiment, animals were humanely killed (sodium pentobarbital overdose). For some animals of the water-deprived group (*E. russatus*, n=6; *O. nigripes*, n=6; and *A. montensis*, n=7) and for all animals from the control group, both kidneys were removed, fixed in 10% buffered formaldehyde and processed for morphological and immunohistochemical analyses.

#### *Water deprivation resistance and food intake*

We used the slope of the regression between  $\log_{10}$  absolute changes in  $M_b$  per day versus days without water as an index of the resistance to water deprivation (absolute rate of body weight loss; BWI). Relative rate of body weight loss (%BWI) is BWI as a percentage of  $M_{bi}$ . The rate of food intake was defined as the slope of the

regression between  $\log_{10}$  absolute food ingestion (in grams) per day versus days without water, for each individual of each of the three species.

### *Renal Morphology*

Kidneys were measured in length, width and thickness with a dial caliper (Mitutoyo – accuracy 0,01mm), and kidney volume ( $\text{mm}^3$ ) was calculated as the product of these three variables (kidney volume = length x width x thickness). A sagittal section was then made from the right kidney (if a complete sagittal section could not be made, the left kidney was used) and, using a stereoscopic microscope, the cortex thickness (Ct) and outer and inner zones of the medulla were distinguished. The medullar thickness (Mt) was calculated as the sum of the values of the outer and inner medulla, and the Relative Medullary Thickness ( $\text{RMT} = 10 \times \text{medullar thickness}/\text{kidney volume}^{1/3}$ ) index was calculated (Al-Kahtani et al, 2004; Casotti et al, 2006).

These RMT values ( $\log_{10}$  transformed) were then compared with those of other rodents through allometric relationships. An allometric equation was calculated with data from 118 rodent species (see data on *Supplementary Material*) available in the literature, and based on this equation we obtained prediction values of RMT for rodents of similar  $M_b$  to the species used in our experiment. Anti-logged prediction values were calculated after Hayes and Shonkwiler (2006). One assumption of this procedure is that each species is an independent data point. Such assumption is likely to be violated because closely related species tend to be more similar than distantly related ones. We used a randomization test to verify the tendency for RMT and  $M_b$  to be more similar in closed related species than they are between distant related ones (i.e. presence of phylogenetic signal – Blomberg et al 2003). This procedure was done by randomly reallocating sets of the two traits values to tips of the tree 1,000 times (Blomberg et al, 2003). Besides this verification, we also quantified the strength of this phylogenetic signal for both traits using the  $K^*$  test as proposed by Blomberg et al (2003). If  $K^* > 1$ , then closed related species are more similar for the traits analysed than what would be expected by a Brownian mode of evolution. Conversely, if  $k^* < 1$ , then related species resemble each other less than expected by this mode of evolution (Blomberg et al 2003).

In our case, phylogenetic signal was present in the data and the strength for this signal was significant for RMT and  $M_b$  (see results). To render these values independent of phylogeny, we used the autocorrelation procedure (Cheverud and Dow 85; Rohlf, 2001) to produce a set of phylogenetic corrected values of log-transformed RMT and  $M_b$  whose residuals were subsequently used to produce a second set of allometric, phylogenetic independent, regressions. Phylogenetic analyses were carried out using a phylogeny derived from the mammal super-tree of Bininda-Emonds et al. (2007), with a custom-written VB software (kindly provided by Philip C. Withers). Conformation to conventional and phylogenetically independent allometric relationships were determined by the 95% prediction limits of the regression after Cooper and Withers (2006), i.e. only the RMT values that fell off this limit were considered significantly different from the values predicted by allometry.

### *Immunohistochemistry*

For immunohistochemistry, paraffin-embedded kidney tissues were cut into 4-5  $\mu\text{m}$ -thick slices and mounted on silanized slides (DAKO, Carpinteria, California). After tissue dehydration, they were placed in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, 0.05% tween 20, pH 6.0) for antigen retrieval using a microwave heating method. Endogenous peroxidase activity was briefly blocked by immersing the slides in a mixed solution of 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and methanol and nonspecific protein binding was blocked with a solution of 3% non-fat dry milk/PBS. Then, they were incubated with primary polyclonal antibodies (anti-AQP1; Chemicon Temecula, CA, USA) diluted 1:400 in 1% bovine serum albumin (BSA) overnight at 4 °C. After washing three times in PBS (5 min), the tissues were incubated with secondary biotinylated antibody, (goat anti-rabbit IgG; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluted 1:70 in 1% BSA for 1 h at room temperature. After sequential washes, the reaction was finally detected using diaminobenzidine tetrachloride-DAB (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) as a chromogen and sections were counter-stained with Harris' hematoxylin for about 1 min, then dehydrated in ethanol. Coverslips were mounted on the slides with Permount. Negative controls were performed without the primary antibody (Teixeira et al, 2012 and Domeniconi et al, 2008).

All qualitative analyses were carried out with a Leica DM 2000 microscope coupled to an Olympus BX51 camera for image digitalization. Images were analyzed

using ImageJ free software, and we quantified the tissue area with positive immunoreactivity relative to the total image area (Pereira et al, 2014), expressed as percentage of reaction for renal cortex (%RC) and renal medulla (%RM).

### *Statistical Analysis*

ANOVA was first used to test for differences in  $M_{bi}$  ( $\log_{10}$  transformed) and duration of experiments (DE) among species, with *post-hoc* Tukey's test to find specific differences. Analysis of covariance (ANCOVA –  $M_{bi}$  as covariates) was used to ascertain the presence of interactions between  $M_{bi}$  and the duration of the experiment. If a significant difference was found we subsequently used ANCOVA (one factor) to test for differences among species in resistance to water deprivation (slope of the regression between  $\log_{10}$  absolute changes in  $M_{bi}$  per day versus days without water), with  $M_{bi}$  and duration of experiment as covariates.

ANCOVA ( $M_{bi}$  and DE as covariates) was also used to test for differences in rate of food ingestion between species. Spearman's correlation was used to test for correlation between rate of food ingestion and rate of mass loss. Differences between percentage of reaction for renal cortex (%RC; arcsine of the square root transformed) and renal medulla (%RM; arcsine of the square root transformed) between species and treatments were ascertained with ANOVA.

We used general linear models (GLM,) to investigate effects of the variables (species, treatment and  $M_{bi}$ ) on the morphological index RMT. We followed the procedure of Getz et al (2005) by first fitting a model with all main effects, and all possible 2- and 3-way interactions. Then, we sequentially removed non-significant ( $p < 0.05$ ) interaction effects, starting with the highest interaction term with the largest p-value until all non-significant interaction terms were removed. Thus, the final general linear model contained main effects of all variables, and all significant 2- and 3-way interaction effects. The final model estimated the p-values for each significant interaction term involving categorical variables (species and treatment) with a *post-hoc* Tukey's honest significant difference test (HSD for unequal N). Statistical analyses were conducted using StatistiXL (version 1.8; StatistiXL).

## Results

### *Water deprivation resistance and food ingestion*

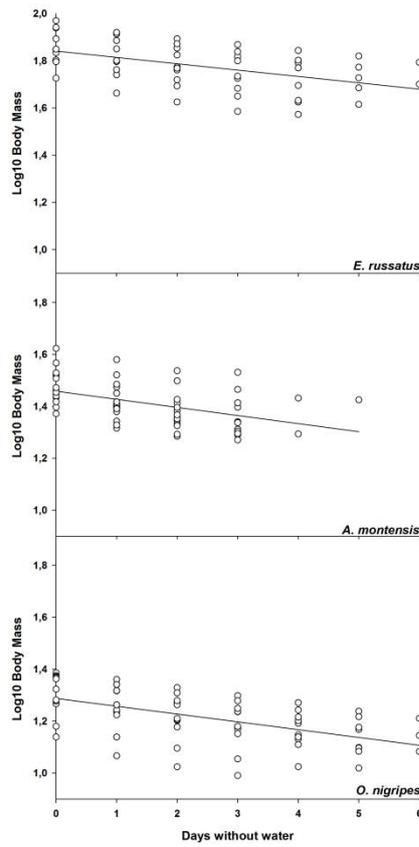
$M_{bi}$  varied among the three rodent species ( $F_{2,36} = 148.4$ ;  $p < 0.0001$ ; Table 1). The Tukey test showed that *E. russatus* had higher  $M_{bi}$  than the other species ( $p < 0.005$ ), while *A. montensis* had higher  $M_{bi}$  than *O. nigripes*. We found significant differences in the duration of experiments ( $DE \pm sd$ ) among species ( $F_{2,36} = 17.7$ ;  $p < 0.0001$ ), lasting  $3.9 \pm 0.7$  days for *A. montensis*,  $5.5 \pm 1.0$  days for *E. russatus* and  $5.9 \pm 0.9$  days for *O. nigripes*. Pairwise comparisons were significant ( $p < 0.001$ ) and the differences in  $DE$  were not due to  $M_{bi}$  ( $F_{1,35} = 1.14$ ;  $p = 0.239$ ),

**Table 1** – Values ( $\pm$  SD) of initial body mass ( $M_{bi}$ ), mean rate of body weight loss (BWI), BWI as percentage of  $M_{bi}$  (%BWI), rate of food intake (FI), and relative medullary thickness (RMT – unitless). WD – Water-deprived Group; C – Control Group.

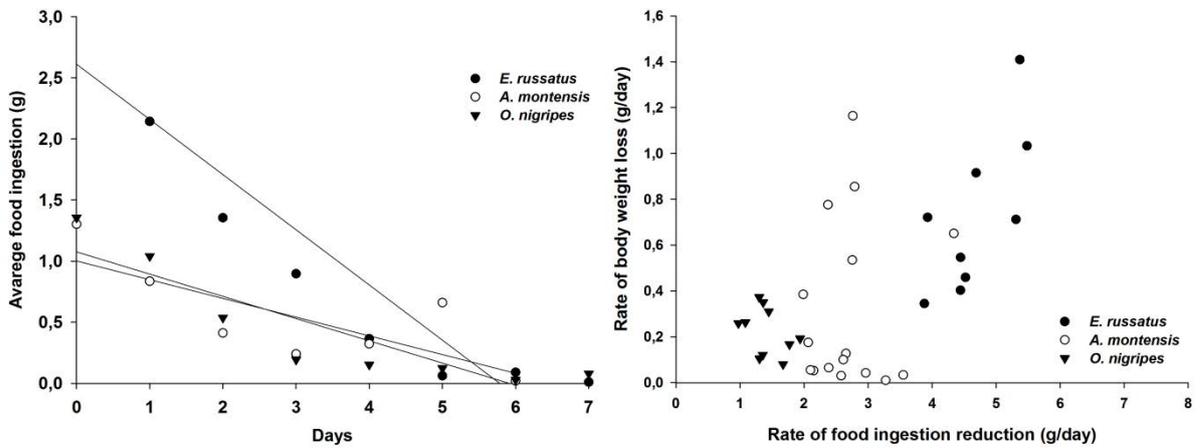
Species	Treatment	$M_{bi}$ (g)	BWI (g/day)	%BWI	FI (g/day)	RMT
<i>E. russatus</i> (n=10)	WD	$73.42 \pm 12.09$	$-4.95 \pm 1.03$	$-6.91 \pm 1.14$	$-0.451$ ( $p < 0.001$ )	$3.617 \pm 0.295$ (n=6)
<i>A. montensis</i> (n=16)	WD	$30.23 \pm 4.61$	$-2.71 \pm 0.61$	$-9.06 \pm 1.96$	$-0.153$ ( $p = 0.043$ )	$4.530 \pm 0.359$ (n=7)
<i>O. nigripes</i> (n=11)	WD	$20.39 \pm 3.45$	$-1.43 \pm 0.28$	$-7.07 \pm 1.20$	$-0.182$ ( $p = 0.003$ )	$4.665 \pm 0.242$ (n=6)
<i>E. russatus</i> (n=3)	C	$46.80 \pm 11.05$	-	-	-	$3.776 \pm 0.105$
<i>A. montensis</i> (n=6)	C	$29.10 \pm 2.39$	-	-	-	$4.243 \pm 0.189$
<i>O. nigripes</i> (n=4)	C	$18.42 \pm 2.28$	-	-	-	$4.902 \pm 0.167$

We found significant differences in the absolute (BWI;  $F_{4,36} = 36.2$ ;  $p < 0.001$ ) and relative (%BWI;  $F_{4,36} = 12.3$ ;  $p < 0.001$ ) tolerance to water deprivation among the three rodents species (Table 1; Fig. 1). The absolute tolerance is still significant after accounting for the effects of  $DE$  and  $M_{bi}$  ( $F_{2,36} = 3.58$ ;  $p < 0.01$ ), however the differences in the relative tolerance are due to the differences in the duration of experiment among the species ( $F_{1,36} = 17.5$ ;  $p < 0.001$ ).

None of the species were able to maintain their rate of food ingestion during water deprivation, showing a reduction in food intake rate (Fig. 2). We found significant differences between species in rate of food intake ( $F_{4,35} = 2.992$ ;  $p = 0.034$ ; Table 1), but these differences did not remain significant after accounting for  $M_{bi}$  and  $DE$  ( $F_{2,35} = 0.442$ ;  $p = 0.647$ ). No correlation was found between the rate of reduction of food ingestion and the rate of  $M_b$  loss (Spearman correlation test;  $p > 0.050$  for all species; Fig. 2).



**Figure 1.** Resistance to water deprivation among species ( $\log_{10} M_b$  versus time in days). The hollow circles represents one individual and the continuous line represents the average for the species in each habitat.



**Figure 2.** A – Average values of food ingestion (g) versus time in days and the regression lines for each species. B – Spearman's correlation between rate of body weight loss and rate of food ingestion reduction. Rates of body weight loss and food ingestion reduction are presented as the slopes of the linear regression.

### Renal Morphology

Values of RMT for the three species are depicted in Table 1. Results of GLM showed that RMT differed among the three rodent species (Table 2). *O. nigripes* showed the highest RMT, followed by *A. montensis* and *E. russatus*. The GLM also showed that RMT did not change as a function of the treatments or differences in  $M_{bi}$ . The 2-way interaction between species and treatment, however, was significant ( $p=0.049$ ). The *post-hoc* HDS (with unequal N) test showed no differences in RMT index between the control group and the water deprived group, for all species ( $p>0.6$  for all species), however did show significant differences between *E. russatus* and the other species, for both treatments, with *E. russatus* showing the lowest values of RMT.

**Table 2** – General linear model test results to effects of species, treatment and initial body mass ( $M_{bi}$ ) on RMT. The main model was significant ( $F=13.014$ ;  $p<0.01$ ).

Variables	DF	F	P
Species	2	7.372	0.003
Treatment	1	1.455	0.239
Body Mass	1	1.952	0.175
2-Way Interaction (Species/Treatment)	2	3.423	0.049

The conventional allometric equation obtained from 118 rodent species (excluding *A. montensis*, *E. russatus* and *O. nigripes*) was :

$$\log_{10}RMT = 0.704 - 0.139 \times \log_{10} M_b$$

( $r^2=0.419$ ;  $F_{1,117} = 85.272$ ;  $p<0.001$ ). When compared with the RMT values predicted by this allometric equation, all three species showed lower RMT than predicted, and fell below the 95% prediction limits of the regression (Table 3; Fig. 3). *E. russatus* showed the lowest RMT when compared with other rodents, being 11,47% (water-deprived group) and 14,10% (control group) above the 95% prediction limit.

There was a significant phylogenetic signal for RMT and  $M_b$  for all species (randomization test  $P < 0.0001$  for both traits). The strength of this signal for  $M_b$  was similar to what would be expected by a Brownian mode of evolution ( $k^* = 0.99$ ;  $P < 0.001$ ). For RMT, the strength of the signal was significant albeit less than expected by this mode of evolution, ( $k^*=0.510$ ;  $P < 0.001$ ). Equation corrected for phylogeny was:

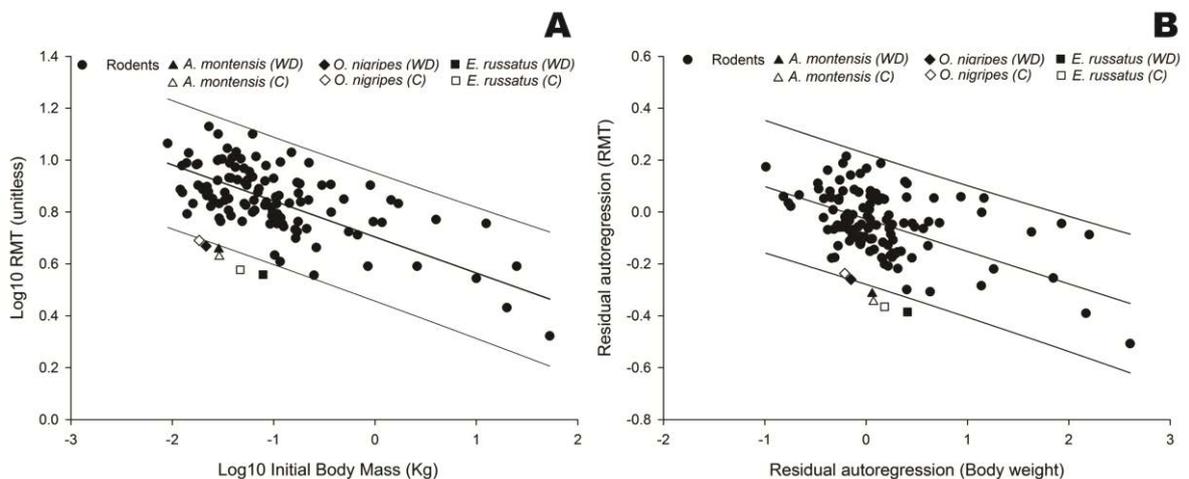
$$\log_{10}RMT = -0.027 - 0.125 \times \log_{10}M_b$$

( $r^2=0.279$ ;  $F_{1,117} = 45.735$ ;  $p<0.001$ ). After accounting for this phylogenetic signal, the RMT of *O.nigripes* (both treatments) was the only one that fell in into the 95% prediction limits (Table 3), while for *A. montensis* and *E. russatus* RMT was still significantly lower than expected for an equivalently-sized rodent.

**Table 3** - Comparison for *A. montensis*, *E. russatus* and *O.nigripes* to rodent allometric relationships for relative medullary thickness (RMT), both before (conventional) and after correction for phylogenetic history by autoregression (phylogenetically independent).

Species	Conventional			Phylogenetically Independent	
	RMTp	%RMT	%PL	Inside 95% PL	Inside 95% PL
<i>A. montensis</i> (WD)	8.28	-54.71	-3.77	no	no
<i>O. nigripes</i> (WD)	8.63	-53.99	-4.89	no	yes
<i>E. russatus</i> (WD)	7.20	-50.27	-11.47	no	no
<i>A. montensis</i> (C)	8.27	-51.26	-9.73	no	no
<i>O. nigripes</i> (C)	8.81	-55.61	-2.2	no	yes
<i>E. russatus</i> (C)	7.74	-48.83	-14.1	no	no

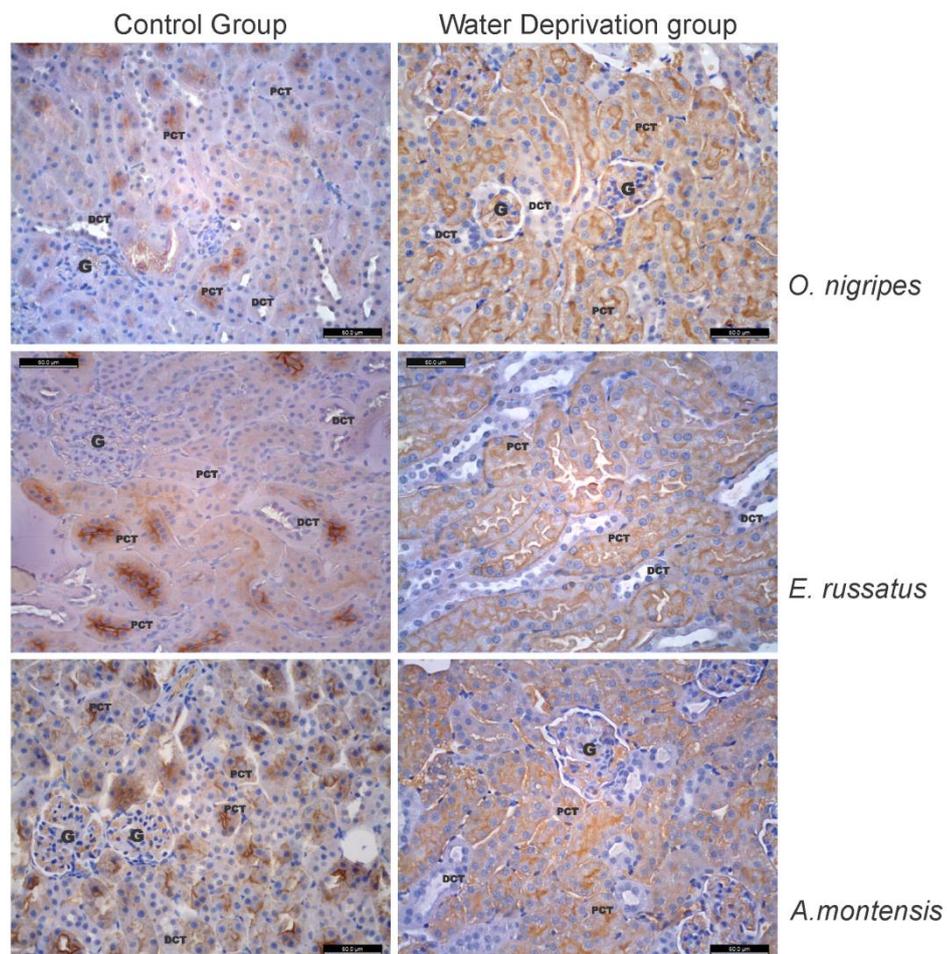
C – Control group; WD – Water-deprived group; RMTp – Value predict by allometry; %RMT – indicates the value of our RMT data as a % of the predicted value; %PL – indicates the value of our RMT data as a % of the lower prediction limit; inside 95% PL indicates if the datum falls within the 95% prediction limits.



**Figure 3.** A – Conventional allometric relationship for  $\log_{10}$  of RMT (unitless) versus  $\log_{10}$  of  $M_b$  (Kg); B - Allometric relationship after accounting for phylogenetic relatedness.

### Immunohistochemistry

Immunoreactivity for AQP-1 was detected only in the Proximal Tubule (PCT; Fig. 4), and in the Descending Limb (DL; Fig. 5) of the Henle Loop, for all studied species. The relative amount of immunoreaction (Table 4) was scored based on analyses for percentage of reaction, using ImageJ software (Pereira et al, 2014).



**Figure 4.** Cross sections of renal cortex for *A. montensis*, *E. russatus* and *O. nigripes*, immunostained with an anti-aquaporin (AQP-1) antibody. There was an evident change in the pattern of AQP-1 distribution, for all species, from limited to some regions of the proximal convoluted tubule in the control group, to uniformly distributed along PCT tubules in the water-deprived group. G – Glomerulus; PCT - proximal convoluted tubule; DCT- distal convoluted tubule. Bar: 50μm.

Different patterns of AQP-1 distribution in the renal cortex (Fig. 4) were found between the three species. *E. russatus* and *O. nigripes* in the control group expressed AQP-1 in a few regions of the proximal tubule, providing evidence of

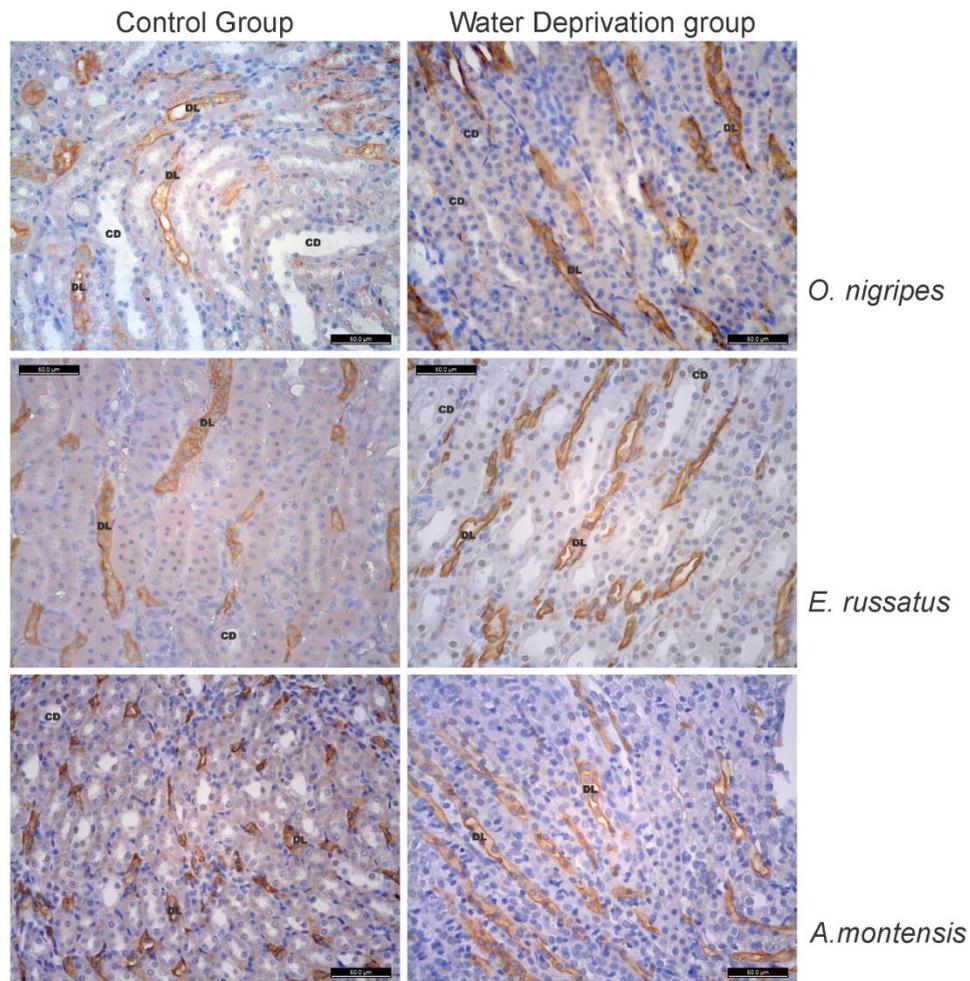
proximal tubules with weak reaction or even no reaction. However, *A. montensis* showed a different pattern, with expression of AQP-1 in almost all proximal tubule sections. Despite the differences in the distribution pattern for the three species in the control group, no significant difference was found in the relative amount of immunoreaction ( $F_{2,16} = 3.791$ ;  $p > 0.05$ ). For all species, the distribution of AQP-1 in the water-deprived group appears to be more uniform along the PCT, but only *O. nigripes* and *E. russatus* seems to increase the amount of AQP-1, expressed throughout the extent of the PCT. This increase was shown by the percentage of reaction, which was significantly higher in the water-deprived group for *O. nigripes* ( $F_{1,14} = 21.902$ ;  $p < 0.001$ ) and *E. russatus* ( $F_{1,9} = 3.953$ ;  $p < 0.05$ ). No differences were found between treatments for *A. montensis* ( $F_{1,8} = 0.053$ ;  $p > 0.05$ ).

No differences were observed in the renal medulla (Fig 5) in the control group ( $F_{2,12} = 3.182$ ;  $p > 0.05$ ), where the same pattern of AQP-1 distribution of was observed for all species, with moderate labeling for AQP-1 in the descending limb of the Henle Loop. None of the species appear to be able to modify their pattern of expression and/or localization of AQP-1 ( $p > 0.05$  for all species) when facing water deprivation (Fig. 5).

**Table 4** – Percentage of reaction  $\pm$  standard deviation for AQP-1 in renal cortex and medulla, for three rodent species.

Specie	Treatment	% RC	% RM
<i>A. montensis</i> (n=7)	C	4.50 $\pm$ 0.44	3.30 $\pm$ 0.33
<i>E. russatus</i> (n=6)	C	4.72 $\pm$ 1.74	3.30 $\pm$ 1.71
<i>O. nigripes</i> (n=6)	C	1.33 $\pm$ 2.25	3.39 $\pm$ 1.42
<i>A. montensis</i> (n=6)	WD	4.56 $\pm$ 2.74	3.19 $\pm$ 0.99
<i>E. russatus</i> (n=3)	WD	6.00 $\pm$ 4.33 <sup>a</sup>	4.63 $\pm$ 0.60
<i>O. nigripes</i> (n=4)	WD	8.57 $\pm$ 2.48 <sup>b</sup>	5.65 $\pm$ 1.34

WD – Water-deprived Group; C – Control Group; %RC - percentage of reaction in renal cortex; %RM - percentage of reaction in renal medulla – a  $\neq$  *E. russatus* (C); b  $\neq$  *O. nigripes* (C) (ANOVA, post-hoc Tukey;  $p < 0.05$ ).



**Figure 5.** Cross sections of renal medulla for *A. montensis*, *E. russatus* e *O. nigripes*, immunostained with an anti-aquaporin (AQP-1) antibody. No differences were observed in the renal medulla, neither between species nor between the control group and the water-deprived group, with all species showing moderate labeling for AQP-1 in the descending limb of the Henle Loop. CD – Collecting duct; DL - descending limb of the Henle loop. Bar: 50μm.

## Discussion

Analysis of ingestive balance, kidney morphology and water channel expression, among other techniques, have been used to assess water economy of small mammals at the organismal, systemic and cellular levels (Cortés et al, '88; Diaz and Ojeda, '99; Bozinovic et al, 2003; Al-kahtani et al, 2004; Favaroni-Mendes et al, 2004; Gallardo et al, 2005; Bozinovic et al, 2007), but such widespread use is probably only appropriate for rodents that lose body mass while water-deprived and kept on a dry diet (MacMillen and Hinds, '83), because only in this situation would rodents be capable of exercising maximum water conservation. Under this condition, we should expect near-maximum correlations among mechanisms for water

conservation in rodents, both within and between different levels of organization (Cortés et al, '88; Bozinovic et al, 2003, 2007).

Since every individuals of every species in our experiment lost body mass when water-deprived, we believe that our choice of a classic and standardized method (Mares, 1977) provided an accurate and integrative assessment of water conservation efficiency. Such analysis allowed us to observe and compare the differential ability of the three rodent species to tolerate periods of water restriction. We measured capacity to tolerate periods of water restriction in individuals from well preserved areas, and the physiological traits of these individuals should not have been influenced by the effects of fragmentation. Thus, this experiment should provide insight into how these species would respond to abiotic changes associated with habitat fragmentation.

This individual physiological ability may determine tolerant and non-tolerant species across a range of environmental conditions (Somero, 2010; Seebacher and Franklin, 2012; Cooke et al, 2013), and short-term water deprivation could be relevant even for animals that usually inhabit moist environments (Ribeiro et al, 2004). These comparative analyses of traits associated with water balance may help us to understand why *E. russatus* shows a decrease in abundance, while *O. nigripes* and *A. montensis* seem not to be affected by habitat fragmentation.

Physiological differences observed among the three species studied here may be the cause of their differential response to habitat fragmentation and should be associated with their life histories. *E. russatus* is considered to be restricted to forest biomes, and is endemic to the Atlantic Forest, whereas *O. nigripes* and *A. montensis* are non-endemic and widespread species, occurring in open Brazilian biomes such as the Cerrado and Cerradão (Umetso et al, 2008). We believe that the different degrees of environmental stability of these biomes induced different degrees of physiological adaptations in these rodents and allowed the evolution of different phenotypic plasticity for each species. Therefore we expected that *O. nigripes* and *A. montensis*, which evolved in a heterogeneous habitat (Cerrado and Cerradão), would have greater tolerance to water deprivation compared to *E. russatus* due to their physiological traits of greater plasticity.

Alterations in landscape structure such as forest cover, quality, quantity and connectivity caused by habitat fragmentation lead to changes in small rodent

population size (Pardini, 2004; Pardini et al, 2005; Pardini and Umetso, 2006; Umetso and Pardini, 2007; Umetso et al, 2008; Pardini et al, 2010). Nevertheless, the microclimatic alterations that occur in forest edges lead to variations in abiotic conditions, and influence energy and water costs, presenting a challenge for the maintenance of water homeostasis for animals affected by fragmentation. Thus, the ability to tolerate short periods of water deprivation may have great impact on species resilience to unexpected habitat changes, and species with more plastic physiological traits (*A. montensis* and *O. nigripes*) would be more resilient to fragmentation.

Despite the large amount of studies demonstrating evidence for physiological adaptation to water deprivation in desert animals (Schmidt-Nielsen and Schmidt-Nielsen, '50; Mares, '75, Gallardo et al, 2005; Diaz et al, 2006; Bozinovic and Gallardo, 2006; Bozinovic et al, 2007, and others), only a few studies evaluate the physiological traits associated with water balance in animals that occurs in moist environments, like the Atlantic Forest. In one of these few papers, Ribeiro et al (2004) evaluated the effects of short-term water deprivation in one population of *O. nigripes* and found that withholding water for 18 h was sufficient to cause physiological changes in *O. nigripes*, and this period was sufficient to lead to a 15% loss of body mass. The drastic and rapid loss of body mass in *O. nigripes* under water deprivation probably reflects profound dehydration, as suggested by Ribeiro et al (2004). In our data, *O. nigripes* showed the lowest change in body mass during water deprivation, when compared with *E. russatus* and *A. montensis*, but even so after 48h of water deprivation *O. nigripes* showed high body mass loss, declining to 18.1% of the  $M_{bi}$ .

As far as we know, there is no preexisting information about the physiological traits associated with water balance for *E. russatus* and *A. montensis*. When compared to rodents with similar body mass from South America arid and semi-arid deserts, it again becomes clear that *E. russatus* and *A. montensis* lack physiological adaptation to cope with water deprivation. For instance, while *E. russatus* shows an average body weight loss of  $4.95 \pm 1.03\text{g/day}$ , *Graomys griseoflavus* captured in the Monte Desert (Argentina) lost  $1.42 \pm 0.35\text{g/day}$  and tolerated water deprivation for 20 days (Bozinovic et al, 2007). *Eligmodontia typus* also captured in the Monte Desert (Argentina), of similar body mass to *A. montensis*, lost  $0.14 \pm 0.13\text{g/day}$  and tolerated

50 days without water, while *A. montensis* loses  $2.71 \pm 0.61$ g/day and tolerated only 3 days without water. Despite their low tolerance to water deprivation when compared to animals from arid and semi-arid environments, the small physiological differences between these three species observed in our results may be the cause of the differential responses to habitat fragmentation reported for these species.

The higher absolute tolerance to water deprivation of *O. nigripes* and *A. montensis* may allow their survival in fragmented areas, while *E. russatus* would undergo population decline, but these differences appear unrelated to differences in food ingestion rate among the species. Our data suggests that none of these species are able to maintain their rate of food ingestion as a means to cope with water deprivation, which was demonstrated by the negative value of food ingestion rate during the water deprivation. This reduction in rate of food ingestion is expected for mammals, when water ingestion is prevented (Yang et al, '81; Houpt and Yang, '95; Senn, et al, '96; Schoorlemmer and Evered, 2002), since it aids body fluid regulation (Schoorlemmer and Evered, 2002) by reducing the large volume of osmotically sequestered water in the gut, allowing its absorption (Lepkovsky et al, '57; Kutscher, '66; Schoorlemmer and Evered, '93), and reducing urinary water loss due to the reduced solute load (Schoorlemmer and Evered, '93). However, Ribeiro et al (2004) have found a different pattern in the South American sigmodontine rice rat *O. nigripes*, and in three other sigmodontine rats (*Oryzomys subflavus*, *Wiedomys pyrrhorhinos*, and *Rhipidomys mastacalis*) during short-term water deprivation. When subjected to short-term water deprivation, they tended to continue food intake at normal rates; this behavioral pattern may be relevant to *O. nigripes*, "if the animal in its natural environment has access to food that is rich in fat or carbohydrates, which provide great amounts of metabolic water" (Ribeiro et al, 2004).

Habitat acclimatization may play a key role in tolerance to water deprivation (Favaroni-Mendes et al, 2004) and we believe that due the high average annual precipitation in our collection site (1339 mm - Metzger et al, 2006), individuals used in our experiments may have undergone directional selection favoring features adaptive to humid environments over features adaptive to arid environments, such as the ability to maintain food ingestion rates during water deprivation.

While rate of food ingestion appears not to play a key role, differences in renal morphology among these species may be one of the primary mechanisms behind

their differential tolerance to water deprivation and their response to habitat fragmentation. The RMT index can be used to estimate maximum urine concentrating ability, as ascertained by several authors (Beuchat, '90, '96; Al-kahtani et al, 2004; Diaz et al, 2006; Casotti et al, 2006; Coleman and Downs, 2009). We found a statistically significant phylogenetic signal for RMT in rodents, a result previously reported by other authors (Brooker and Withers '94; Al-kahtani et al, 2004; Diaz et al, 2006). Although this result indicates that closely related rodent species display similar values of RMT (Blomberg and Garland 2002; Blomberg et al, 2003), our data showed that, even after accounting for this effect, allometric trends are still pervasive. In fact, our main conclusions about the position of the RMT values of these three species, relative to other rodents, did not change after correcting for phylogenetic relatedness (see Table 3)

When compared to other rodents, all three species presented RMT below (48-54%) the values predicted for rodents with similar body mass. When accounting for phylogenetic signal, *O. nigripes* still showed low RMT values but they fit into the 95% prediction limit, in accordance with what was predicted by allometry, while *A. montensis* and *E. russatus* were still below that predicted for rodents of similar body mass. Relative medullary thickness can be affected by environmental conditions experienced throughout an individual's lifetime (Al-kahtani et al, 2004 and references therein), and in small mammal species can accurately indicate the availability of moisture in the animal's habitat (Laakkonen, 2002). Thus *A. montensis*, *E. russatus* and *O. nigripes*, all captured in a rainy and humid environment (Metzger et al, 2006), should have low RMT values and, hence, may have low ability to concentrate urine.

The results accounting for the phylogenetic signal may suggest that the low ability of *O. nigripes* to produce concentrated urine is mainly genetically based. However, wild-caught individuals may have experienced immensely different environmental conditions during their lifetime (Al-kahtani et al, 2004), thus it is possible that part of the variation that we found could have been caused by environmental effects rather than genetically-based differences.

Several authors have pointed out that RMT declines with increasing body mass in mammals (Beuchat, '90, '96; Al-Kahtani et al, 2004; Casotti et al, 2006). The species with highest body mass in this study (*E. russatus*) was indeed the species with the lowest RMT values, and therefore had a lower ability to concentrate urine

than did *A. montensis* and *O. nigripes*. Despite the fact that these species presented RMT below the values predicted for rodents of similar body mass, the differences among them may allow *O. nigripes* and *A. montensis*, the species with the higher theoretical potential to concentrate urine, to respond more effectively to limited water availability and to more successfully maintain water balance. In fact, Ribeiro et al (2004) showed that during water deprivation, *O. nigripes* produces urine with maximum osmolality values, similar to what was documented for the sigmodontine desert-dwelling white-throated woodrat (*Neotoma albigula*) and the Old World Norway rat, *Rattus norvegicus*. On the other hand, the lower values of RMT found in *E. russatus*, may represent a lower ability to cope with limited water availability, when compared to *A. montensis* and *O. nigripes*, and could be one of the mechanisms behind their lower tolerance to water deprivation, and thus greater sensitivity to habitat fragmentation.

In addition to differences in renal morphology among species, differences found at the cellular level associated with water conservation could also contribute to differential tolerance to water deprivation. Aquaporins (AQP) are a family of membrane-integral proteins that function as molecular water channels (Knepper et al, '96), facilitating water transport across cell membranes of a wide variety of cells (Bozinovic et al, 2003). The physiological role of Aquaporin-1 (AQP-1) in the kidney has been well documented, and it is considered to be closely linked to urine concentration (Zhao et al, 2006; Dantzler et al, 2011; Day et al, 2014).

The critical role of AQP-1 was confirmed in transgenic knockout mice lacking the AQP1 gene (Ma et al, '98; Verkman, 2000; Zhao et al, 2006), which displayed diuresis and were unable to concentrate urine even when deprived of water. The AQP-1 knockout mice showed a remarkably low urine osmolality prior to water deprivation (580–610 mOsm), which did not increase after deprivation (Ma et al, '98). In contrast, average urine osmolality in wild-type mice was 1400 mOsm before water deprivation and increased to ~3000 mOsm after deprivation (Ma et al, '98). There are few data available showing the expression of aquaporin water channels in rodents associated with environmental variables. However, Gallardo et al (2002) showed the presence of several aquaporin's in the colon of a South American desert rodent (*Octodon degus*) and later, Bozinovic et al (2003) and Gallardo et al (2005) showed the role of several aquaporins in dealing with seasonal water unavailability in desert-

dwelling rodents. As far as we know, this study provides the first description of AQP-1 distribution of in the kidney for *A. montensis*, *O. nigripes* and *E. russatus*.

AQP-1 immunolabeling was observed in the proximal tubule and descending limb of Henle epithelia, which is consistent with data available in the literature (Nielsen et al, '93, '95; Ma et al, '98; Kortenoeven and Fenton, 2014). For water-deprived *A. montensis*, small changes in AQP-1 distribution were observed, forming a more uniform pattern along the proximal tubule, which could indicate a greater efficiency in the ability to concentrate urine. The same pattern also seems to occur in *E. russatus* and *O. nigripes* however, it is also followed by a large increase in the abundance of AQP-1, mainly *O. nigripes*. Water deprivation seems to trigger changes in the subcellular distribution and abundance of AQP-1, especially for *O. nigripes* and *E. russatus*, which may contribute to maintenance of water balance. In addition to differences in renal morphology, these cellular mechanisms probably allow these species to produce more concentrated urine and may contribute to the higher tolerance to water deprivation showed by *O. nigripes* and *A. montensis*. These cellular changes may also act like a compensatory mechanism for *E. russatus*, since it appears to be the species with the lowest potential to concentrate urine, as shown by the RMT values.

The lack of differences between treatments in the pattern of AQP-1 immunocytochemistry reaction in the renal medulla demonstrates that modulation of AQP-1 in this kidney region is not the only AQP dynamic involved in the urine concentrating process. Similar results were found in field studies with the South American desert-dwelling rodent *O. degus*, wherein Bozinovic et al (2003) found no change in immunoreactivity for AQP-1 in the renal medulla among two populations of *O. degus* captured in two distinct seasons (dry summers and rainy winters).

## **Conclusions**

Our results suggest that these species' differences in resilience to habitat fragmentation may be related to differential tolerance to water deprivation. Some of the physiological traits associated with water balance analyzed here may be critically important and, allowing *A. montensis* and *O. nigripes* to pass through the "selective filter" of habitat fragmentation. While rate of food ingestion appears not to play a key

role in their differential tolerance to water deprivation, *A. montensis* and *O. nigripes* seem to have a greater intrinsic ability to concentrate urine, due to their renal morphology (as indicated by their RMT), which makes these species less sensitive to habitat fragmentation than *E. russatus*.

For water-deprived *O. nigripes*, the association of renal morphology with cellular mechanisms that allows urine concentration and water retention (through aquaporin-1 abundance/distribution changes) could be especially important. Meanwhile, for water-deprived *A. montensis* aquaporin-1 seems to be of secondary importance in the regulation of urine concentration; their tolerance to water deprivation may rely not only in their renal morphology, but also in modulation of other water channels from the aquaporin family.

For water-deprived *E. russatus*, changes in aquaporin-1 abundance and distribution may be useful to compensate for their renal morphology (which predicts a much lower capacity to concentrate urine than rodents of similar body mass), but appear to be insufficient to ensure effective tolerance to water deprivation. This inability may represent a physiological barrier against adaptation to environmental changes and can contribute to population decline in fragmented areas.

In summary, though our findings suggest relative low phenotypic plasticity in the physiological traits associated with water balance for these rodent species, the intrinsic differences between them could be a mechanism behind their differential tolerance to water deprivation, and this difference in turn could be a mechanism behind their differential resilience to habitat fragmentation.

### **Acknowledgments**

This research was supported by The São Paulo Research Foundation (FAPESP/Brazil) Thematic Project “Effects of global climate change on the Brazilian fauna: a conservation physiology approach” (FAPESP 2008/57687-0) and by the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq/Brazil Grant no.158975/2011-1). The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Literature Cited

- Al-Kahtani MA, Zuleta C, Caviedes-Vidal E, Garland T. 2004. Kidney mass and relative medullary thickness of rodents in relation to habitat, body size, and phylogeny. **Physiol Biochem Zool**, 77(3):346-365.
- Alho, CJR. 2005. Intergradation of habitats of non-volant small mammals in the patchy Cerrado landscape. **Arq Mus Nac Rio de Janeiro** 63: 41–48.
- Beuchat CA. 1990. Body size, medullary thickness, and urine concentrating ability in mammals. **Am J Physiol-Reg I** 258:R298–R308.
- Beuchat CA. 1996. Structure and concentrating ability of the mammalian kidney: correlations with habitat. **Am J Physiol-Reg I** 271: R157–R179.
- Bininda-Emonds, ORP, Cardillo M, Jones KE, MacPhee RDE, Beck RMD, Grenyer R, Price SA, Vos RA, Gittleman JL, and Purvis A. 2007. The delayed rise of present-day mammals. **Nature** 446(7135):507–512.
- Blomberg SP and Garland T Jr. 2002. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. **J Evolution Biol** 15:899–910.
- Blomberg SP, Garland T Jr, Ives AR. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. **Evolution** 57:717–745.
- Bozinovic F, Gallardo PA, Visser RH, Cortés A. 2003. Seasonal acclimatization in water flux rate, urine osmolality and kidney water channels in free-living degus: molecular mechanisms, physiological processes and ecological implications. **J Exp Biol** 206:2959–2966.
- Bozinovic F and Gallardo P. 2006. The water economy of South American desert rodents: From integrative to molecular physiological ecology. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol** 142:163-172.
- Bozinovic F, Cruz-Neto AP, Cortes A, Diaz GB, Ojeda RA, Giannoni SM. 2007. Physiological diversity in tolerance to water deprivation among species of South American desert rodents. **J Arid Environ** 70:427-442.
- Brooker B and Withers P. 1994. Kidney structure and renal indices of dasyurid marsupials. **Aust J Zool** 42:163–176.
- Cadenasso ML, Traynor MM, Pickett STA. 1997. Functional location of forest edges: gradients of multiple physical factors. **Can J For Res** 27:774-782.
- Canale CI, Henry PY. 2010. Adaptive phenotypic plasticity and resilience of vertebrates to increasing climatic unpredictability. **Clim Res** 43:135–147.
- Casotti G, Herrera LG, Flores JJ, Mancina CA, Braun EJ. 2006. Relationships between renal morphology and diet in 26 species of new world bats (suborder microchiroptera). **Zoology** 109(3):196-207.
- Chappell MA. 1980. Thermal energetics and thermoregulatory costs of small Arctic mammals. **J Mammal** 61:278–291.
- Cheverud JM, Dow, MM. 1985. An autocorrelation analysis of genetic variation due to lineal fission in social groups of Rhesus monkeys. **Am J Phys Anthropol**, 67:113–121.

- Coleman JC and Downs CT. 2009. Variation in urine concentrating ability and water balance of the Black-tailed Tree Rat *Thallomys nigricauda*, along an aridity gradient. **Comp Biochem Physiol A Physiol** 154:508–513.
- Cooke SJ, Sack L, Franklin CE, Farrell AP, Beardall J, Wikelski M, Chown SL. 2013. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. **Conserv Physiol** 1:1-23.
- Cooper CE and Withers PC. 2006. Numbats and aardwolves—how low is low? A reaffirmation of the need for statistical rigour in evaluating regression predictions. **J Comp Physiol B** 176:623–629.
- Cortés A, Zuleta C, Rosenmann M. 1988. Comparative water economy of sympatric rodents in a Chilean semi-arid habitat. **Comp Biochem Physiol A Physiol** 91:711–714.
- Dantzler WH, Pannabecker TL, Layton AT, Layton HE. 2011. Urine concentrating mechanism in the inner medulla of the mammalian kidney: role of three-dimensional architecture. **Acta Physiol (Oxf)** 202: 361–378.
- Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, Bill RM, Conner MT. 2014. Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. **Biochim Biophys Acta** 1840:1492–1506.
- Diaz G and Ojeda R. 1999. Kidney structure and allometry of Argentine desert rodents. **J Arid Environ** 41(4):453-461.
- Diaz GB, Ojeda RA, Rezende EL. 2006. Renal morphology, phylogenetic history and desert adaptations of South American hystricognath rodents. **Funct Ecol** 20:609-620.
- Didham RK and Lawton JH. 1999. Edge structure determines the magnitude of changes in microclimate and vegetation structure in tropical forest fragments. **Biotropica** 31(1):17-30.
- Domeniconi RF, Orsi, AM, Justulin Jr LA, Leme Beu CC, Felisbino SL. 2008. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. **Cell Tissue Res** 332(2):329-335.
- Fahrig L. 2003. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. **Annu Rev Ecol Evol S**, 34:487–515.
- Favaroni-Mendes LA, Rocha PLB, Ribeiro MFS, Perry SF, Oliveira ES. 2004. Differences in ingestive balance of two populations of neotropical *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Comp Biochem Physiol A Physiol** 138:327-332.
- Gallardo P, Olea N, Sepúlveda FV. 2002. Distribution of aquaporin in the colon of *Octodon degus*, a South American desert rodent. **Am J Physiol** 283:R779-R788.
- Gallardo PA, Cortés A, Bozinovic F. 2005. Phenotypic flexibility at the molecular and organismal level allows desert-dwelling rodents to cope with seasonal water availability. **Physiol Biochem Zool** 78(2):145–152.
- Getz LL, Oli MK, Hofmann JE, Mcguire B, Ozgul A. 2005. Factors influencing movement distances of two species of sympatric voles. **J Mammal** 86(4):647-654.
- Hayes JP and Shonkwiler JS. 2006. Allometry, antilog transformations, and the perils of prediction on the original scale. **Physiol Biochem Zool** 79:665–674.
- Henry M, Cosson J-F, Pons J-M. 2007. Abundance may be a misleading indicator of fragmentation-sensitivity: The case of fig-eating bats. **Biol Conserv** 139(3–4):462-467.

- Haupt RT, Yang H. 1995. Water deprivation, plasma osmolality, blood volume, and thirst in young pigs. **Physiol Behav** 57(1):49-54.
- Knepper MA, Wade JB, Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Mandon B, Chou CL, Kishore BK, Nielson S. 1996. Renal aquaporins. **Kidney Int** 49:1712-1717.
- Kortenoeven MLA and Fenton RA. 2014. Renal aquaporins and water balance disorders. **Biochim Biophys Acta** 1840:1533–1549.
- Kutscher CL. 1966. Effect of hypertonic saline injections and water deprivation on drinking, serum osmolality and gut water. **Physiol Behav** 1:259–268.
- Laakkonen J. 2002. Relative medullary thickness of shrews from arid environments: Intraspecific spatial analysis, and comparison to arctic shrews and tropical tenrecs. **Ann Zool Fenn** 39:249-255.
- Lepkovsky S, Lyman R, Fleming D, Nagumo M, Demick MM. 1957. Gastrointestinal regulation of water and its effect on food intake and rate of digestion. **Am J Physiol** 188:327–331.
- Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. 1998. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. **J Biol Chem** 273:4296–4299.
- Macmillen RE and Hinds DS. 1983. Water regulatory efficiency in heteromyid rodents: a model and its application. **Ecology** 64:152–164.
- Mares MA. 1975. South American mammal zoogeography: evidence from convergent evolution in desert rodents. **P Natl Acad Sci USA** 72(5), 1702–1706.
- Mares MA. 1977. Water economy and salt balance in a South American desert rodent, *Eligmodontia typus*. **Comp Biochem Physiol A** 56:325-332.
- Metzger JP, Alves LF, Goulart W, Teixeira AMG, Simões SJC, Catharino ELM. 2006. Uma área de relevante interesse biológico, porém pouco conhecida: a Reserva Florestal do Morro Grande. **Biota Neotrop** 6(2).
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, Agre P. 1993. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. **J Cell Biol** 120:371–383.
- Nielsen S, Pallone T, Smith BL, Christensen EI, Agre P, Maunsbach AB. 1995. Aquaporin-1 water channels in short and long loop descending thin limbs and in descending vasa recta in rat kidney. **Am J Physiol** 268:F1023–F1037.
- Pardini R. 2004. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. **Biodivers Conserv** 13:2567-2586.
- Pardini R, Souza SM, Braga-Neto R, Metzger JP. 2005. The role of Forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic Forest landscape. **Biol Conserv** 124:253-266.
- Pardini R, Bueno AA, Gardner TA, Prado PI, Metzger JP, Fenton B. 2010. Beyond the Fragmentation Threshold Hypothesis: Regime Shifts in Biodiversity Across Fragmented Landscapes. **Plos One** 5(10):e13666.
- Pardini R, Umetsu F. 2006. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande – distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. **Biota Neotrop** 6(2).

- Pereira BF, Alves RMS, Alves AL, Senhorini JA, Rocha RCGA, Scalize PH, Pitol DL, Caetano FH. 2014. Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). **Microscopy Research** 2:39-49.
- Ribeiro MFS, Rocha PLB, Mendes LAF, Perry SF, Oliveira ES. 2004. Physiological effects of short term water deprivation in the South American sigmodontine Rice rat *Oligoryzomys nigripes* and water rat *Nectomys squamipes* within a phylogenetic context. **Can J Zoolog** 82(8):1326-1335.
- Rohlf FJ. 2001. Comparative methods for the analysis of continuous variables: geometric interpretations. **Evolution** 55:2143–2160.
- Schmidt-Nielsen B and Schmidt-Nielsen K. 1950. Evaporative water loss in desert rodents in their natural habitats. **Ecology** 31(1):75-85.
- Schoorlemmer GHM and Evered MD. 1993. Water and solute balance in rats during 10h water deprivation and rehydration. **Can J Physiol Pharmacol** 71:379–386.
- Schoorlemmer GHM and Evered MD. 2002. Reduced feeding during water deprivation depends on hydration of the gut. **Am J Physiol-Reg I** 283: R1061-R1069.
- Seebacher F. and Franklin CE. 2012. Determining environmental causes of biological effects: the need for a mechanistic physiological dimension in conservation biology. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 367(1596):1607-1614.
- Senn M, Gross-Luem S, Kaufmann A, Langhans W. 1996. Effect of water deprivations on eating patterns of lactating cows fed grass and corn pellets ad lib. **Physiol Behav** 60(6):1413–1418.
- Somero GN. 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. **J Exp Biol** 213: 912–920.
- Teixeira GR, Chuffa LGA, Martins OA, Kremer A, Pinheiro PFF, Júnior WM, Martinez M, Martinez FE, Domeniconi RF. 2012. The expression of aquaporins 1 and 9 in adult rat epididymis is perturbed by chronic exposure to ethanol. **Tissue Cell** 44:47–53.
- Umetsu F and Pardini R. 2007. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats: evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. **Landscape Ecol** 22:517–530.
- Umetsu F, Metzger JP, Pardini R. 2008. The importance of estimating matrix quality for modeling species distribution in complex tropical landscape: a test with Atlantic forest small mammals. **Ecography** 31:359–370.
- Verkman AS. 2000. Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 9:517-522.
- Wikelski M and Cooke SJ. 2006. Conservation physiology. **Trends Ecol Evol** 21:38–46.
- Williams-Linera G, Domínguez-Gastelú V, García-Zurita ME. 1998. Microenvironment and Floristics of Different Edges in a Fragmented Tropical Rainforest. **Conserv Biol** 12(5):1091–1102.
- Yang TS, Howard B, Macfarlane WV. 1981. Effects of food on drinking behavior of growing pigs. **Appl Anim Ethol** 7:259-270.
- Zhao D, Bankir L, Qian L, Yang D, Yang B. 2006. Urea and urine concentrating ability in mice lacking AQP1 and AQP3. **Am J Physiol Renal Physiol** 291:429–438.

## CAPÍTULO 2

### Plasticidade dos componentes do balanço hídrico em roedores com diferentes tolerâncias à fragmentação avaliada através de um protocolo de privação de água.

---

**Abstract.** *Water balance traits plasticity in rodents with distinct tolerances to fragmentation evaluated through a water deprivation protocol.* The process of loss and change of landscapedue to human action transform the plant cover patterns and influences individual species and species associations. Animals that inhabit highly modified areas are bound to changes in their microenvironment, which exert direct influence on the water balance components. The maintenance of water balance covers several complex processes, whose full evaluation is only possible with the use of an integrative approach.in this chapter we evaluate the water balance traits of *E. russatus* and *A. montensis*, aiming global comprehension of the mechanisms responsible for the distinct tolerance to water deprivation between these species. The reduction of food intake contributes with the body fluids regulation in both species, but seems to be of higher significance to *A. montensis*. Despite there hasn't been noticing of significant differences between the species values of relative medular thickness and relative medular area (RMA), *A. montensis* shows lightly higher values, reflecting its renal morphology, which results on the production of a more concentrated urine ( $U_{max}$ ) predicted by the morphological index. As a way to compensate the lower capacity due to its renal morphology, *E. russatus* seems to show a certain degree of flexibility on the urine concentration capacity through modulation of the distribution of aquaporin-1 channels. *A. montensis* undergo worst effects of evaporative water loss, which imposes a bigger challenge to its water balance and the higher total water flow observed in this species reflects the somatory of several differences on the physiological characteristics associated to the maintenance of water balance noticed between these species. The higher tolerance to water deprivation of *A. montensis*, due to its plasticity, seems to act as determining factor to its higher tolerance to fragmentation.

**Keywords:** *Akodon montensis*. *Euryoryzomys russatus*. Water balance. Water deprivation. Habit fragmentation. Food intake. Urine concentration. Total water flow. Morro Grande.

**Resumo:** O processo de perda e alteração da paisagem devido à ação antrópica modificam os padrões de cobertura vegetal e influenciam espécies individuais e associações de espécies. Animais que habitam áreas altamente modificadas estão sujeitos a modificações em seu microambiente que exercem influência direta nos componentes do balanço hídrico. A manutenção do balanço hídrico engloba uma série de processos complexos, cuja completa avaliação só é possível com a utilização de uma abordagem integrativa. Neste capítulo avaliamos os componentes do balanço hídrico de *E. russatus* e *A. montensis*, buscando uma compreensão global dos mecanismos responsáveis pela diferente tolerância à privação de água entre estas espécies. A redução na ingestão alimentar contribui para a regulação dos fluidos corporais nas duas espécies, mas parece ter maior significância para *A. montensis*. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as espécies quanto aos valores de espessura medular relativa e área medular relativa (AMR), *A. montensis* apresenta valores ligeiramente maiores, reflexo de sua morfologia renal, que resulta na produção de urina mais concentrada, quando privados de água, atingindo valores muito próximos à máxima concentração de urina ( $U_{max}$ ) predita pelos índices morfológicos. Como forma de compensar a menor capacidade decorrente de sua morfologia renal, *E. russatus* parece demonstrar certo grau de flexibilidade da capacidade de concentração através da modulação da distribuição dos canais de água aquaporina-1. *A. montensis* sofre maior efeito da perda evaporativa de água, o que impõe maior desafio ao seu balanço hídrico e o maior fluxo total de água observado nesta espécie reflete a somatória das várias diferenças observadas entre as espécies nos caracteres fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico. A maior tolerância à privação de água de *A. montensis*, decorrente de sua maior plasticidade, parece atuar como fator determinante da maior tolerância desta espécie à fragmentação.

**Palavras-chave:** *Akodon montensis*. *Euryoryzomys russatus*. Balanço hídrico. Privação de água. Fragmentação do habitat. Ingestão alimentar. Concentração de urina. Fluxo total de água. Morro Grande.

## Introdução

O processo de perda e alteração da paisagem devido à ação antrópica (fragmentação e degradação do habitat) representam uma das principais causas da perda de global de biodiversidade (Fahrig, 2003; Homyak, 2010), pois alteram processos ecológicos, modificam os padrões de cobertura vegetal e influenciam espécies individuais e associações de espécies (Lindenmayer e Fischer, 2007), causando impacto na riqueza de espécies e no funcionamento do ecossistema (Fahrig, 2003; Tabarelli et al, 2004; Cottontail et al, 2009). A fisiologia vem desempenhando papel importante em estudos sobre problemas conservacionistas nos últimos anos, através da Fisiologia da Conservação (Carey, 2005; Wikelski e Cooke, 2006; Chown e Gaston, 2008), cuja abordagem vai além da simples descrição de padrões, incluindo também informações detalhadas sobre os mecanismos subjacentes aos problemas conservacionistas (Wikelski e Cooke, 2006).

A manutenção dos fluidos corpóreos dentro de uma faixa definida é fundamental para o funcionamento ótimo de um animal (Schmidt-Nielsen, 2002), e para isso animais terrestres devem manter um influxo de água (ingestão de água livre, somado à ingestão de água no alimento e a água produzida metabolicamente) suficiente para balancear as perdas de água decorrentes da evaporação através da pele e dos pulmões, e das perdas associadas à excreção (Schmidt-Nielsen, 2002; McNab, 2002; Karasov e Martínez del Rio, 2009). Esta equação do balanço hídrico engloba uma série de processos complexos, cuja completa avaliação só é possível com a utilização de uma abordagem integrativa, avaliando desde seus aspectos fisiológicos até os mecanismos celulares e moleculares.

Animais que habitam áreas altamente modificadas estão sujeitas a modificações em seu microambiente que exercem influência direta nos componentes do balanço hídrico e na sua homeostase (Chappel, 1980). Estas alterações incluem a depleção das fontes de água livre para pequenos animais (Williams-Linera et al, 1998) decorrente de alterações na umidade relativa do ar e do solo, temperatura, dentre outros, podendo resultar num desequilíbrio interno, levando à desidratação (Jones et al, 1990).

Estudos sugerem que algumas espécies são mais resilientes que outras frente a mudanças ambientais (Viveiros de Castro e Fernandez, 2004; Umetso e Pardini,

2007; Püttker et al, 2008a, 2008b) e para manter populações viáveis nestes ambientes altamente modificados os animais precisam ajustar sua fisiologia (Seebacher e Franklin, 2012; Cooke et al., 2013). Nesse contexto espécies que evoluíram e são restritas a ambientes mais homogêneos demonstrariam menores capacidade de ajustar sua fisiologia frente a um estresse ambiental (Canale e Henry, 2010).

Em estudo anterior (Castellar et al, 2015; Capítulo 1) observamos que as espécies *E. russatus* e *A. montensis* apresentam diferentes tolerâncias à privação de água e que, apesar de ambas demonstrarem baixa plasticidade fenotípica dos caracteres fisiológicos estudados, as diferenças inerentes existentes entre as duas espécies pode ser parte do mecanismo que resulta na diferente tolerância à fragmentação do hábitat, observada por Pardini e colaboradores (Pardini, 2004; Pardini et al, 2005; Pardini e Umetso, 2006; Umetso e Pardini, 2007; Umetso et al, 2008; Pardini et al, 2010). Entretanto, alguns componentes importantes da equação de balanço hídrico não foram avaliados como, por exemplo, a concentração da urina, que foi apenas estimada com base na morfologia renal, não permitindo a completa compreensão dos mecanismos devido à complexidade dos processos envolvidos.

Neste capítulo o objetivo principal foi avaliar os componentes da equação do balanço hídrico de *E. russatus* e *A. montensis*, através de uma abordagem integrativa, buscando uma compreensão global dos mecanismos responsáveis pela diferente tolerância à privação de água observada em nosso estudo anterior. Para isso, utilizamos um protocolo de privação de água, e os dados obtidos fornecem amplo quadro da diversidade fisiológica que estes roedores possuem e de como estes parâmetros podem influenciar na resposta diferencial aos efeitos da fragmentação.

## **Métodos**

### *Área de Estudo*

O estudo foi realizado com animais provenientes da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG, 10.870 ha), localizada a sudoeste da cidade de São Paulo entre os municípios de Cotia e Ibiúna, e os limites da Serra de Paranapiacaba (23°35'S,

23°50' S; 46°45' W, 47°15' W; 860-1075 m de altitude). Informações detalhadas sobre clima, geologia, geomorfologia, pedologia, hidrografia e uso e cobertura do território encontram-se disponíveis em Metzger et al. (2006).

### *Protocolo experimental*

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA-UNESP/Rio Claro - Protocolo 3062). Ao todo 21 animais de duas espécies de roedores (*Akodon montensis*, n=14; e *Euryoryzomys russatus*, n=7) foram capturados (com autorização do ICMBio Sisbio - Processo: 33096-4) com armadilhas Sherman® e de interceptação e queda (Pardini et al. 2005) em plotes previamente estabelecidos na área de estudo. Para se evitar efeitos do sexo e estado reprodutivo, somente machos adultos não reprodutivos foram utilizados no presente estudo. Após a captura os animais foram transportados para as dependências do Departamento de Zoologia da UNESP (Rio Claro/SP) e acondicionados em gaiolas metabólicas individuais que permitiram a separação e a coleta das fezes e da urina produzida, além da quantificação da ingestão de alimento e de água, e mantidas em sala climatizada (Fitotrom – Eletrolab, Brasil) inicialmente ajustada para 25°C, com Umidade Relativa (UR) em torno de 70 a 80% e fotoperíodo de 12:12hs. Os animais foram aclimatados durante 7-10 dias a 25°C, com água e alimento (ração Nuvilab CR-1 para camundongos e ratos, Nuvital Nutrientes Ltda, Brasil) fornecidos ad libitum.

Após este período de aclimação, os animais das duas espécies foram divididos em dois grupos e submetidos a protocolo experimental modificado a partir de Ribeiro e colaboradores (2004). Um grupo foi submetido a um período de 5 dias alimentados com ração e água *ad libitum* (regime *Ad libitum* – AL). O outro grupo foi submetido a um período de 48h no qual toda a fonte de água exógena foi retirada (regime Privação de Água – PA).

Durante os dois regimes (AL e PA) o peso corporal ( $M_c$ ), a ingestão de alimento (IA), a ingestão de água (água livre + água contida no alimento –  $I_{H_2O}$ ), a produção de fezes (PF) e o volume de urina (VU) foram medidas em bases diárias. A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação entre a ingestão de alimentos (IA) e a produção de fezes (PF). A relação  $I_{H_2O}:VU$  foi calculada a partir

dos dados de  $I_{H_2O}$  e VU. A osmolalidade da urina (U) foi determinada através de osmômetro (ML Knauer Semi-Micro Osmometer, Alemanha) para amostras maiores que 50 $\mu$ L. Osmolalidade das amostras menores que 50 $\mu$ L não puderam ser determinadas. Os valores de U obtidos durante o regime PA foram comparados com os valores de osmolalidade máxima ( $U_{max}$ ) preditos pelos índices morfológicos renais.

#### *Perda de água evaporativa*

Os valores de variação na umidade relativa (UR) medidos durante a respirometria de fluxo aberto, realizada na mesma temperatura de aclimação, foram utilizados para calcular a perda de água evaporativa total. Para isso, os animais foram acondicionados em respirômetros customizados (volume interno de 400 ml), os quais foram colocados em estufa BOD com controle de temperatura. Ar comprimido, após a eliminação de  $CO_2$  e vapor de água, foi enviado ao respirômetro com volume controlado por um fluxímetro de massa multicanal (MF-8 Mass Flow Meter, Sable System, Las Vegas, NY, USA). O ar foi então empurrado dos respirômetros para um sensor de umidade relativa (Sable Systems RH-100; resolução 0,001% UR, acurácia 1% do valor registrado). Os valores de umidade relativa foram registrados por pelo menos 90 minutos em intervalos de 1 minuto através do programa Expedata<sup>®</sup> (Sable System, Las Vegas, NY, USA). O conteúdo de água evaporativa foi calculado como a diferença entre a pressão de vapor de água (PVA, kPa, medido pelo RH-100) do ar ambiente (baseline) e o valor produzido pelo animal.

O valor de PVA (medido em kPa) obtido foi então convertido em densidade de vapor de água (DVA) através da equação:  $DVA = PVA / (T \times R_w)$  - segundo Lighton (2008); Eq. 10.10 - onde o T é a temperatura (em °K) e  $R_w$  é a constante dos gases para o vapor de água (461,5 J.Kg<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>). A taxa de perda de água evaporativa foi então calculada como:  $PAE = DVA \times FR$  - segundo Lighton (2008) - onde FR é o fluxo do ar enviado ao respirômetro (ml/min).

#### *Fluxo total de água*

O fluxo total de água (FTA) foi avaliado apenas no último dia de cada regime através da técnica de água duplamente marcada (Doubly Labeled Water - DLW), que envolve a marcação isotópica dos fluidos corporais dos animais. Os animais foram pesados ( $\pm 0,01$  g) e levemente anestesiados, de modo a permitir a injeção segura de água duplamente marcada ( $35\%O_{18}$  e  $65\%^2H$ ) na cavidade intraperitoneal, e evitando a perda de massa injetável. Para determinar a massa do injetado com precisão, a seringa foi pesada imediatamente antes e depois da injeção ( $\pm 0,0001$  g).

Os animais foram então devolvidos às gaiolas por 60min para permitir o equilíbrio dos isótopos com a água do corpo. Uma amostra de 100 $\mu$ l de sangue foi então coletada do sino infraorbital utilizando vidros capilares, que foram imediatamente selados a fogo (Voigt e Cruz-Neto, 2009). As amostras de sangue foram enviadas ao Doubly-labelled water Resource Centre (DLWRC, Universidade de Aberdeen - UK), onde foram analisados. O fluxo total de água (FTA) foi calculado segundo a equação:  $FTA=1,017 \times N \times K_d$  - Speakman, (1997) – onde N é o valor de água corporal (mol) e  $K_d$  é o valor de lavagem do isótopo ( $^2H$ ).

### *Morfologia Renal*

Os rins foram medidos em sua largura, comprimento e espessura, com um paquímetro digital (Mitutoyo – precisão 0,01mm), e o volume do rim (VR – em mm<sup>3</sup>) foi calculado como o produto destas variáveis. Um corte sagital foi realizado no rim direito (se um corte completo não pode ser feito, o rim esquerdo foi utilizado) e, utilizando um scanner, as imagens foram digitalizadas. As medidas de espessura do córtex, espessura das camadas medulares (interna e externa), área da medula (AM) e área do córtex (AC) foram realizadas com o auxílio do software livre ImageJ. A espessura medular (EM) foi calculada como a soma dos valores de espessura das camadas interna e externa da medula, e os valores de espessura medular relativa ( $EMR=10 \times [EM] / [VR]^{1/3}$ ) e área medular relativa ( $AMR= AM/AC$ ) foram então calculados (Sperber, 1944; Bronwfield e Wunder, 1976; Al-Kahtani et al, 2004).

Os valores de EMR e AMR (transformados em  $\log_{10}$ ) foram comparados com outros roedores através de relações alométricas tradicionais. A equação alométrica utilizada para a avaliação da EMR foi:  $\log_{10}EMR = 0,704 - 0,139 \times \log_{10}M_c$  (118

espécies, Castellar et al, 2015). Para AMR, uma equação alométrica foi calculada a partir de dados disponíveis na literatura para 18 espécies de roedores. Os valores de EMR e AMR foram utilizados para estimar a concentração máxima da urina ( $U_{\max} = 542 \times \text{EMR} + 154$  - Beuchat, 1996;  $U_{\max} = 873 + 2106 \times \text{AMR}$  - Bronwfield e Wunder, 1976) para as espécies de interesse, valores que foram comparados com os dados obtidos durante o regime PA.

### *Imunoistoquímica*

Após a fixação histológica, as amostras de tecidos foram lavadas por 24 horas em água corrente e submetidas à rotina para inclusão em Paraplast. Seguindo à inclusão, foi realizada a microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4-5  $\mu\text{m}$  de espessura, em lâminas silanizadas (DAKO, Carpinteria, California). Os cortes foram desparafinizados e submetidos à rotina de reação imunohistoquímica utilizando-se anticorpos policlonais anti-aquaporina (anti-AQP1; Chemicon Temecula, CA, USA), diluída 1:400 em albumina do soro bovino (BSA) incubados "overnight". Após lavagem em tampão fostato-salino (PBS), ocorreu a incubação em anticorpo secundário biotilado (coelho-anti IgG de cabra; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 1 hora a 37°C, seguida de outra lavagem para revelação com cromógeno (DAB; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). As lâminas histológicas, submetidas às reações imunohistoquímicas, foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica DM 2000 acoplado a uma câmera Olympus BX51 para verificar possível reação positiva dos cortes teciduais aos anticorpos empregados na imunohistoquímica. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software livre ImageJ e a quantificação da imunoreatividade (segundo Pereira et al, 2014) foi realizada e expressa como porcentagem de reação para o córtex (%RC) e para medula renal (%RM).

### *Análise estatística*

Antes das análises estatísticas os dados foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk). Foram utilizados os teste t-Student (2 amostras) e o teste-U de Mann-Whitney para comparar os valores das variáveis IA, IH<sub>2</sub>O, VU, PF e U para os regimes ad libitum (AL) e restrição de água (PA), normalizadas para o peso.

Diferenças entre a porcentagem de reação para córtex (%RC; transformado para raiz quadrada do arco-seno) e medula (%RM; transformado para raiz quadrada do arco-seno) entre as espécies e tratamentos foram avaliados com ANOVA.

Os dados de PAE foram comparados com os valores preditos para animais de massa similar através da equação  $PAE = 5,968 M_c^{-0,416}$  (Cortés et al, 2000). O anti-logaritmo dos valores preditos foi calculado segundo Hayes e Shonkwiler (2006). A conformação com a alometria convencional foi determinada com base nos limites de predição de 95% (segundo Cooper e Withers, 2006). As diferenças entre os grupos AL e PA foram verificadas através do teste t-Student (2 amostras) e do teste-U de Mann-Whitney.

Resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão e  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o software statistiXL (versão 1.8; StatistiXL), SigmaPlot (versão 11; Systat Software) e STATISTICA® (versão 5.1 para Windows).

## Resultados

Para *A. montensis* submetido ao regime AL (água *ad libitum*), o valor de massa corporal ( $M_c$ ) foi de  $37,1 \pm 0,9g$ , IA foi de  $278,6 \pm 48,1 mg \cdot h^{-1}$ ,  $I_{H_2O}$  foi  $652,1 \pm 214,3 \mu L \cdot h^{-1}$ , VU foi  $82,2 \pm 26,1 \mu L \cdot h^{-1}$  e PF foi  $75,0 \pm 16,2 mg \cdot h^{-1}$  (valores normalizados se encontram nas Tabelas 1 e 2). A perda de água nas fezes foi em média 34,5% do peso das fezes. A produção de fezes (FE) está significativamente correlacionada com a ingestão de alimentos ( $P < 0,05$ ).

A comparação entre os dados obtidos nos regimes AL e PA mostra aumento significativo da osmolalidade da urina (U), passando de  $1465 \pm 137 mosmol \cdot kg^{-1}$  no regime AL para  $1965 \pm 79 mosmol \cdot kg^{-1}$  no regime PA (Figura 1). Também foram encontradas diferenças significativas em IA, VU e PF, sendo que os valores atingidos no regime PA foram  $87,1 \pm 44,6 mg \cdot h^{-1}$ ,  $22,0 \pm 14,3 \mu L \cdot h^{-1}$  e  $18,1 \pm 11,9 mg \cdot h^{-1}$  respectivamente (valores normalizados se encontram nas Tabelas 1 e 2;  $p < 0,05$  para todas as variáveis). A perda de água nas fezes foi em média 23,2% do peso das fezes.

Os valores de PAE e FTA para os dois regimes são apresentados na Tabela 3. A PAE de *A. montensis* no grupo controle atingiu em média 78,6% do predito por

alometria, enquanto FTA foi de 86,2% do valor predito para animais com peso semelhante. Em comparação com os animais submetidos ao regime PA (privação de água), não foram observadas diferenças significativas para os valores de PAE. Entretanto, o FTA foi significativamente menor que o valor observado para o regime AL ( $F_{4,9}=48,134$ ;  $P<0,001$ ).

A comparação entre os valores de U para *A. montensis* com o predito pela sua morfologia renal (EMR e AMR) é apresentado na Tabela 4.

**Tabela 1.** Ingestão de alimento (IA) e produção de fezes (PF) de *A. montensis* (AL  $n=6$  e PA  $n=6$ ) e *E. russatus* (AL  $n=4$  e PA  $n=3$ ) com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

Espécies	IA ( $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )		PF ( $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )	
	AL	PA	AL	PA
<i>A. montensis</i>	765,4±138,7 <sup>a,b</sup>	248,2±126,5	209,9±44,2 <sup>a,b</sup>	50,5±33,1 <sup>b</sup>
<i>E. russatus</i>	420,4±188,2 <sup>a,b</sup>	224,4±291,9	53,8±34,2 <sup>a,b</sup>	21,2±14,8 <sup>b</sup>

Nota: <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma espécie; <sup>b</sup> indica diferença significativa entre as espécies, para o mesmo regime; ( $P<0,05$ ). Resultados são apresentados em média±DP.

**Tabela 2.** Ingestão de água ( $\text{IH}_2\text{O}$ ), osmolalidade da urina (U), volume de urina (VU) e relação  $\text{IH}_2\text{O}:\text{VU}$  de *A. montensis* (AL  $n=6$  e PA  $n=6$ ) e *E. russatus* (AL  $n=4$  e PA  $n=3$ ) com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

Espécies	$\text{IH}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )		U ( $\text{mosmol}\cdot\text{kgH}_2\text{O}^{-1}$ )		VU ( $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )		$\text{IH}_2\text{O}:\text{VU}$	
	AL	PA	AL	PA	AL	PA	AL	PA
<i>A. montensis</i>	1809±597	-	1465±137 <sup>a,b</sup>	1965±79 <sup>b</sup>	222±88 <sup>a,b</sup>	57±37 <sup>b</sup>	6,72	-
<i>E. russatus</i>	1406±435	-	1022±48 <sup>a,b</sup>	1309±80 <sup>b</sup>	324±97 <sup>a,b</sup>	137±38 <sup>b</sup>	3,96	-

Nota: <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma espécie; <sup>b</sup> indica diferença significativa entre as espécies, para o mesmo regime; ( $P<0,05$ ). Resultados são apresentados em média±DP.

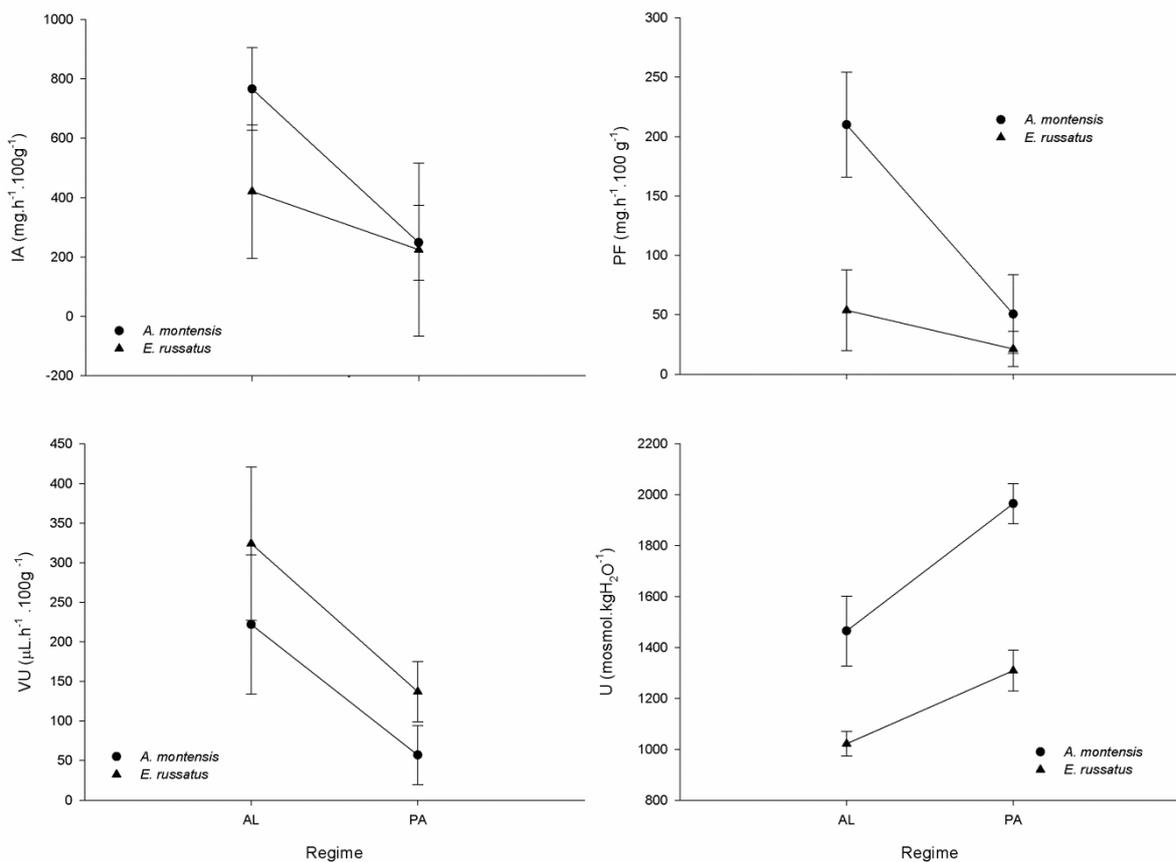
Para *E. russatus* submetido ao regime AL (água *ad libitum*), o valor de massa corporal ( $M_c$ ) foi de  $76,8 \pm 3,4\text{g}$ , IA foi de  $317,6 \pm 147,2 \text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $\text{IH}_2\text{O}$  foi  $1077,8 \pm 330,0 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , VU foi  $249,7 \pm 77,8 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  e PF foi  $39,9 \pm 25,6 \text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$  (valores normalizados se encontram nas Tabelas 1 e 2). A perda de água nas fezes foi em

média de 37,3% do peso das fezes. A produção de fezes (PF) foi significativamente correlacionada com a ingestão de alimentos ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Perda de água evaporativa (PAE), fluxo total de água (FTA) e a relação PAE/FTA (%) de *A. montensis* (AL  $n=6$  e PA  $n=6$ ) e *E. russatus* (AL  $n=4$  e PA  $n=3$ ) com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

Espécie	PAE ( $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ )		FTA ( $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ )		PAE/FTA (%)	
	AL	PA	AL	PA	AL	PA
<i>A. montensis</i>	$0,043 \pm 0,006^b$	$0,052 \pm 0,009^b$	$0,384 \pm 0,062^a$	$0,058 \pm 0,008$	12,9	89,3
<i>E. russatus</i>	$0,035 \pm 0,001^b$	$0,037 \pm 0,001^b$	$0,267 \pm 0,056^a$	$0,066 \pm 0,003$	12,1	55,7

Nota: <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma espécie; <sup>b</sup> indica diferença significativa entre as espécies, para o mesmo regime; ( $P < 0,05$ ). Resultados são apresentados em média  $\pm$  DP.



**Figura 1.** Comparação das variáveis ingestão de alimento (IA), produção de fezes (PF), volume de urina (VU) e osmolalidade da urina (U) para *A. montensis* e *E. russatus*, submetidas ao regime *ad libitum* (AL) e de privação de água (PA).

A comparação entre os dados obtidos nos regimes AL e PA mostra aumento significativo da osmolalidade da urina (U), passando de  $1022 \pm 48 \text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  no regime AL para  $1309 \pm 80 \text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  no regime PA (Figura 1). A comparação entre os valores de U para *E. russatus* com o predito pela sua morfologia renal (EMR e AMR) é apresentado na Tabela 4. Também foram encontradas diferenças significativas em IA, VU e PF, sendo que os valores atingidos no regime AL foram  $97,2 \pm 27,1 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $53,6 \pm 15,3 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  e  $7,3 \pm 4,8 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$  respectivamente (valores normalizados se encontram nas Tabelas 1 e 2;  $p < 0,05$  para todas as variáveis). A perda de água nas fezes foi em média de 24,3% do peso das fezes.

Os valores de PAE e FTA de *E. russatus* para os dois regimes são apresentados na Tabela 3. A PAE de *E. russatus* no grupo controle atingiu em média 86,5% do predito por alometria, enquanto FTA foi de 91,9% do valor predito para animais com peso semelhante. Em comparação com os animais submetidos ao regime PA (privação de água), foram observadas diferenças significativas para os valores de PAE, mas a diferença observada é relacionada à diferença de massa entre os animais dos dois grupos. Quando controlados os efeitos da massa, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Foram observadas diferenças significativas, mesmo depois de excluídos os efeitos da massa, no FTA ( $F_{4,4}=1,841$ ;  $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Comparação entre os valores de osmolalidade (U) obtidos durante o regime PA e os valores de osmolalidade máxima ( $U_{\text{max}}$ ) preditos através dos índices de morfologia renal (EMR - segundo Beuchat, 1996; AMR - segundo Bronwfield e Wunder, 1976).

Espécie	U	$U_{\text{max}}$	$U_{\text{max}}$
	( $\text{mosmol}\cdot\text{kgH}_2\text{O}^{-1}$ ) regime PA	( $\text{mosmol}\cdot\text{kgH}_2\text{O}^{-1}$ ) Predito por EMR	( $\text{mosmol}\cdot\text{kgH}_2\text{O}^{-1}$ ) predito por AMR
<i>A. montensis</i> (n=5)	$1965 \pm 219$	2519 (-22,0%)	2004 (- 1,9 %)
<i>E. russatus</i> (n=3)	$1309 \pm 80$	2302 (-43,1%)	1930 (-32,2%)

Nota: A diferença entre o valor obtido e o predito é apresentada como % entre parênteses.

Na comparação entre as espécies sob o regime AL, a ingestão de alimentos (IA), a produção de fezes (PF) e a osmolalidade da urina (U), normalizadas para a massa corporal, foram significativamente maiores para *A. montensis* do que para *E.*

*russatus* ( $P < 0,05$  para todas as variáveis), mas as espécies não diferiram ( $P = 0,420$ ) em relação à ingestão de água ( $\text{IH}_2\text{O}$ ), também normalizada (Tabelas 1 e 2). Entretanto, os valores de volume de urina (VU) normalizados foram significativamente maiores para *E. russatus* quando comparados com *A. montensis* ( $P < 0,05$ ; Tabela 2). Ainda quando submetidas ao regime AL (*ad libitum*), nenhuma diferença significativa foi observada para FTA quando controlados os efeitos da diferença de massa, entretanto a PAE foi significativamente maior em *A. montensis* ( $F_{4,3} = 6,837$ ;  $P < 0,05$ ).

Quando submetidas ao regime PA as duas espécies não apresentam diferenças entre si quanto à ingestão de alimentos (IA). Entretanto, *A. montensis* apresentou VU significativamente menor ( $F_{4,3} = 3,760$ ;  $P < 0,05$ ), enquanto PF ( $F_{4,3} = 2,916$ ;  $P < 0,05$ ) e U ( $F_{4,3} = 6,265$ ;  $P < 0,05$ ) foram significativamente maiores que o observado para *E. russatus*. No mesmo regime (PA) não houve diferença significativa entre as espécies para FTA, sendo que PAE foi significativamente maior em *A. montensis* ( $F_{4,3} = 5,055$ ;  $p < 0,05$ ).

Os valores de EMR (Tabela 5) são consistentes com os observados em trabalho anterior (Castellar et al, 2015; Capítulo 1). Nenhuma diferença significativa foi observada nos valores de EMR entre os tratamentos para *A. montensis* e *E. russatus* ( $P > 0,1$  para ambas as espécies), apesar dos valores de EMR para a espécie *E. russatus* serem consistentemente menores que os observados para *A. montensis*. Em comparação com outras espécies de roedores, as duas espécies mostraram valores de EMR mais baixos do que o predito por alometria para roedores com massa similar (Tabela 5), sendo que ambas ficam abaixo do limite de predição de 95% da regressão linear. Assim como observamos em nosso trabalho anterior (Castellar et al, 2015; Capítulo 1), *E. russatus* apresentou valores mais baixos de EMR (9,81% abaixo do predito para o regime AL e 19,36% abaixo do predito para o regime PA) quando comparado à *A. montensis* (9,20% e 5,08% abaixo do predito para os regimes AL e PA, respectivamente).

Os valores de AMR para *A. montensis* foram  $0,519 \pm 0,090$  (regime AL) e  $0,537 \pm 0,237$  (regime PA). Os valores de AMR para *E. russatus* foram  $0,487 \pm 0,100$  (regime AL) e  $0,502 \pm 0,069$  (regime PA). Assim como observado para EMR, não foram observadas diferenças significativas quando comparados os valores de AMR das duas espécies no regime AL ( $P = 0,07$ ) e no regime PA ( $P = 0,376$ ). Quando comparados com outros roedores, os valores de AMR não se mostraram

significativamente correlacionados com a massa corporal, sendo que a equação alométrica convencional obtida ( $\log_{10}AMR = 0,357 - 0,178 \times \log_{10}M_c$ ) não foi significativa ( $r^2=0,164$ ;  $F_{1,17}=3,128$ ;  $P=0,111$ ).

**Tabela 5.** Comparação entre *A. montensis* e *E. russatus* com as relações alométricas convencionais para espessura medular relativa (EMR).

Espécie	EMR	EMRp	Análise Alométrica		
			%EMR	%LP	dentro 95% LP
<i>A. montensis</i> (PA)	4,54±0,50	8,02	-56,64	-9,20	Não
<i>E. russatus</i> (PA)	4,09±0,33	7,83	-52,33	-9,81	Não
<i>A. montensis</i> (AL)	4,51±0,68	7,99	-56,47	-5,08	Não
<i>E. russatus</i> (AL)	2,89±0,54	7,23	-43,12	-19,36	Não

AL – regime *ad libitum*; PA – regime privação de água; EMR – valores de EMR; EMRp – valor de EMR predito por alometria; %EMR – valor de EMR como % do predito; %LP – indica quanto (%) os valores de EMR estão abaixo do limite de predição inferior; dentro 95% LP indica se o dado se encontra dentro do limite de predição de 95%.

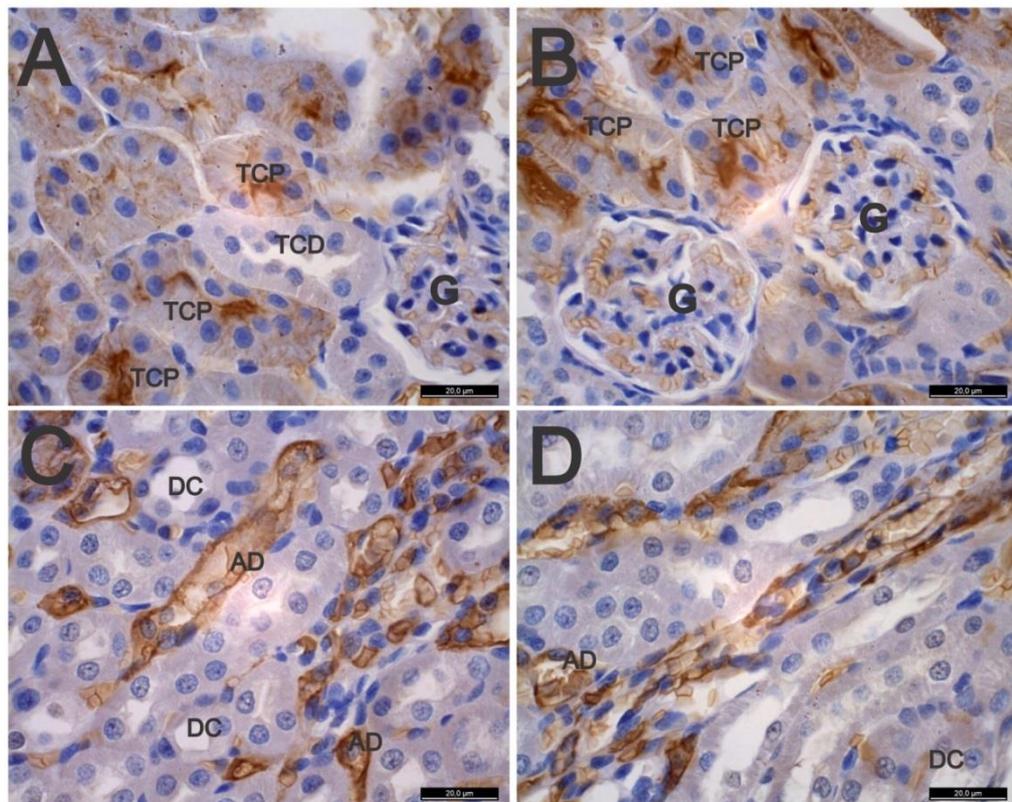
Para as duas espécies, a imunorreação para AQP-1 foi positiva apenas nos túbulos proximais (TCP, Figuras 2 e 3) e nas alças descendentes (AD, Figuras 2 e 3) das alças de Henle, sendo condizente com resultados observados em nosso trabalho anterior (Castellar et al, 2015). Nenhuma diferença no padrão de distribuição e na intensidade de reação para AQP-1 nas alças descendentes (AD) foi observada entre as espécies, nem entre os dois regimes de tratamento (Tabela 6). Não foram observadas diferenças significativas na intensidade de reação entre as espécies, para os animais submetidos ao regime AL (Tabela 6). Apesar disso, o padrão de distribuição das AQP-1 é mais homogêneo em *A. montensis* do que o observado em *E. russatus*.

**Tabela 6** – Porcentagem de reação ( $\pm$  desvio padrão) para reação de AQP-1 no córtex e na medula renal.

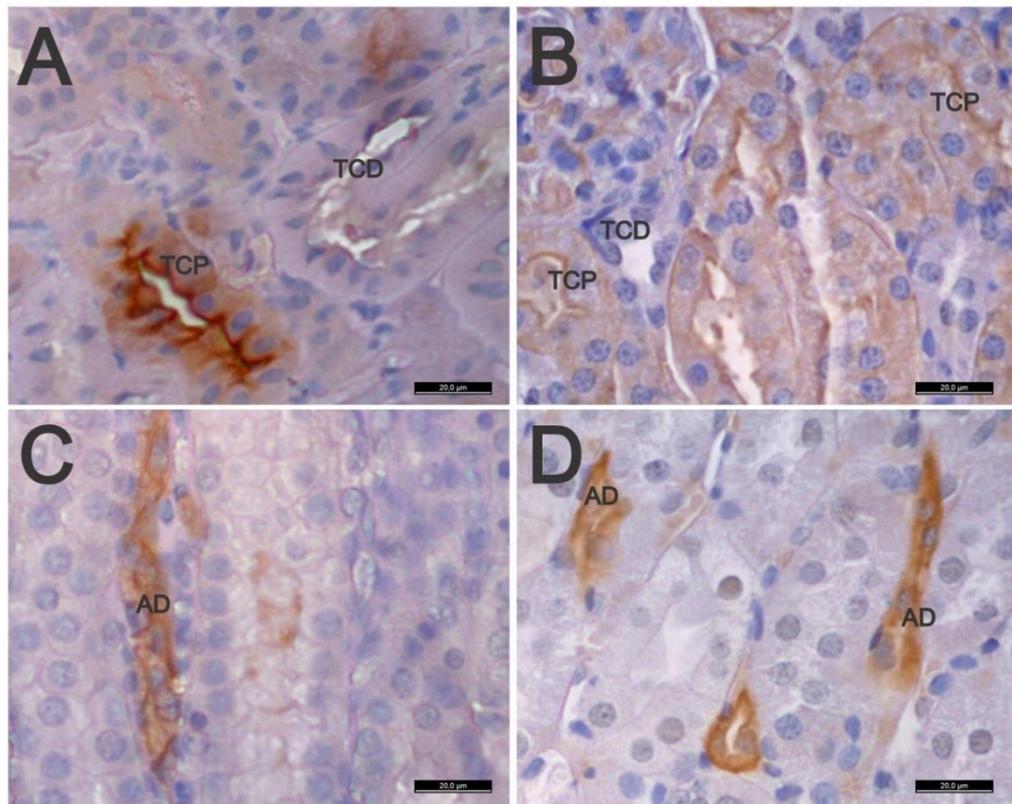
Espécie	Tratamento	% RC	% RM
<i>A. montensis</i> (n=5)	AL	4,42 $\pm$ 0,86	3,71 $\pm$ 0,43
<i>E. russatus</i> (n=3)	AL	4,78 $\pm$ 1,04	3,46 $\pm$ 1,37
<i>A. montensis</i> (n=5)	PA	4,59 $\pm$ 1,26	3,52 $\pm$ 0,98
<i>E. russatus</i> (n=3)	PA	5,94 $\pm$ 1,61 <sup>a</sup>	3,99 $\pm$ 0,93

AL – Regime *Ad libitum*; PA – Grupo privação de água; %RC – Porcentagem de reação no córtex renal; %RM – Porcentagem de reação na medula renal – a  $\neq$  *E. russatus* (C);  $P<0,05$ .

Para todas as espécies, a distribuição da aquaporina-1 (AQP-1) para os animais submetidos ao regime PA parece ser muito mais ampla e homogênea distribuída por todas as seções dos TCP. Apesar disso, apenas *E. russatus* parece ser capaz de modular a expressão das AQP-1 nos TCP, sendo que este aumento é representado pelo aumento significativo na intensidade de reação ( $F_{1,5}=3,830$ ;  $P<0,05$ ; Tabela 6).



**Figura 2.** Imunolocalização da AQP-1 na Região Cortical (A e B) e Medular (C e D) do rim de *A. montensis* para o regime *ad libitum* (A e C) e de privação de água (B e D). A reação pôde ser observada nas regiões apicais e laterais das células que compõe os Tubos Contorcidos Proximais para a região cortical (A e B) e nas regiões apicais das células que compõe as porções descendentes das Alças de Henle (C e D). TCP-Tubo contorcido proximal; TCD-Tubo contorcido distal; G-Glomerulo; AD-porção descendente da Alça de Henle; DC-Duto Coletor. Aumento: 40x100.



**Figura 3.** Imunolocalização da AQP-1 na Região Cortical (A e B) e Medular (C e D) do rim de *E. russatus* para o regime *ad libitum* (A e C) e de privação de água (B e D). A reação pôde ser observada nas regiões apicais e laterais das células que compõe os Tubos Contorcidos Proximais para a região cortical (A e B) e nas regiões apicais das células que compõe as porções descendentes das Alças de Henle (C e D). TCP-Tubo contorcido proximal; TCD-Tubo contorcido distal; G-Glomerulo; AD-porção descendente da Alça de Henle; DC-Duto Coletor. Aumento: 40x100.

## Discussão

Em estudo anterior (Castellar et al, 2015; Capítulo 1) observamos que as espécies de *A. montensis* e *E. russatus* apresentam tolerâncias baixa à privação de água em comparação com animais de ambientes desérticos, mas que as diferenças intrínsecas entre as espécies podem representar uma vantagem quando estas enfrentam os efeitos da fragmentação. Segundo o mesmo trabalho, a privação de água por período máxima tolerada por estas espécies foi em média de  $3,9 \pm 0,7$  dias para *A. montensis* e  $5,5 \pm 1,0$  dias para *E. russatus* (Castellar et al, 2015). Com base nestes valores, e considerando outros experimentos com roedores silvestres que mostram que a privação de água por período de 18h é suficiente para causar alterações fisiológicas (Favaroni-Mendes et al, 2004; Ribeiro et al, 2004), nós determinamos que o período de 48h aqui utilizado seria suficiente pra produzir alterações fisiológicas em *A. montensis* e *E. russatus*.

A privação de água por curtos períodos de tempo pode ser relevante até mesmo para animais que habitam ambientes húmidos (Ribeiro et al, 2004), e a capacidade de resposta a estas alterações pode ser enquadrada dentro da plasticidade de ajuste fisiológico de cada espécie. Esta plasticidade deve ser o primeiro mecanismo a atuar quando os animais são submetidos a pressões ambientais repentinas (Canale e Henry, 2010), e pode atuar como fator determinante da tolerância ou não desta espécie à fragmentação (Somero, 2010; Seebacher e Franklin, 2012; Cooke et al, 2013).

Espécies que evoluíram em ambientes mais instáveis talvez estejam melhores preparadas para lidar com mudanças repentinas no ambiente, desde que as alterações permaneçam dentro de suas capacidades (Canale e Henry, 2010), e deste modo, nossa hipótese é de que a espécie *A. montensis*, considerada não endêmica e sendo encontrada em biomas abertos e heterogêneos como Cerrado e Cerradão (Umetso et al, 2008), possua uma maior plasticidade dos caracteres fisiológicos responsáveis pela manutenção do balanço hídrico, quando comparada a *E. russatus*, espécie considerada endêmica do bioma Mata Atlântica.

Nenhuma das espécies foi capaz de manter a ingestão de alimento durante o regime de privação de água (PA), apresentando reduções significativas na ingestão alimentar (IA). Esta redução contribui para a regulação dos fluídos corporais de duas maneiras: 1) a inibição da ingestão alimentar permite a reabsorção do grande volume de água sequestrada osmoticamente no intestino (Lepkovsky et al., 1957; Kutscher, 1966; Schoorlemmer e Evered, 1993); e 2) reduzindo a perda de água na urina, devido à menor carga de solutos (Schoorlemmer e Evered, 2002).

Apesar das duas espécies reduzirem suas ingestões alimentares quando privadas de água, *A. montensis* apresentou redução na sua ingestão em cerca de 65% durante o regime PA, enquanto *E. russatus* reduziu sua IA em 52,3%. Apesar de apresentar inicialmente uma ingestão cerca de 82% maior que *E. russatus* durante o regime AL, a maior capacidade de redução da IA de *A. montensis* fez com que as duas espécies apresentassem a mesma ingestão média durante o regime PA. Considerando-se as vantagens da inibição da ingestão alimentar para o balanço hídrico, durante a privação de água (Lepkovsky et al., 1957; Kutscher, 1966; Schoorlemmer e Evered, 1993; Schoorlemmer e Evered, 2002), a maior redução

observada em *A. montensis* se apresenta como uma vantagem em relação à *E. russatus*, frente à privação de água.

Apesar de não observadas diferenças significativas entre as espécies, a redução na perda de água nas fezes de em média 35,9% do peso das fezes (regime AL) para cerca de 23,7% (regime PA) representa uma grande economia de água, além de ser uma importante adaptação a períodos de privação de água. Esta redução da quantidade de água eliminada pelas fezes pode estar relacionada à presença dos canais de água aquaporinas no cólon, cuja atuação na reabsorção de água foi demonstrada em algumas espécies de roedores que habitam ambientes xéricos (Cortés et al, 1988; Gallardo et al, 2002; Bozinovic et al, 2003; Gallardo et al 2005). Em *Octodon degus*, uma espécie de roedor de deserto sul-americano, APQ-1 é expressa nas membranas apical e basolateral do epitélio absorptivo do cólon distal (Gallardo et al 2002), e quando inibida reduz drasticamente a reabsorção de água na região, evidenciando o papel destas proteínas na reabsorção de água das fezes (Gallardo et al 2002), permitindo a conservação de água em *O. degus* (Cortés et al, 1988). A atuação de mecanismo semelhante poderia explicar a redução da perda de água nas fezes de *A. montensis* e *E. russatus*, auxiliando na manutenção do balanço hídrico frente à privação de água.

Estudos fisiológicos tradicionalmente avaliam a capacidade de concentrar urina como um indicador da eficiência na regulação do balanço hídrico (Schmidt-Nielsen, 1964; McNab, 2002). O índice EMR foi inicialmente proposto por Sperber (1944) como índice estrutural para quantificação do comprimento das alças de Henle longas, e Schmidt-Nielsen e O'Dell (1961) foram os primeiros a demonstrar a relação quantitativa entre o EMR e a máxima capacidade de concentração de urina. Desde então este índice vem sendo utilizado como uma estimativa da capacidade máxima de concentração de urina por vários autores (Sperber, 1944, Bronwfield e Wunder, 1976; Beuchat, 1990, 1996; Al-Kahtani et al, 2004; Diaz et al, 2006; Casotti et al., 2006; Coleman e Downs, 2009). Entretanto, o comprimento máximo das alças de Henle (refletido diretamente no valor de EMR) não é a única determinante da variação na habilidade de concentrar urina. Outras importantes características estruturais, incluindo o arranjo dos vasos (vasa recta) com a medula, a heterogeneidade do néfron, e o grau de confluência dos dutos coletores, são fatores determinantes da capacidade de concentração de urina (Al-Kahtani et al,2004).

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as espécies quanto aos valores de EMR, *A. montensis* apresenta EMR ligeiramente maior que *E. russatus*, e essa diferença poderia representar por si só maior capacidade de concentração de urina. Porém desde a introdução da EMR como método para predição a capacidade de concentração de urina, estudos mostram que algumas espécies que não se enquadram nesta predição (Schmidt-Nielsen e O'Dell, 1961; Schmidt-Nielsen et al, 1961; Gutman e Byeth, 1970; Bronwfield e Wunder, 1976). Bronwfield e Wunder (1976) propuseram um novo índice que permite estimar a capacidade do rim com maior precisão em comparação a outros métodos, a área medular relativa (AMR). Assim como observado para EMR, os valores de AMR não diferiram significativamente entre as espécies nem entre os regimes (AL e PA), porém os valores observados para *E. russatus* são menores que os valores obtidos para *A. montensis*. Esta diferença corrobora os dados de EMR, reforçando a hipótese de que *A. montensis* apresenta maior capacidade de concentração máxima de urina, refletindo em maior eficiência da regulação do balanço hídrico.

De fato, nossos dados mostram que *A. montensis* exibiu maior capacidade de concentração de urina, resultando em maiores valores de osmolalidade quando privados de água (regime PA) e em menores volumes de urina produzida, em comparação a *E. russatus*, confirmando o esperado com base na morfologia renal das espécies.

Quando comparados os valores de máxima concentração de urina ( $U_{max}$ ), preditos pelos índices morfológicos EMR e AMR, com os valores de concentração de urina ( $U$ ) observados durante a privação de água (regime PA), as duas espécies ficaram abaixo do predito pela sua morfologia, todavia independentemente da escolha do índice, *E. russatus* exibe valores de concentração de urina muito abaixo da capacidade máxima predita pela sua morfologia renal. Apesar de abaixo do predito, os valores de concentração de urina atingidos pela espécie *A. montensis* foram significativamente maiores que pela espécie *E. russatus*. A baixa capacidade de concentração de urina observada para *E. russatus*, em comparação à *A. montensis*, pode ser fator determinante na resposta à privação de água de curta duração no ambiente. Neste contexto, *A. montensis* parece apresentar melhor eficiência na regulação do balanço hídrico, sendo esse um dos mecanismos por trás da maior tolerância à privação de água, conferindo-lhe uma vantagem frente às

mudanças decorrentes da fragmentação e atuando como um dos mecanismos associados à sua maior tolerância aos efeitos desta.

Como forma de compensar a menor capacidade decorrente de sua morfologia renal, *E. russatus* parece demonstrar certo grau de flexibilidade da capacidade de concentração de urina a nível celular (Castellar et al, 2015). A imunorreação positiva para AQP-1 nos túbulos proximais do néfron, para as duas espécies estudadas, está de acordo com o padrão encontrado na literatura para roedores (Nielsen et al, 1993,1995; Maeda et al 2008; Kortenoeven e Fenton, 2014). Assim como observado em estudo preliminar de tolerância à privação de água (Castellar et al, 2015), *E. russatus* foi capaz de modular a expressão e distribuição das AQP-1, proteínas integrais de membrana que funcionam como canais moleculares de água (Knepper et al, 1996) facilitando o transporte através da membrana celular numa grande variedade de células (Bozinovic et al, 2003; Maeda et al, 2008), enquanto *A. montensis* apresentou o mesmo padrão de reação durante os dois regimes.

A AQP-1 atua como o principal canal de reabsorção de água nos túbulos proximais em mamíferos (Maeda et al, 2008; Kortenoeven e Fenton, 2014), e seu papel neste mecanismo foi confirmado em estudos com camundongos transgênicos que não possuíam o gene para expressão da AQP-1 (Ma et al, 1998; Verkman, 2000; Zhao et al, 2006). Estes animais transgênicos foram incapazes de concentrar a urina, exibindo baixos valores de osmolalidade (580-610 mOsm) mesmo quando privados de água (Ma et al, 1998). A privação de água parece ativar a modulação da expressão e localização das AQP-1 em *E. russatus*, podendo melhorar a eficiência da reabsorção de água nos rins, mitigando em partes a baixa capacidade de concentração de urina decorrente de sua morfologia renal.

A diferença entre na relação  $I_{H_2O}:VU$  entre as espécies de interesse, sob o regime ad libitum, é evidência de que *A. montensis* sofre maior efeito da perda evaporativa de água comparada a *E. russatus*. De fato, quando privado de água, a PAE de *A. montensis* responde por cerca de 89% do fluxo total de água no animal, enquanto que para *E. russatus* esse valor foi de 56%. Nossos dados mostram que *A. montensis* exibiu perda de água evaporativa significativamente maior que *E. russatus* nos dois regimes, provavelmente devido ao fato de que animais de menor tamanho corporal tendem a perder mais água evaporativamente (Khokhlova et al. 1997). A maior PAE de *A. montensis* impõe maior desafio ao seu balanço hídrico,

tornando ainda mais importante a maior capacidade de regulação do balanço hídrico, resultado da capacidade de concentração de urina.

O maior fluxo total de água (FTA) observado em *A. montensis*, em comparação à *E. russatus* reflete a somatória das várias diferenças observadas nos caracteres fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico entre as espécies. As maiores perdas de água evaporativa em *A. montensis* refletem na necessidade de uma maior ingestão de água e na maior necessidade de produzir uma urina mais concentrada. Somado a isso, a maior necessidade de ingestão de alimento, possivelmente associado à manutenção de uma maior taxa metabólica basal específica (por grama de massa corporal) esperada em animais de menor massa (Khokhlova et al. 1997), gera um maior gasto de água com eliminação de excretas, resultando em maior fluxo total de água.

## **Conclusões**

A redução na ingestão alimentar contribui para a regulação dos fluidos corporais nas duas espécies, mas parece ter maior significância para *A. montensis*. Em contrapartida a redução da perda de água nas fezes atua nas duas espécies, e não parece ter papel significativo nas diferenças na tolerância à privação de água entre as espécies.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as espécies quanto aos valores de EMR e AMR, *A. montensis* apresenta índices renais ligeiramente maiores que *E. russatus*, e essa diferença poderia representar por si só maior capacidade de concentração de urina. De fato, nossos dados mostram que *A. montensis* produziu urina com maiores valores de osmolalidade quando privados de água, atingindo valores muito próximos à máxima concentração de urina ( $U_{max}$ ) predita pelos índices morfológicos EMR e AMR. Esta diferença na capacidade de concentrar urina pode ser fator determinante na resposta à privação de água de curta duração no ambiente, e neste contexto, *A. montensis* parece apresentar melhor eficiência na regulação do balanço hídrico.

Como forma de compensar a menor capacidade decorrente de sua morfologia renal, *E. russatus* parece demonstrar certo grau de flexibilidade da capacidade de concentração de urina a nível celular, pela modulação da distribuição dos canais de

água AQP-1 nos túbulos proximais do néfron, enquanto *A. montensis* apresentou o mesmo padrão de reação durante os dois regimes.

*A. montensis* sofre maior efeito da perda evaporativa de água, o que impõe maior desafio ao seu balanço hídrico e o maior FTA observado em *A. montensis* reflete a somatória das várias diferenças observadas nos caracteres fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico entre as espécies.

Os resultados apresentados neste capítulo fornecem um quadro amplo sobre o balanço hídrico das espécies, e corroboram o proposto em estudo anterior (Castellar et al, 2015; Capítulo 1), deixando evidente que a espécie *A. montensis* apresenta maior plasticidade dos caracteres associados à manutenção do balanço hídrico, em relação a *E. russatus*, e que as diferenças intrínsecas entre as duas espécies respondem pelas diferentes tolerâncias à privação de água. A maior tolerância à privação de água de *A. montensis* se apresenta como característica fundamental para a espécie quando submetida a alterações ambientais repentinas e mudanças abióticas comumente observadas em habitats altamente modificados, e que afetam diretamente o balanço hídrico, podendo atuar como fator determinante da maior tolerância desta espécie à fragmentação.

## **Agradecimentos**

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do Projeto Temático “Effects of global climate change on the Brazilian fauna: a conservation physiology approach” (FAPESP 2008/57687-0), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 158975/2011-1).

## Referências Bibliográficas

- Al-kahtani MA, Zuleta C, Caviedes-Vidal E, e Garland T. 2004. Kidney mass and relative medullary thickness of rodents in relation to habitat, body size, and phylogeny. **Physiol Biochem Zool**, 77(3), 346-365.
- Beuchat CA. 1990. Body size, medullary thickness, and urine concentrating ability in mammals. **Am J Physiol-Reg I** 258:R298–R308.
- Beuchat CA. 1996. Structure and concentrating ability of the mammalian kidney: correlations with habitat. **Am J Physiol-Reg I** 271: R157–R179.
- Bozinovic F, Gallardo PA, Visser RH, Cortés A. 2003. Seasonal acclimatization in water flux rate, urine osmolality and kidney water channels in free-living degus: molecular mechanisms, physiological processes and ecological implications. **J Exp Biol** 206:2959–2966.
- Brownfield MS e Wunder BA. 1976. Relative medullary area: A new structural index for estimating urinary concentrating capacity of mammals. **Comp Biochem Physiol**, 55A:69-75.
- Canale CI, Henry PY. 2010. Adaptive phenotypic plasticity and resilience of vertebrates to increasing climatic unpredictability. **Clim Res** 43:135–147.
- Carey C. 2005. How physiological methods e concepts can be useful in conservation biology. **Integr Comp Biol** 45: 4–11.
- Casotti G, Herrera LG, Flores JJ, Mancina CA, Braun EJ. 2006. Relationships between renal morphology and diet in 26 species of new world bats (suborder microchiroptera). **Zoology** 109(3):196-207.
- Castellar A, Bertoli PC, Galdino LH, Domeniconi RF, da Cruz-Neto AP. 2015. Differences in physiological traits associated with water balance among rodents, and their relationship to tolerance of habitat fragmentation. **J Exp Zool**, DOI: 10.1002/jez.1966, *In press*.
- Chappell MA. 1980. Thermal energetics and thermoregulatory costs of small Arctic mammals. **J Mammal** 61:278–291.
- Chown SL, Gaston KJ. 2008. Macrophysiology for a changing world. **Proceedings of the Roy Soc B-Biol Sci**, 275(1642), 1469-1478.
- Coleman JC and Downs CT. 2009. Variation in urine concentrating ability and water balance of the Black-tailed Tree Rat *Thallomys nigricauda*, along an aridity gradient. **Comp Biochem Physiol A Physiol** 154:508–513.
- Cooke SJ, Sack L, Franklin CE, Farrell AP, Beardall J, Wikelski M, Chown SL. 2013. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. **Conserv Physiol** 1:1-23.
- Cooper CE and Withers PC. 2006. Numbats and aardwolves—how low is low? A reaffirmation of the need for statistical rigour in evaluating regression predictions. **J Comp Physiol B** 176:623–629.
- Cortés A, Zuleta C e Rosenmann M. 1988. Comparative water economy of sympatric rodents in a Chilean semi-arid habitat. **Comp Biochem Physiol** A91:711-714.
- Cottontail VM, Wellinghausen N, Kalko EKV. 2009. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panama. **Parasitology**, 136:1133–1145.

- Diaz GB, Ojeda RA, Rezende EL. 2006. Renal morphology, phylogenetic history and desert adaptations of South American hystricognath rodents. **Funct Ecol** 20:609-620.
- Fahrig L. 2003. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. **Annu Rev Ecol Evol S**, 34:487–515.
- Favaroni-Mendes LA, Rocha PLB, Ribeiro MFS, Perry SF, Oliveira ES. 2004. Differences in ingestive balance of two populations of neotropical *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Comp Biochem Physiol A Physiol** 138:327-332.
- Gallardo P, Olea N, Sepúlveda F. 2002. Distribution of aquaporins in the colon of Octodon degus, a South American desert rodent. **Am J Physiol** 283, R779– R788.
- Gallardo P, Cortés A, Bozinovic F. 2005. Phenotypic flexibility at the molecular and organismal level allows desert-dwelling rodents to cope with seasonal water availability. **Physiol Biochem Zool** 78, 145–152.
- Gutman T, Byeth Y. 1970. Discrepancy between concentrating ability and kidney structure. **Life Sci** 9:37-42.
- Hayes JP and Shonkwiler JS. 2006. Allometry, antilog transformations, and the perils of prediction on the original scale. **Physiol Biochem Zool** 79:665–674.
- Homyack JA. 2010. Evaluating habitat quality of vertebrates using conservation physiology tools. **Wildlife Res** 37:332-342.
- Jones, MEE, Bradshaw SD, Fergusson B, Watts R. 1990. Effect of available surface water on levels of anti-diuretic hormone (lysine vasopressin) and water and electrolyte metabolism of the Rottneest Island quokka (*Setonix brachyurus*). **Gen Comp Endocrinol**, 77:75–87.
- Karasov WH e Martínez del Rio C. 2009. Physiological Ecology: How animals process energy, nutrients, and toxins. **Princeton University Press**.
- Khokhlova IS, Kam M, Degen AA. 1997. A small gerbil that maximizes intake of energy from low-energy food. **J Mammal** 78: 158–162.
- Knepper MA, Wade JB, Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Mandon B, Chou CL, Kishore BK, Nielson S. 1996. Renal aquaporins. **Kidney Int** 49:1712-1717.
- Kortenoeven MLA and Fenton RA. 2014. Renal aquaporins and water balance disorders. **Biochim Biophys Acta** 1840:1533–1549.
- Kutscher CL. 1966. Effect of hypertonic saline injections and water deprivation on drinking, serum osmolality and gut water. **Physiol Behav** 1:259–268.
- Lepkovsky S, Lyman R, Fleming D, Nagumo M, Demick MM. 1957. Gastrointestinal regulation of water and its effect on food intake and rate of digestion. **Am J Physiol** 188:327–331.
- Lighton JRB. 2008. Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists. Oxford University Press.
- Lindenmayer DB, Fischer J. 2007. Tackling the habitat fragmentation pantheon. **Trends Ecol Evol**, v.22(3), 127-132.
- Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. 1998. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. **J Biol Chem** 273:4296–4299.

- Maeda S, Kuwahara S, Ito H, Tanaka K, Hayakawa T e Seki M. 2008. Expression and Localization of Aquaporins in the Kidney of the Musk Shrew (*Suncus murinus*). **J Histochem Cytochem**, 56(1): 67-75.
- McNab BK. 2002. **The physiological ecology of vertebrates: a view from energetics**. Ithaca N.Y.: Cornell University Press.
- Metzger JP, Alves LF, Goulart W, Teixeira AMG, Simões SJC, Catharino ELM. 2006. Uma área de relevante interesse biológico, porém pouco conhecida: a Reserva Florestal do Morro Grande. **Biota Neotrop** 6(2).
- Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. 1993. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:11663–11667.
- Nielsen S, Pallone T, Smith BL, Christensen EI, Agre P, Maunsbach AB. 1995. Aquaporin-1 water channels in short and long loop descending thin limbs and in descending vasa recta in rat kidney. **Am J Physiol** 268:F1023–1037.
- Pardini R. 2004. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. **Biodivers Conserv** 13:2567-2586.
- Pardini R, Souza SM, Braga-Neto R, Metzger JP. 2005. The role of Forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic Forest landscape. **Biol Conserv** 124:253-266.
- Pardini R, Umetsu F. 2006. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande – distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. **Biota Neotrop** 6(2).
- Pardini R, Bueno AA, Gardner TA, Prado PI, Metzger JP, Fenton B. 2010. Beyond the Fragmentation Threshold Hypothesis: Regime Shifts in Biodiversity Across Fragmented Landscapes. **Plos One** 5(10):e13666.
- Pereira BF, Alves RMS, Alves AL, Senhorini JA, Rocha RCGA, Scalize PH, Pitol DL, Caetano FH. 2014. Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). **Microscopy Research** 2:39-49.
- Püttker T, Meyer-Lucht Y, Sommer S. 2008a. Fragmentation effects on population density of three rodent species in secondary Atlantic Rainforest, Brazil. **Stud Neotrop Fauna E** 43(1):11-18.
- Püttker T, Pardini R, Meyer-Lucht Y, Sommer S. 2008b. Responses of five small mammal species to micro-scale variations in vegetation structure in secondary Atlantic Forest remnants, Brazil. **BMC Ecol** 8(9):1-10.
- Ribeiro MFS, Rocha PLB, Mendes LAF, Perry SF, Oliveira ES. 2004. Physiological effects of short term water deprivation in the South American sigmodontine Rice rat *Oligoryzomys nigripes* and water rat *Nectomys squamipes* within a phylogenetic context. **Can J Zoolog** 82(8):1326-1335.
- Schmidt-Nielsen B, O'Dell R. 1961. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney. **Am J Physiol** 200:1119-1124.
- Schmidt-Nielsen B, O'Dell R, Osaki H. 1961. Interdependence of urea and electrolytes in production of a concentrated urine. **Am J Physiol** 200:1125-1132.

- Schmidt-Nielsen, K., 2002. **Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente**. 5.<sup>a</sup> Edição. Editora Santos.
- Schoorlemmer GHM and Evered MD. 1993. Water and solute balance in rats during 10h water deprivation and rehydration. **Can J Physiol Pharmacol** 71:379–386.
- Schoorlemmer GHM and Evered MD. 2002. Reduced feeding during water deprivation depends on hydration of the gut. **Am J Physiol-Reg I** 283: R1061-R1069.
- Seebacher F. and Franklin CE. 2012. Determining environmental causes of biological effects: the need for a mechanistic physiological dimension in conservation biology. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 367(1596):1607-1614.
- Somero GN. 2010. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. **J Exp Biol** 213: 912–920.
- Speakman JR. 1997. Doubly Labelled Water: Theory and Practice. **Chapman & Hall**, London.
- Sperber I. 1944. Studies on the mammalian kidney. **Zool Bidr Uppsala** 22:249-257.
- Tabarelli M, Cardoso da Silva JM, Gascon C. 2004. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of Neotropical forests. **Biodivers Conserv** 13:1419–1425.
- Umetsu F and Pardini R. 2007. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats: evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. **Landscape Ecol** 22:517–530.
- Umetsu F, Metzger JP, Pardini R. 2008. The importance of estimating matrix quality for modeling species distribution in complex tropical landscape: a test with Atlantic forest small mammals. **Ecography** 31:359–370.
- Verkman AS. 2000. Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 9:517-522.
- Viveiros de Castro EBV, Fernandez FAS. 2004. Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic Forest fragments in Brazil. **Biol Conserv** 119:73-80.
- Voigt CC, Cruz-Neto A. 2009. Energetic analysis. In: Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats (eds. T.H. Kunz, S. Parsons). **The Johns Hopkins University Press**, Baltimore, 623-645.
- Wikelski M e Cooke SJ. 2006. Conservation physiology. **Trends Ecol Evol** 21:38–46.
- Williams-Linera G, Domínguez-Gastelú V, García-Zurita ME. 1998. Microenvironment and Floristics of Different Edges in a Fragmented Tropical Rainforest. **Conserv Biol** 12(5):1091–1102.
- Zhao D, Bankir L, Qian L, Yang D, Yang B. 2006. Urea and urine concentrating ability in mice lacking AQP1 and AQP3. **Am J Physiol Renal Physiol** 291:429–438.

### CAPÍTULO 3

#### Efeitos da temperatura sobre os caracteres fisiológicos associados ao balanço hídrico em espécie de roedor tolerante à fragmentação.

---

**Abstract.** *Effects of temperature on the physiological characteristics associated to water balance in fragmentation tolerant rodent species.* The range of physiological means inherent to each species might act as a determining factor for the tolerance or no tolerance to sudden environmental changes. The maintenance of water balance plays the main role on terrestrial animals and animals that inhabit humid environment, short term water deprivation can be relevant. To these animals, the plasticity of physiological traits associated with water balance should be the first mechanism to act when sudden changes on water resources are dealt with. The Morro Grande Forest Reserve (MGFR) is home for a great variety of small mammals, among them *Akodon montensis* and *Euryoryzomys russatus*, species considered to have different tolerance to water deprivation and habitat fragmentation. Variations on environment temperature exert considerable effects on several physiological processes including processes related to water balance maintenance. This study aims to investigate the flexibility of traits associated to water balance of *A. montensis* undergoing a regimen of water deprivation and elevated temperature. There is evident the effects of temperature on the components of water balance, with the greater emphasis on evaporative water loss (EWL) being noticed in the animals maintained at 32,5°C. To offset the higher evaporative water loss due to thermoregulation, *A. montensis* presented a higher water intake. The hydration state directly influenced the EWL regulation, being noticed the reduction of 30% on the EWL in the animals maintained at 32,5°C. Even with their water balance under higher stress, these animals haven't shown the ability to produce urine with higher values than the observed for animals maintained at 25°C, and this limited ability for urine concentration might represent a physiological barrier in case of prolonged water stress.

**Keywords:** *Akodon montensis*. Water balance. Water deprivation. Elevated temperature. Food intake. Evaporative water loss. Urine concentration. Total water flow. Morro Grande.

**Resumo:** A gama de recursos fisiológicos inerentes a cada espécie pode atuar como fator determinante da tolerância ou não as modificações repentinas no ambiente. A manutenção do balanço hídrico desempenha papel central na fisiologia dos animais terrestres e para animais que habitam ambientes húmidos, a privação de água por curtos períodos de tempo pode ser relevante. Para estes animais a plasticidade dos parâmetros fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico deve ser o primeiro mecanismo a atuar quando enfrentam mudanças repentinas na disponibilidade de recursos hídricos. A Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG) abriga grande variedade de pequenos mamíferos, dentre eles *Akodon montensis* e *Euryoryzomys russatus*, consideradas espécies com diferentes tolerâncias à privação de água e à fragmentação do habitat. Variações na temperatura ambiental exercem efeitos consideráveis em vários processos fisiológicos incluindo os processos relacionados à manutenção do balanço hídrico. Este trabalho objetiva investigar a flexibilidade de parâmetros associados ao balanço hídrico de *A. montensis* submetido a um regime de privação de água e a temperatura elevada. Ficam evidentes os efeitos da temperatura sobre os componentes do balanço hídrico, sendo que maior ênfase na perda de água evaporativa (PAE) foi observada nos animais mantidos a 32,5°C. Para contrabalancear a maior perda de água evaporativa devido à termorregulação, *A. montensis* apresentou maior ingestão de água. O estado de hidratação influenciou diretamente a regulação da PAE, sendo observada redução de 30% na PAE em animais mantidos a 32,5°C. Mesmo com seu balanço hídrico sobre maior estresse, estes animais não mostraram capacidade produzir urina com valores maiores do observado para animais mantidos a 25°C, e essa capacidade limitada de concentração de urina pode representar uma barreira fisiológica em caso de estresse hídrico prolongado.

**Palavras-chave:** *Akodon montensis*. Balanço hídrico. Privação de água. Temperatura elevada. Ingestão alimentar. Perda de água evaporativa. Concentração de urina. Fluxo total de água. Morro Grande.

## Introdução

A plasticidade fenotípica pode ser considerada como o potencial de um organismo em produzir uma gama de diferentes fenótipos aptos a uma variedade de ambientes (DeWitte et al, 1998). Quando as condições ambientais sofrem modificações bruscas, numa escala de tempo menor que o tempo de vida, os organismos exibindo modificações contínuas, mas reversíveis, em sua morfologia, fisiologia e comportamento podem incorrer numa vantagem seletiva (Piersma e Drent, 2003; del Valle et al, 2004).

A manutenção do balanço hídrico desempenha papel central na fisiologia dos animais terrestres (Baldo et al, 2015) sendo fundamental para o funcionamento ótimo de um animal (Schmidt-Nielsen, 2002), e por isso sofre uma substancial pressão de seleção (Cooper e Withers, 2014). Para animais que habitam ambientes húmidos, a privação de água por curtos períodos de tempo pode ser relevante (Ribeiro et al, 2004), sendo que a plasticidade dos parâmetros fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico deve ser o primeiro mecanismo a atuar quando estes animais são submetidos à mudança repentina na disponibilidade de recursos hídricos. Esta gama de recursos fisiológicos, inerente a cada espécie, pode atuar como fator determinante da tolerância ou não as alterações repentinas no ambiente, decorrentes, por exemplo, da fragmentação.

Para correta manutenção do balanço hídrico os animais devem manter um influxo de água suficiente para balancear as perdas (Schmidt-Nielsen, 2002). Esta equação do balanço hídrico engloba uma série de processos complexos, cuja completa avaliação só se torna possível por meio de abordagens integrativas, que englobam aspectos fisiológicos, celulares e moleculares. Como mecanismos de influxo de água, podemos considerar a produção de água metabólica, a ingestão de água contida no alimento e a ingestão de água livre (Schmidt-Nielsen, 2002; McNab, 2002; Karasov e Martínez del Rio, 2009). São consideradas como vias principais de perda de água a perda de água evaporativa, e as perdas com a eliminação de fezes e urina (Schmidt-Nielsen, 2002; McNab, 2002; Karasov e Martínez del Rio, 2009).

Análises realizadas com sensores de temperatura (Tidbits, Dallas Instruments, USA) entre os anos de 2011 e 2013 nas áreas de coleta de roedores da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), mostram grandes variações de temperatura ao longo do ano, com mínimas chegando à cerca 1,5°C e máximas atingindo 37,6°C.

Estes valores de temperatura estão abaixo e acima do limite da zona de neutralidade térmica para a maioria dos roedores tropicais (McNab, 2002). As variações de temperatura ambientais exercem efeitos consideráveis em vários processos fisiológicos (Schmidt-Nielsen, 2002), incluindo os processos relacionados à manutenção do balanço hídrico. Os fatores ambientais que influenciam a carga de calor imposta a um animal incluem a incidência direta e indireta de radiação solar, a radiação térmica, a temperatura do ar, a velocidade do vento e o déficit da pressão de vapor (Porter e Gates, 1969). Alguns destes são comumente reportados como sendo variáveis alteradas em decorrência das variações microclimáticas comuns em ambientes altamente modificados (Cadenasso et al, 1997; Didham e Lawton, 1999; Williams-Linera et al, 1998), como habitats fragmentados.

A RFMG abriga grande variedade de pequenos mamíferos não voadores, incluindo *Akodon montensis* e *Euryoryzomys russatus* (Pardini e Umetso, 2006). Os capítulos anteriores evidenciaram que *A. montensis* e *E. russatus* apresentam diferentes tolerâncias à privação de água, e que essa tolerância diferenciada pode ser decorrente, dentre outros fatores, das diferentes plasticidades dos caracteres fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico, intrínsecas a cada espécie. A maior plasticidade exibida por *A. montensis* permite que esta espécie seja mais resiliente à privação de água, reduzindo os efeitos das alterações microclimáticas comuns em áreas fragmentadas que representam um fator agravante para a manutenção do balanço hídrico (Chappel, 1980), como a redução da umidade relativa do ar e a diminuição das fontes de água disponíveis para esses pequenos roedores (Williams-Linera et al, 1998).

Neste contexto, este trabalho tem por objetivo principal investigar a flexibilidade dos parâmetros fisiológicos relacionados à manutenção do balanço hídrico de *A. montensis*, espécie de roedor considerada não endêmica, comum inclusive em áreas abertas como o Cerrado (Olifiers et al, 2005), quando submetido a um regime de privação de água e a temperatura com valor próximo à temperatura máxima observada nas áreas de coleta da RFMG. Os dados obtidos são comparados com os valores obtidos e discutidos nos capítulos anteriores, sobre as respostas fisiológicas desta espécie frente à privação de água, quando aclimatados à temperatura de 25°C.

## Métodos

### *Área de Estudo*

O estudo foi realizado com animais provenientes da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG, 10.870 ha), localizada a sudoeste da cidade de São Paulo entre os municípios de Cotia e Ibiúna, e os limites da Serra de Paranapiacaba (23°35'S, 23°50' S; 46°45' W, 47°15' W; 860-1075 m de altitude). Informações detalhadas sobre clima, geologia, geomorfologia, pedologia, hidrografia e uso e cobertura do território encontram-se disponíveis em Metzger et al (2006).

### *Protocolo experimental*

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA-UNESP/Rio Claro - Protocolo 3062). Ao todo 10 animais da espécie *Akodon montensis* foram capturados (com autorização do ICMBio Sisbio - Processo: 33096-4) com armadilhas Sherman® e armadilhas de interceptação e queda em plotes previamente estabelecidos na área de estudo. Para se evitar efeitos do sexo e estado reprodutivo, foram utilizados somente machos adultos e não reprodutivos. Após a captura os animais foram transportados para as dependências do Departamento de Zoologia da UNESP (Rio Claro/SP) e acondicionados em gaiolas metabólicas individuais que permitiram a separação e a coleta das fezes e da urina produzida, além da quantificação da ingestão de alimento e de água. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada (Fitotrom – Eletrolab, Brasil) inicialmente ajustada para 25°C, com Umidade Relativa (UR) em torno de 70 a 80% e fotoperíodo de 12:12hs. Posteriormente os animais foram aclimatados durante 7-10 dias a 32,5°C, com água e alimento (ração Nuvilab CR-1 para camundongos e ratos, Nuvital Nutrientes Ltda., Brasil) fornecidos ad libitum.

Após este período de aclimação, os animais foram divididos em dois grupos (n=5) e submetidos a protocolo experimental modificado a partir de Ribeiro e colaboradores (2004), no qual um grupo foi submetido a um período de cinco dias alimentados com ração e água *ad libitum* (regime *Ad libitum* – AL), enquanto outro grupo foi submetido a um período de 48h no qual toda a fonte de água exógena foi retirada (regime Privação de Água – PA).

Durante os dois regimes (AL e PA) o peso corporal ( $M_c$ ), a ingestão de alimento (IA), a ingestão de água (água livre + água contida no alimento –  $I_{H_2O}$ ), a produção de fezes (PF) e o volume de urina (VU) foram medidas em bases diárias. A relação  $I_{H_2O}:VU$  foi calculada a partir dos dados de  $I_{H_2O}$  e VU. A osmolalidade da urina (U) foi determinada através de osmômetro (ML KnauerSemi-MicroOsmometer, Alemanha) para amostras maiores que 50 $\mu$ L. Osmolalidade das amostras menores que 50 $\mu$ L não puderam ser determinadas. Os valores de U obtidos durante o regime PA foram comparados com os valores de osmolalidade máxima ( $U_{max}$ ) preditos pelos índices morfológicos renais.

#### *Perda de água evaporativa*

Os valores de variação na umidade relativa (UR) medidos durante a respirometria de fluxo aberto, realizada na mesma temperatura de aclimação, foram utilizados para calcular a perda de água evaporativa total. Para isso, os animais foram acondicionados em respirômetros customizados (volume interno de 400 ml), os quais foram colocados em estufa BOD com controle de temperatura. Ar comprimido, após a eliminação de  $CO_2$  e vapor de água, foi enviado ao respirômetro com volume controlado por um fluxímetro de massa multicanal (MF-8 Mass Flow Meter, Sable System, Las Vegas, NY, USA). O ar foi então empurrado dos respirômetros para um sensor de umidade relativa (Sable Systems RH-100; resolução 0,001% UR, acurácia 1% do valor registrado). Os valores de umidade relativa foram registrados por pelo menos 90 minutos em intervalos de 1 minuto através do programa Expedata<sup>®</sup> (Sable System, Las Vegas, NY, USA). O conteúdo de água evaporativa foi calculado como a diferença entre a pressão de vapor de água (PVA, kPa, medido pelo RH-100) do ar ambiente (baseline) e o valor produzido pelo animal.

O valor de PVA (medido em kPa) obtido foi então convertido em densidade de vapor de água (DVA) através da equação:  $DVA = PVA / (T \times R_w)$  - segundo Lighton (2008); Eq. 10.10 - onde o T é a temperatura (em °K) e  $R_w$  é a constante dos gases para o vapor de água (461,5 J.Kg<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>). A taxa de perda de água evaporativa foi então calculada como:  $PAE = DVA \times FR$  - segundo Lighton (2008) - onde FR é o fluxo do ar enviado ao respirômetro (ml/min).

### *Fluxo total de água*

O fluxo total de água (FTA) foi avaliado apenas no último dia de cada regime através da técnica de água duplamente marcada (Doubly Labeled Water - DLW), que envolve a marcação isotópica dos fluídos corporais dos animais. Os animais foram pesados ( $\pm 0,01$  g) e levemente anestesiados, de modo a permitir a injeção segura de água duplamente marcada ( $35\%O_{18}$  e  $65\%^2H$ ) na cavidade intraperitoneal, e evitando a perda de massa injetável. Para determinar a massa do injetado com precisão, a seringa foi pesada imediatamente antes e depois da injeção ( $\pm 0,0001$  g).

Os animais foram então devolvidos às gaiolas por 60min para permitir o equilíbrio dos isótopos com a água do corpo. Uma amostra de 100 $\mu$ l de sangue foi então coletada do sino infraorbital utilizando vidros capilares, que foram imediatamente selados a fogo (Voigt e Cruz-Neto, 2009). As amostras de sangue foram enviadas ao Doubly-labelled water Resource Centre (DLWRC, Universidade de Aberdeen - UK), onde foram analisados. O fluxo total de água (FTA) foi calculado segundo a equação:  $FTA=1,017 \times N \times K_d$  - Speakman, (1997) – onde N é o valor de água corporal (mol) e  $K_d$  é o valor de lavagem do isótopo ( $^2H$ ).

### *Morfologia Renal*

Os rins foram medidos em sua largura, comprimento e espessura, com um paquímetro digital (Mitutoyo – precisão 0,01mm), e o volume do rim (VR – em mm<sup>3</sup>) foi calculado como o produto destas variáveis. Um corte sagital foi realizado no rim direito (se um corte completo não pode ser feito, o rim esquerdo foi utilizado) e, utilizando um scanner, as imagens foram digitalizadas. As medidas de espessura do córtex, espessura das camadas medulares (interna e externa), área da medula (AM) e área do córtex (AC) foram realizadas com o auxílio do software livre ImageJ. A espessura medular (EM) foi calculada como a soma dos valores de espessura das camadas interna e externa da medula, e os valores de espessura medular relativa ( $EMR=10 \times [EM] / [VR]^{1/3}$ ) e área medular relativa ( $AMR= AM/AC$ ) foram então calculados (Sperber, 1944; Bronwfield e Wunder, 1976; Al-Kahtani et al, 2004).

Os valores de EMR e AMR (transformados em  $\text{Log}_{10}$ ) foram comparados com outros roedores através de relações alométricas tradicionais. A equação alométrica utilizada para a avaliação da EMR foi:  $\log_{10}\text{EMR} = 0,704 - 0,139 \times \log_{10}\text{M}_c$  (118 espécies, Castellar et al, 2015). Para AMR, uma equação alométrica foi calculada a partir de dados disponíveis na literatura para 18 espécies de roedores. Os valores de EMR e AMR foram utilizados para estimar a concentração máxima da urina ( $U_{\text{max}} = 542 \times \text{EMR} + 154$  - Beuchat, 1996;  $U_{\text{max}} = 873 + 2106 \times \text{AMR}$  - Bronwfield e Wunder, 1976) para as espécies de interesse, valores que foram comparados com os dados obtidos durante o regime PA.

### *Imunoistoquímica*

Após a fixação histológica, as amostras de tecidos foram lavadas por 24 horas em água corrente e submetidas à rotina para inclusão em Paraplast. Seguindo à inclusão, foi realizada a microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4-5  $\mu\text{m}$  de espessura, em lâminas silanizadas (DAKO, Carpinteria, California). Os cortes foram desparafinizados e submetidos à rotina de reação imunohistoquímica utilizando-se anticorpos policlonais anti-aquaporina (anti-AQP1; Chemicon Temecula, CA, USA), diluída 1:400 em albumina do soro bovino (BSA) incubados "overnight". Após lavagem em tampão fostato-salino (PBS), ocorreu a incubação em anticorpo secundário biotilado (coelho-anti IgG de cabra; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 1 hora a 37°C, seguida de outra lavagem para revelação com cromógeno (DAB; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). As lâminas histológicas, submetidas às reações de imunohistoquímica, foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica DM 2000 acoplado a uma câmera Olympus BX51 para verificar possível reação positiva dos cortes teciduais aos anticorpos empregados na imunohistoquímica. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software livre ImageJ e a quantificação da imunoreatividade (segundo Pereira et al, 2014) foi realizada e expressa como porcentagem de reação para o córtex (%RC) e para medula renal (%RM).

### Análise estatística

Os dados foram previamente testados para normalidade (Shapiro-Wilk). Foram utilizados os teste t-Student (2 amostras) e o teste-U de Mann-Whitney para comparar os valores das variáveis IA, IH<sub>2</sub>O, VU, PF e U, normalizadas para o peso, para os regimes *ad libitum* (AL) e restrição de água (PA), e também para a comparação com os dados provenientes dos animais aclimatados à temperatura de 25°C (Capítulo 2). A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação entre a ingestão de alimentos (IA) e a produção de fezes (PF). Diferenças entre a porcentagem de reação para córtex (%RC; transformado para raiz quadrada do arco-seno) e medula (%RM; transformado para raiz quadrada do arco-seno) entre as espécies e tratamentos foram avaliados com ANOVA.

Os dados de PAE e FTA foram comparados com os valores obtidos para os animais aclimatados à temperatura de 25°C, provenientes do Capítulo 2. As diferenças entre os grupos AL e PA foram verificadas também através do teste t-Student (2 amostras) e do teste-U de Mann-Whitney.

Resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão e  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o software statistiXL (versão 1.8; StatistiXL), SigmaPlot (versão 11; Systat Software) e STATISTICA® (versão 5.1 para Windows).

## Resultados

Para *A. montensis* submetido ao regime AL (água *ad libitum*) aclimatados à temperatura de 32,5°C, o valor de massa corporal ( $M_c$ ) foi de  $29,4 \pm 1,7$ g, IA foi de  $238,1 \pm 68,7$  mg.h<sup>-1</sup>, IH<sub>2</sub>O foi  $757,6 \pm 148,7$   $\mu$ L.h<sup>-1</sup>, VU foi  $102,1 \pm 40,5$   $\mu$ L.h<sup>-1</sup>, PF foi  $46,8 \pm 13,3$  mg.h<sup>-1</sup> e a ED foi  $82,0 \pm 2,0$ %. A perda de água nas fezes foi em média de 31,5% do peso das fezes. A produção de fezes (PF) está significativamente correlacionada com a ingestão de alimentos ( $P < 0,05$ ). Os valores normalizados pela massa são apresentados nas Tabelas 1 e 2, juntamente com os valores obtidos em experimento anterior para os animais aclimatados a 25°C (Capítulo 2). A comparação entre os dados obtidos nos dois regimes mostra aumento significativo da osmolalidade da urina (U), passando de  $1385 \pm 139$  mosmol.kg<sup>-1</sup> no regime AL para  $1953 \pm 223$  mosmol.kg<sup>-1</sup> no regime PA. Também foram encontradas diferenças

significativas em IA, VU e PF, sendo que os valores atingidos no regime AL foram  $55,6 \pm 73,4 \text{mg.h}^{-1}$ ,  $20,8 \pm 4,9 \mu\text{L.h}^{-1}$  e  $6,5 \pm 3,2 \text{mg.h}^{-1}$  respectivamente. A perda de água nas fezes foi em média de 19,8% do peso das fezes.

**Tabela 1.** Ingestão de alimento (IA) e produção de fezes (PF) de *A. montensis* aclimatados a duas temperaturas, com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

Temperatura de aclimação	IA ( $\text{mg.h}^{-1}(100\text{g})^{-1}$ )		PF ( $\text{mg.h}^{-1}(100\text{g})^{-1}$ )	
	AL	PA	AL	PA
25°C*	765,4±138,7 <sup>a</sup>	248,2±126,5	209,9±44,2 <sup>a</sup>	50,5±33,1
32,5°C	880,0±254,7 <sup>a</sup>	172,8±228,5	159,1±49,3 <sup>a</sup>	29,2±23,9

Nota:\* Os dados referentes à temperatura de aclimação de 25°C foram apresentados e analisados no Capítulo 2, e são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as temperaturas de aclimação. <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma temperatura; <sup>b</sup> indica diferença significativa entre as temperaturas, para o mesmo regime; (P<0,05). Resultados são apresentados em média±DP.

**Tabela 2.** Ingestão de água (IH<sub>2</sub>O), osmolalidade da urina (U), volume de urina (VU) e relação IH<sub>2</sub>O:VU de *A. montensis* aclimatados a duas temperaturas, com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

Temperatura de aclimação	IH <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L.h}^{-1}.100\text{g}^{-1}$ )		U (mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )		VU ( $\mu\text{L.h}^{-1}.100\text{g}^{-1}$ )		IH <sub>2</sub> O:VU	
	AL	PA	AL	PA	AL	PA	AL	PA
25°C	1809±597 <sup>b</sup>	-	1465±437 <sup>a</sup>	1965±219	222±88 <sup>a,b</sup>	57±37 <sup>b</sup>	6,72	-
32,5°C	4345±835 <sup>b</sup>	-	1385±139 <sup>a</sup>	1953±80	408±148 <sup>a,b</sup>	71±26 <sup>b</sup>	10,64	-

Nota: \* Os dados referentes à temperatura de aclimação de 25°C foram apresentados e analisados no Capítulo 2, e são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as temperaturas de aclimação. <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma temperatura; <sup>b</sup> indica diferença significativa entre as temperaturas, para o mesmo regime; (P<0,05). Resultados são apresentados em média±DP.

Os valores de PAE e FTA para os dois regimes (AL e PA) são apresentados na Tabela 3, juntamente com os valores obtidos para os animais aclimatados a 25°C. Na comparação entre os dados obtidos nos regimes AL e PA, aclimatados a 32,5°C, a PAE e o FTA foram significativamente menores que o valor observado para o regime AL ( $F_{3,5}=1,667$ ,  $P<0,05$  e  $F_{3,5}=1,215$ ,  $P<0,001$  respectivamente).

**Tabela 3.** Perda de água evaporativa (PAE), fluxo total de água (FTA) e relação PAE/FTA (%) de *A. montensis* aclimatados a duas temperaturas (T), com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

T (°C)	PAE ( $\text{mLH}_2\text{O.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )		FTA ( $\text{mLH}_2\text{O.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$ )		PAE/FTA (%)	
	AL	PA	AL	PA	AL	PA
25°C*	0,043 ± 0,006 <sup>b</sup>	0,052 ± 0,009 <sup>b</sup>	0,384 ± 0,062 <sup>a,b</sup>	0,058 ± 0,008	12,9	89,3
32,5°C	0,098 ± 0,027 <sup>a,b</sup>	0,079 ± 0,006 <sup>b</sup>	0,451 ± 0,056 <sup>a,b</sup>	0,088 ± 0,045	22,1	89,6

Nota: \* Os dados referentes à temperatura de aclimação de 25°C foram apresentados e analisados no Capítulo 2, e são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as temperaturas de aclimação. <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma temperatura; <sup>b</sup> indica diferença significativa entre as temperaturas, para o mesmo regime; (P<0,05). Resultados são apresentados em média±DP.

Quando comparados os resultados para o regime AL, entre as temperaturas de aclimação (Figura 1), não foram observadas diferenças para IA, PF e U. Os animais aclimatados à temperatura de 32,5°C apresentaram valores de IH<sub>2</sub>O, VU, PAE e FTA significativamente maiores do que o observado para animais aclimatados a 25°C. Na comparação dos resultados obtidos para o regime PA (Figura 1), entre as temperaturas de aclimação, foram observadas diferenças significativas apenas para PAE, VU e FTA.

**Tabela 4.** Valores de espessura medular relativa (EMR) e área medular relativa (AMR) para *A. montensis* aclimatados a duas temperaturas (T), com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

T (°C)	EMR		AMR	
	AL	PA	AL	PA
25°C*	4,54±0,50	4,51±0,68	0,519±0,090	0,537±0,237
32,5°C	4,55±0,69	4,36±0,53	0,507±0,102	0,516±0,098

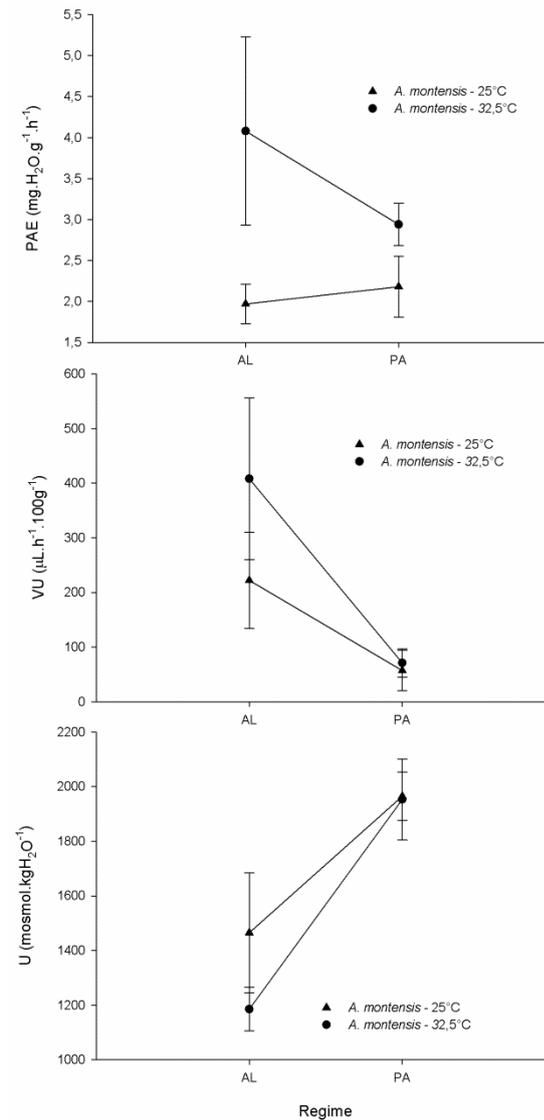
\* Os dados referentes à temperatura de aclimação de 25°C foram apresentados e analisados no Capítulo 2, e são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as temperaturas de aclimação.

Os valores de EMR e AMR são apresentados na Tabela 4. Nenhuma diferença significativa foi observada nos valores de EMR e AMR entre os tratamentos para *A. montensis* aclimatados a 32,5°C ( $P>0,1$ ). Também não houve diferenças quando os valores foram comparados aos observados nos animais aclimatados a 25°C ( $P>0,1$ ). A comparação entre os valores de U para *A. montensis*, aclimatados a 32,5°C, com o predito pela sua morfologia renal (EMR e AMR) é apresentada na Tabela 5, juntamente com os valores preditos para *A. montensis* aclimatados 25°C.

**Tabela 5.** Comparação entre os valores de osmolalidade (U) obtidos e os preditos através dos índices de morfologia renal (EMR - segundo Beuchat, 1996; AMR – segundo Bronwfield e Wunder, 1976) de *A. montensis* aclimatados a duas temperaturas.

Temperatura de aclimação	U (mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )	U <sub>max</sub> (mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )	U <sub>max</sub> (mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )
	regime PA	Predito por EMR	predito por AMR
25°C*	1965 ± 219	2519 (-22,0%)	2004 (- 1,9 %)
32,5°C	1953 ± 223	2161 (-9,6%)	1960 (-0,4%)

Nota: \* Os dados referentes à temperatura de aclimação de 25°C foram apresentados e analisados no Capítulo 2, e são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as temperaturas de aclimação. A diferença entre o valor obtido e o predito é apresentada como % entre parênteses.



**Figura 1.** Comparação das variáveis perda de água evaporativa (PAE), osmolaridade da urina (U) e volume de urina (VU) para a espécie *A. montensis* nos regimes de privação de água (PA) e ad libitum (AL), em duas temperaturas de aclimação.

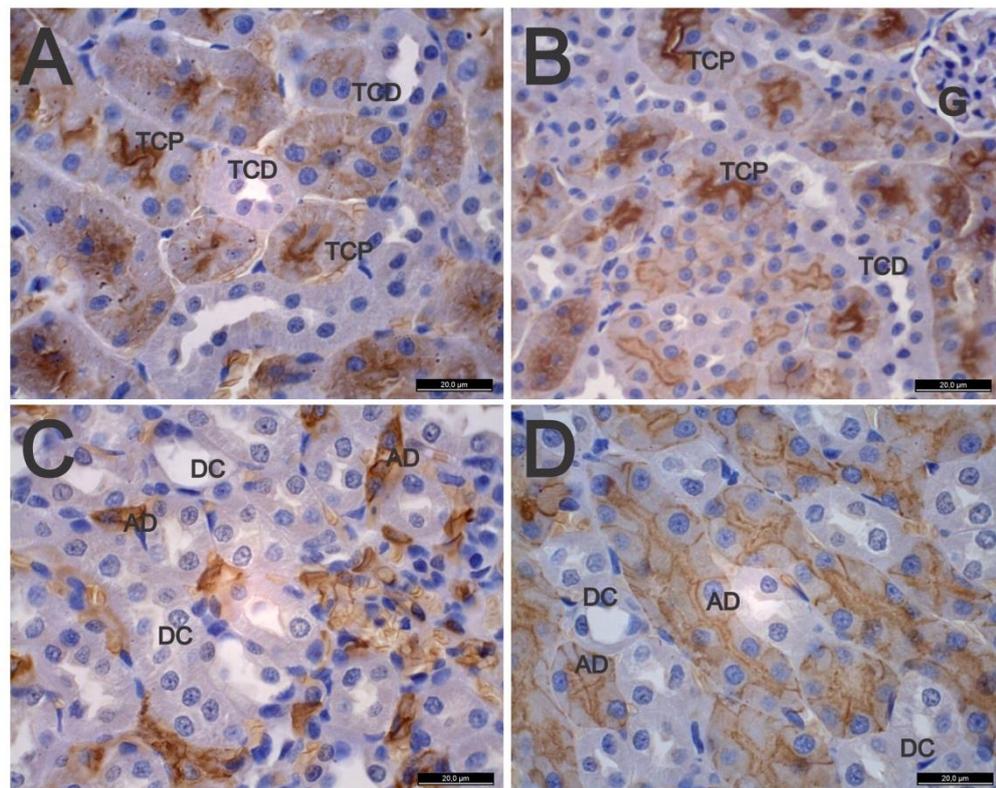
Para os animais aclimatados a 32,5°C a imunorreação para AQP-1 foi positiva apenas nos túbulos proximais (TCP, Figura 2) e nas porções descendentes (AD, Figura 2) das alças de Henle. Nenhuma diferença no padrão de distribuição e na intensidade de reação para AQP-1 nas alças descendentes (AD) foi observada entre as temperaturas de aclimação, nem entre os dois regimes de tratamento (Tabela 6).

**Tabela 6**– Porcentagem de reação±desvio padrão para reação de AQP-1 no córtex e na medula renal.

Temperatura de aclimação	Tratamento	% RC	% RM
25°C (n=5)	AL	4,42 ± 0,86	3,71 ± 0,43
25°C (n=5)	PA	4,59 ± 1,26	3,52 ± 0,98
32,5°C (n=4)	AL	4,61 ± 1,06	4,01 ± 1,33
32,5°C (n=3)	PA	4,52 ± 0,93	3,87 ± 0,72

AL – Regime *Ad libitum*; PA – Grupo privação de água; %RC – Porcentagem de reação no córtex renal; %RM – Porcentagem de reação na medula renal – a  $\neq$  *E. russatus* (C); P<0,05.

Para todas as temperaturas de aclimação, a distribuição das AQP-1 para os animais submetidos ao regime PA parece ser muito mais ampla e homogênea distribuída por todas as secções dos TCP e assim como observado para os animais aclimatados a 25°C, os animais aclimatados a 32,5°C não foram capazes de modular a expressão das AQP-1 nos TCP (Figura 2).



**Figura 2.** Imunolocalização da AQP-1 na Região Cortical (A e B) e Medular (C e D) do rim de *A. montensis* para o grupo controle e para o grupo submetido ao regime *ad libitum* (A e C) e de privação de água (B e D), aclimatados a 32,5°C. A reação pôde ser observada nas regiões apicais e laterais das células que compõe os Tubos Contorcidos Proximais para a região cortical (A e B) e nas regiões apicais das células que compõe as porções descendentes das Alças de Henle. TCP-Tubo contorcido proximal; TCD-Tubo contorcido distal; G-Glomerulo; AD-porção descendente da Alça de Henle; DC-Duto Coletor. Aumento: 40x100.

## Discussão

Para obterem-se explicações mecanísticas sobre mudanças populacionais, respostas fisiológicas específicas e os limites de tolerância fisiológica às variações na temperatura ambiente também devem ser compreendidas (Angilletta et al, 2002; Chown et al, 2010; Lovegrove et al, 2013).

Pouco se sabe a respeito de estratégias digestivas em resposta à temperatura ambiente (del Valle et al, 2004). Alterações morfológicas e enzimáticas no intestino foram observadas para vários animais em resposta a baixas temperaturas, e associada a outros fatores estressores, como qualidade da dieta (Bozinovic et al, 1990; Koteja, 1996; Voltura e Wunder, 1998; Sabat et al, 1999), entretanto estudos focados nos efeitos da temperatura, independente de outras condições estressantes, são raros (del Valle et al, 2004).

Indivíduos da espécie *A. montensis* submetidos à temperatura de aclimação de 32,5°C não foram capazes de manter a ingestão alimentar durante a privação de água. Quando animais são submetidos à restrição de água desenvolvem gradativamente um quadro de hipernatremia (excesso de sódio no sangue) e hiperosmolemia (desidratação intracelular), que leva à supressão da ingestão alimentar (Watts e Boyle, 2010). Esta resposta tem dois propósitos: primeiro este quadro reduz a quantidade de água requerida para a digestão de modo a permitir a reabsorção de água a partir do intestino, reduzindo os efeitos da hiperosmolemia (Lepkovsky et al., 1957; Kutscher, 1966; Schoorlemmer e Evered, 1993; Watts e Boyle, 2010); e segundo, reduz a ingestão de solutos a partir do alimento (Watts e Boyle, 2010), reduzindo a perda de água na urina (Schoorlemmer e Evered, 2002).

Apesar de apresentar valores de IA maiores em comparação com os dados obtidos para animais aclimatados a 25°C, durante o regime *ad libitum*, a diferença não foi estatisticamente significativa. Apesar disso, a pequena elevação na ingestão alimentar pode ser resultante da maior demanda energética associada à elevação do metabolismo, decorrente do aumento da temperatura. A relação entre temperatura ambiente e taxa metabólica é diretamente afetada por efeitos do aquecimento global, por meio dos aumentos das temperaturas médias e da frequência e intensidade das ondas de calor. (Dillon et al, 2010; Lovegrove et al, 2013). Sabe-se que aumento na temperatura leva ao aumento da taxa de consumo de oxigênio (Schmidt-Nielsen, 2002), refletindo diretamente na taxa metabólica, e

esse aumento no consumo de oxigênio gera uma maior demanda energética, que estaria sendo suprida pela maior ingestão alimentar.

Quando submetidos a temperaturas elevadas, a capacidade de dissipação de calor de mamíferos depende inteiramente da perda de água evaporativa, sendo que esta perda tem implicações não só nos mecanismos termorregulatórios, mas é também um fator importante na manutenção do balanço hídrico (Blackwell e Pivorun, 1979). A perda de água através da evaporação é, para muitas espécies, responsável pela maior carga de saída de água do organismo (Baudinetti et al, 2000), podendo atingir mais 70% do total de água perdida para algumas espécies (Webb et al, 1995; Cooper e Withers, 2014). Esta via depende dos gradientes de temperatura e humidade entre a superfície do indivíduo e do ambiente (McNab, 2000).

A maior ênfase no processo de PAE para animais mantidos a 32,5°C fica evidente pela relação  $I_{H_2O}:VU$ , maior para estes animais em comparação com o observado para animais mantidos a 25°C. Essa diferença é resultante do maior volume de água ingerido como mecanismo para balancear os efeitos da maior necessidade de mobilização de água para a termorregulação. Os animais submetidos à temperatura ambiente de 32,5°C apresentaram maior PAE, tanto para o regime AL quanto para o regime PA, em comparação ao observado para animais submetidos à temperatura de 25°C. Além disso, a relação entre PAE e FTA mostra que para os animais submetidos à maior temperatura de aclimação, a PAE representa maior fração do FTA, em estado normal de hidratação. Quando o gradiente de temperatura entre o animal e o ambiente se torna pequeno, o processo de resfriamento através da evaporação deve ser utilizado para manter a temperatura corporal dentro de limites aceitáveis (Cain III et al, 2010), resultando na maior da perda de água evaporativa nos animais submetidos à temperatura de 32,5°C.

Animais terrestres possuem capacidade limitada para o resfriamento por evaporação, pois a desidratação afeta o desempenho e pode levar a morte (Angiletta et al, 2010). A estratégia adotada para a termorregulação em temperaturas elevadas depende do estado de hidratação do indivíduo. Quando privados de água, os animais aclimatados à temperatura de 32,5°C reduziram a PAE em cerca de 30%. Tipicamente, um período de privação de água leva a uma redução da ênfase no processo de resfriamento do corpo através da perda de água evaporativa, podendo resultar na elevação da temperatura corporal (Angiletta et al,

2010). Essa redução só foi observada para os animais aclimatados a 32,5°C, provavelmente em decorrência de maior estresse hídrico.

Os gastos de água com a termorregulação parecem aumentar a pressão sobre o sistema de manutenção do balanço hídrico nos animais mantidos a 32,5°C que, quando privados de água, reduzem a ênfase no processo de resfriamento do corpo pela evaporação de modo a reduzir os efeitos da desidratação, que podem ser fatais. Em contrapartida a temperatura de 25°C parece não impor maior desafio ao sistema hídrico em *A. montensis*, visto que a redução da perda de água evaporativa não é desencadeada pela privação de água.

A elevação da PAE gera uma maior pressão sobre o equilíbrio hídrico nos animais submetidos à temperatura mais elevada, influenciando diretamente a ingestão de água e os caracteres fisiológicos associados à conservação desta. Apesar disso, os animais submetidos às duas temperaturas de aclimação não exibiram diferenças significativas nos valores de concentração de urina, durante o regime AL.

Quando submetidas ao regime de privação de água, todos os animais apresentaram aumento na concentração de urina, mas novamente não foram observadas diferenças significativas para entre os valores de concentração de urina dos animais submetidos às duas temperaturas de aclimação. Esse resultado sugere que o protocolo de privação de água, independente de outros fatores estressores, leva os indivíduos da espécie *A. montensis* a exibir valores máximos de concentração de urina, e mesmo com seu balanço hídrico sofrendo maior pressão decorrente da elevada perda de água evaporativa quando submetidos à alta temperatura, estes animais não possuem mecanismos de concentração de urina capazes de produzir urina com maior valor do que o esperado, com base em sua morfologia renal.

Os valores dos índices da morfologia renal EMR e AMR são consistentes com os observados em trabalho anterior (Castellar et al, 2015; Capítulos 1 e 2), sendo que nenhuma diferença significativa foi observada, nem entre os tratamentos, nem entre as temperaturas de aclimação. A correlação entre a morfologia renal e a capacidade de concentração de urina em mamíferos é, há muito tempo, reconhecida (Sperber, 1944; Schmidt-Nielsen e O'Dell, 1961; Beuchat, 1990, 1996; Al-Kahtani et al, 2004), sendo que os animais com maior capacidade de concentração de urina

geralmente possuem medulas mais proeminentes, reflexo da presença de longas alças de Henle, e conseqüentemente maiores espessuras medulares. Considerando-se que algumas espécies não se enquadram nesta predição (Schmidt-Nielsen e O'Dell, 1961; Schmidt-Nielsen et al, 1961; Gutman e Byeth, 1970; Bronwfield e Wunder, 1976), Bronwfield e Wunder (1976) propuseram um novo índice para estimar com maior precisão a capacidade de concentração de urina, a área medular relativa (AMR). Os valores de concentração máxima da urina predito para os animais através destes índices morfológicos mostram que os valores observados durante a privação de água, tanto para animais aclimatados a 32,5°C quanto para os aclimatados a 25°C, estão próximos ao máximo teórico esperado para sua morfologia renal, e são mais próximos ao predito pelo índice AMR.

Apesar de apresentarem menores valores de concentração de urina durante o regime PA, os animais aclimatados a temperatura de 32,5°C mostram valores que são mais próximos ao máximo teórico predito por seus índices morfológicos. Apesar disso, a ausência de diferenças significativas nos valores de EMR, AMR e de U entre as temperaturas de aclimação, corroboram a sugestão de que os valores máximos de concentração de urina são atingidos mesmo nos animais aclimatados a 25°C. Os resultados observados na análise dos componentes celulares relacionados à capacidade de concentração de urina corroboram a hipótese de que a capacidade máxima de concentração de urina é atingida através do protocolo de privação de água, mesmo quando os animais foram aclimatados a 25°C.

As Aquaporinas (AQP) são uma família de proteínas integrais de membrana que funcionam como canais moleculares de água (Knepper et al, 1996), facilitando o transporte através da membrana celular numa grande variedade de células (Bozinovic et al, 2003). A AQP-1 desempenha papel crítico na capacidade de concentração de urina (Ma et al, 1998; Zhao et al, 2006), sendo que a ausência desta proteína em animais *knockout* leva a diurese e impede a concentração de urina em animais privados de água (Ma et al, 1998).

A mesma intensidade de reação para a AQP-1 foi observada para os animais aclimatados a 25°C e 32,5°C. Os animais não foram capazes modular a expressão destas proteínas, apresentando a mesma intensidade de reação para os dois regimes (AL e PA), e para as duas temperaturas de aclimação. Assim como reportado em nosso trabalho anterior (Castellar et al, 2015), durante a privação de

água apenas uma discreta alteração no padrão de distribuição das AQP-1 nos túbulos proximais foi observada, formando um padrão mais uniforme e bem distribuído ao longo da extensão destes túbulos, que pode representar uma maior eficiência na concentração de urina durante a privação de água. A ausência de diferenças na expressão da AQP-1 indica que esta pode não ser a única AQP envolvida na concentração de urina.

Por fim, os maiores valores de FTA nos animais aclimatados a 32,5°C são provavelmente decorrentes da somatória das alterações nos parâmetros associados à manutenção do balanço hídrico. O aumento da perda de água evaporativa, da ingestão de água e a produção de maior volume de urina afetam diretamente a equação do geral de balanço hídrico, resultando em maior fluxo total de água, quando comparados aos animais submetidos à temperatura de 25°C.

## **Conclusões**

Foram evidentes os efeitos da temperatura sobre os componentes do balanço hídrico em *A. montensis*. A pequena elevação na ingestão alimentar parece ser resultante da maior demanda energética associada à elevação do metabolismo. Maior ênfase na perda de água evaporativa foi observada nos animais mantidos a 32,5°C, que apresentaram maior PAE tanto para o regime AL, quanto para o regime PA, em comparação ao observado para animais mantidos à temperatura de 25°C. Para contrabalancear a maior necessidade de água, devido à maior demanda de água evaporativa para a termorregulação, *A. montensis* apresentou maior volume de ingestão de água.

O estado de hidratação apresentou influência direta sobre a regulação da PAE, sendo que os animais submetidos à temperatura de 32,5° apresentaram redução de 30% em sua PEA, quando privados de água. Essa redução não é observada nos animais mantidos a 25°C, e parece ser o principal mecanismo através do qual os indivíduos da espécie *A. montensis*, mantidos à temperatura elevada, reduzem o gasto de água frente ao estresse hídrico.

Apesar da maior pressão sobre o sistema de manutenção do equilíbrio hídrico nos animais submetidos à temperatura mais elevada, estes não foram capazes de concentrar urina a níveis maiores que os animais mantidos a 25°C, quando privados

de água. Esse resultado, somado ao fato de que os valores de concentração de urina atingidos durante a privação de água, nas duas temperaturas de aclimação, estão muito próximos ao máximo teórico predito pela morfologia renal, sugere que o protocolo de privação de água, independente de outros fatores estressores, leva os indivíduos da espécie *A. montensis* a exibir valores máximos de concentração de urina.

Também não foram observadas diferenças nos mecanismos celulares de concentração de urina analisados, sendo que mesma intensidade de reação para a AQP-1 foi observada para os animais aclimatados a 25°C e 32,5°C. Assim, mesmo com seu balanço hídrico sobre maior estresse, decorrente da elevada temperatura, estes animais parecem não possuir mecanismos de concentração de urina capazes de produzir urina com valores maiores do observado.

*A. montensis* parece capaz de reduzir os efeitos da temperatura elevada através de redução da perda de água evaporativa. Porém, nossos resultados também sugerem que a máxima capacidade de concentração de urina possa ter sido atingida através da privação de água, independente da elevação da temperatura, e apesar de ter resultados melhores frente à fragmentação do habitat em comparação a outras espécies de roedores (Castellar et al, 2015), esta capacidade limitada de concentração de urina pode representar uma barreira fisiológica em caso de estresse hídrico prolongado.

## **Agradecimentos**

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do Projeto Temático “Effects of global climate change on the Brazilian fauna: a conservation physiology approach” (FAPESP 2008/57687-0), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 158975/2011-1).

## Referências Bibliográficas

- Al-kahtani MA, Zuleta C, Caviedes-Vidal E, e Garland T. 2004. Kidney mass and relative medullary thickness of rodents in relation to habitat, body size, and phylogeny. **Physiol Biochem Zool**, 77(3), 346-365.
- Angilletta Jr. MJ, Cooper BS, Schuler MS, Boyles JG. 2010. The evolution of thermal physiology in endotherms. *Front Biosci*, Jun1(2):861-81.
- Baldo MB, Antenucci CD, Luna F. 2015. Effect of ambient temperature on evaporative water loss in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. **J Therm Biol**, 53:113-118.
- Baudinette RV, Churchill SK, Christian KA, Nelson JE, Hudson PJ. 2000. Energy, water balance and the roost microenvironment in three Australian cave-dwelling bats (Microchiroptera). **J Comp Physiol B**, 170:439-446.
- Beuchat CA. 1990. Body size, medullary thickness, and urine concentrating ability in mammals. **Am J Physiol-Reg I** 258:R298–R308.
- Beuchat CA. 1996. Structure and concentrating ability of the mammalian kidney: correlations with habitat. **Am J Physiol-Reg I** 271: R157–R179.
- Bozinovic F, Novoa FF, Veloso C. 1990. Seasonal changes in energy expenditure and digestive tract of *Abrothrix andinus* (Cricetidae) in the Andes Range. **Physiol Zool** 63:1216–1231.
- Bozinovic F, Gallardo PA, Visser RH, Cortés A. 2003. Seasonal acclimatization in water flux rate, urine osmolality and kidney water channels in free-living degus: molecular mechanisms, physiological processes and ecological implications. **J Exp Biol** 206:2959–2966.
- Brownfield MS, Wunder BA. 1976. Relative medullary area: A new structural index for estimating urinary concentrating capacity of mammals. **Comp Bioch Physiol**, 55A:69-75.
- Cadenasso ML, Traynor MM, Pickett STA. 1997. Functional location of forest edges: gradients of multiple physical factors. **Can J For Res** 27:774-782.
- Cain III JW, Krausman PR, Rosenstock SS, Turner JC. 2010. Mechanisms of Thermoregulation and Water Balance in Desert Ungulates. **Wildlife Soc B**, 34(3):570-581.
- Castellar A, Bertoli PC, Galdino LH, Domeniconi RF, da Cruz-Neto AP. 2015. Differences in physiological traits associated with water balance among rodents, and their relationship to tolerance of habitat fragmentation. **J Exp Zool**, DOI: 10.1002/jez.1966, *In press*.
- Chappell MA. 1980. Thermal energetics and thermoregulatory costs of small Arctic mammals. **J Mammal** 61:278–291.
- Chown SL, Hoffmann AA, Kristensen TN, Angilletta MJ, Stenseth NC, e Pertoldi C. 2010. Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. **Clim Res** 43:3–15.
- Cooper CE e Withers PC. 2014. Physiological responses of a rodent to heliox reveal constancy of evaporative water loss under perturbing environmental conditions. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 307: R1042–R1048.

- del Valle JC, Mañanes AAL, Busch C. 2004. Phenotypic flexibility of digestive morphology and physiology of the South American omnivorous rodent *Akodon azarae* (Rodentia: Sigmodontinae). *Comp Biochem Phys A*, 139:503– 512.
- DeWitt, TJ, Sih A, Wilson DS. 1998. Cost and limits of phenotypic plasticity. **Tree**, 13:77–81.
- Didham RK, Lawton JH. 1999. Edge structure determines the magnitude of changes in microclimate and vegetation structure in tropical forest fragments. **Biotropica** 31(1):17-30.
- Gutman T, Byeth Y. 1970. Discrepancy between concentrating ability and kidney structure. **Life Sci** 9:37-42.
- Karasov, W.H. e Martínez del Rio, C. 2009. *Physiological Ecology: How animals process energy, nutrients, and toxins*. Princeton University Press.
- Knepper MA, Wade JB, Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Mandon B, Chou CL, Kishore BK, Nielson S. 1996. Renal aquaporins. **Kidney Int** 49:1712-1717.
- Koteja P. 1996. Limits to the energy budget in a rodent, *Peromyscus maniculatus*: does gut capacity set the limit? **Physiol Zool** 69:994–1020.
- Kutscher CL. 1966. Effect of hypertonic saline injections and water deprivation on drinking, serum osmolality and gut water. **Physiol Behav** 1:259–268.
- Lepkovsky S, Lyman R, Fleming D, Nagumo M, Demick MM. 1957. Gastrointestinal regulation of water and its effect on food intake and rate of digestion. **Am J Physiol** 188:327–331.
- Lighton JRB. 2008. **Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists**. Oxford University Press.
- Lovegrove BG, Canale C, Levesque D, Fluch G, Řeháková-Petrů M, Ruf T. 2013. Are Tropical Small Mammals Physiologically Vulnerable to Arrhenius Effects and Climate Change? **Physiol Biochem Zool** 87(1):30–45.
- Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. 1998. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. **J Biol Chem** 273:4296–4299.
- McNab BK. 2002. **The physiological ecology of vertebrates: a view from energetics**. Ithaca N.Y.: Cornell University Press.
- Metzger JP, Alves LF, Goulart W, Teixeira AMG, Simões SJC, Catharino ELM. 2006. Uma área de relevante interesse biológico, porém pouco conhecida: a Reserva Florestal do Morro Grande. **Biota Neotrop** 6(2).
- Olifiers, N., Gentile, R., e Fiszon, J., 2005. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the brazilian atlantic forest. **Brazilian Journal of Biology**, v.65(3), p.495-501.
- Pardini R, Umetsu F. 2006. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande – distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. **Biota Neotrop** 6(2).
- Pereira BF, Alves RMS, Alves AL, Senhorini JA, Rocha RCGA, Scalize PH, Pitol DL, Caetano FH. 2014. Effects of Biodegradable Detergents in Morphological Parameters of Liver in Two Neotropical Fish Species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). **Microscopy Research** 2:39-49.

- Piersma T e Drent J. 2003. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. **Tree** 18:228–233.
- Porter WP e Gates DM. 1969. Thermodynamic equilibria of animals with environment. **Ecol Monogr.** 39:227–244.
- Ribeiro MFS, Rocha PLB, Mendes LAF, Perry SF, Oliveira ES. 2004. Physiological effects of short term water deprivation in the South American sigmodontine Rice rat *Oligoryzomys nigripes* and water rat *Nectomys squamipes* within a phylogenetic context. **Can J Zool** 82(8):1326-1335.
- Sabat P, Lagos JA, Bozinovic F. 1999. Test of the adaptive modulation hypothesis in rodents: dietary flexibility and enzyme plasticity. **Comp Biochem Physiol**, A123:83–87.
- Schmidt-Nielsen B, O'Dell R. 1961. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney. **Am J Physiol** 200:1119-1124.
- Schmidt-Nielsen B, O'Dell R, Osaki H. 1961. Interdependence of urea and eletrolytes in production of a concentrated urine. **Am J Physiol** 200:1125-1132.
- Schmidt-Nielsen, K., 2002. **Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente**. 5.<sup>a</sup> Edição. Editora Santos.
- Schoorlemmer GHM, Evered MD. 1993. Water and solute balance in rats during 10h water deprivation and rehydration. **Can J Physiol Pharmacol** 71:379–386.
- Schoorlemmer GHM, Evered MD. 2002. Reduced feeding during water deprivation depends on hydration of the gut. **Am J Physiol-Reg I** 283: R1061-R1069.
- Speakman JR. 1997. **Doubly Labelled Water: Theory and Practice**. Chapman & Hall, London.
- Sperber I. 1944. Studies on the mammalian kidney. **Zool Bidr Uppsala** 22:249-257.
- Voigt CC, Cruz-Neto A. 2009. Energetic analysis. In: Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats (eds. T.H. Kunz, S. Parsons). **The Johns Hopkins University Press**, Baltimore, 623-645.
- Voltura MB e Wunder BA. 1998. Effects of ambient temperature, diet quality, and food restriction on body composition dynamics of the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. **Physiol Zool**, 71:321–328.
- Watts A e Boyle CN. The functional architecture of dehydration-anorexia. **Physiol Behav**, 100:472-477.
- Webb PI, Speakman JR, Racey PA. 1995. Evaporative water loss in two sympatric species of vespertilionid bat, *Plecotus auritus* and *Myotis daubentoni*: relation to foraging mode and implications for roost site selection. **J Zool** 235:269–278.
- Williams-Linera G, Domínguez-Gastelú V, García-Zurita ME. 1998. Microenvironment and Floristics of Different Edges in a Fragmented Tropical Rainforest. **Conserv Biol** 12(5):1091–1102.
- Zhao D, Bankir L, Qian L, Yang D, Yang B. 2006. Urea and urine concentrating ability in mice lacking AQP1 and AQP3. **Am J Physiol Renal Physiol** 291:429–438.

## CAPÍTULO 4

### Balanço hídrico de roedores com diferentes tolerâncias à fragmentação do habitat: Comparação entre populações de diferentes habitats.

---

**Abstract.** *Water balance in rodents with distinct tolerance to habitat fragmentation: Comparison between diferente habitats populations.* The species *Euryoryzomys russatus* and *Akodon montensis*, from the Morro Grande Forest Reserve (MGFR) show distinct tolerance to water deprivation, which might answer their different tolerance to habitat fragmentation. The MGFR is one of the largest remainings of the Atlantic Forest with climate characterized as warm and humid temperate, without a well defined dry season during winter. São José Forest (SJF), one of the few remainings of semi-deciduous seasonal forest in São Paulo State, holds two well defined seasons, with a dry and a rainy season. The occurrence of a well defined dry season in SJF might represent a challenge to the water balance of the species *A. montensis* and *E. russatus*, what wouldn't happen with the animals from MGFR. Our aim was to evaluate the degree of physiological adjustment associated with the water balance in individuals of the *A. montensis* species, in *ad libitum* condition and facing water deprivation, and of *E. russatus* in *ad libitum*, both from SJF, in comparison to animals from MGFR. None of the species collected in SJF was able to maintain the food intake during water deprivation, and both food intake and feces production have no significant differences between the populations. The relation  $I_{H_2O}:VU$  to the animals from SJF was higher than the observed in *A. montensis* from MGFR, indicating higher evaporative water loss in animals from SJF. None of the others variables analysed, both in *E. russatus* in *ad libitum* condition and *A. montensis* in treatment regimen, presented differences when comparing SJF and MGFR populations. The lack of differences on the main variables associated with water balance maintenance indicates that the climate differences between both studied areas seem not to represent a selective force able to lead to the expansion of the phenotypic plasticity of the physiological characteristics that regulate water balance in *A. montensis* from SJF.

**Keywords:** *Akodon montensis*. *Euryoryzomys russatus* . Water balance. Water deprivation. Evaporative water loss. Urine concentration. Total water flow. Morro Grande. São José Forest.

**Resumo:** As espécies *Euryoryzomys russatus* e *Akodon montensis*, provenientes da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG) apresentam diferentes tolerâncias à privação de água, que podem responder pela tolerância diferenciada à fragmentação do hábitat. A RFMG é um dos maiores remanescentes de Mata Atlântica com clima caracterizado como temperado quente e úmido, sem uma estação seca bem definida no inverno. A Mata São José (MSJ), um dos poucos remanescentes de floresta estacional semidecídua no interior do Estado de São Paulo, possui duas estações bem definidas, com um período seco e um período chuvoso. A ocorrência de uma estação seca bem definida na MSJ pode representar um desafio ao balanço hídrico das espécies *A. montensis* e *E. russatus*, que não ocorreria com os animais provenientes da RFMG. Nosso objetivo foi avaliar o grau de ajustes fisiológicos associados ao balanço hídrico em indivíduos da espécie *A. montensis*, em condições *ad libitum* e frente à privação de água, e de *E. russatus* em condições *ad libitum*, provenientes da MSJ, em comparação com animais provenientes da RFMG. Nenhuma das espécies coletadas na MSJ foi capaz de manter a ingestão de alimento durante o regime de privação de água, e tanto a ingestão de alimentos quanto a produção de fezes não diferem significativamente entre as populações. A relação  $IH_2O:VU$  para os animais da MSJ foi maior do que o observado em *A. montensis* da RFMG, indicando maior perda de água evaporativa em animais da MSJ. Nenhuma das demais variáveis analisadas, tanto para *E. russatus* em condições *ad libitum*, quanto para *A. montensis* nos dois regimes de tratamento, apresentou diferenças quando comparadas as populações da MSJ e da RFMG. A ausência de diferenças nas principais variáveis associadas à manutenção do balanço hídrico indica que as diferenças climáticas entre as duas áreas estudadas parecem não representar força seletiva capaz de levar à ampliação da plasticidade fenotípica dos caracteres fisiológicos reguladores do balanço hídrico em *A. montensis* provenientes da MSJ.

**Palavras-chave:** *Akodon montensis*. *Euryoryzomys russatus*. Balanço hídrico. Privação de água. Perda de água evaporativa. Concentração de urina. Fluxo total de água. Morro Grande. Mata São José.

## Introdução

Nossos resultados anteriores mostram que as espécies *Euryoryzomys russatus* e *Akodon montensis*, provenientes da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG) apresentam diferentes tolerâncias à privação de água, e que estas diferenças inerentes entre as duas espécies podem ser parte do mecanismo que resulta na diferente tolerância à fragmentação do hábitat. A Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG) é um dos maiores remanescentes de Mata Atlântica, abrangendo uma área de cerca de 10.870ha do município de Cotia/SP (Metzger et al, 2006), com clima caracterizado como temperado quente e úmido, sem uma estação seca bem definida no inverno (Metzger et al, 2006). Apesar de haver uma sazonalidade, onde os meses de Abril a Agosto apresentam diminuição da pluviosidade e das temperaturas médias, não há déficit hídrico e as variações de precipitação não são suficientes para caracterizar clima com estação seca marcada (Metzger et al, 2006).

Os caracteres fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico dos animais provenientes de áreas bem preservadas não devem ter sido influenciados pelos efeitos da fragmentação. Assim, as respostas apresentadas por estes frente à privação de água, nos permitem analisar como estas espécies se comportariam frente a alterações ambientais decorrentes da fragmentação do habitat, que desafiam a manutenção do balanço hídrico.

A Mata São José (MSJ) é o maior de três fragmentos de um dos poucos remanescentes de floresta estacional semidecídua no interior do Estado de São Paulo (Bernardo e Galetti, 2004), separados entre si principalmente por monocultura de cana-de-açúcar e manchas de seringal. Situada em propriedade privada (Fazenda São José) localizada entre as cidades de Rio Claro e Araras, a Mata São José apresentou maior riqueza florística quando comparada a outros remanescentes do Estado de São Paulo (Pagano et al, 1995). A MSJ localiza-se em região de clima do tipo "Cwa", com temperatura média superior a 22°C (Briani et al, 2001), e com duas estações bem definidas, sendo um período seco (Abril-Setembro; precipitação de 180-200mm) e um período chuvoso (Outubro-Março; precipitação aproximada de 1200mm)(Briani et al, 2001).

Estudo sobre a composição de mamíferos não voadores na MSJ registrou seis espécies de roedores (Sciuridae e Muridae), e dentre elas a mais abundante foi *A. montensis*. Em trabalhos de campo recentes realizados na MSJ, foram também

capturados indivíduos da espécie *E. russatus* (dados pessoais não publicados), não observada por Briani e colaboradores. A ocorrência de uma estação seca bem definida na MSJ pode representar um desafio ao balanço hídrico das espécies *A. montensis* e *E. russatus*, que não ocorreria com os animais provenientes da RFMG. É neste contexto que o presente trabalho se enquadra, objetivando primeiramente avaliar o grau de ajustes fisiológicos associados ao balanço hídrico em indivíduos da espécie *A. montensis* provenientes da MJS, frente à privação de água de curta duração, e comparar os resultados obtidos com os resultados observados em estudo prévio com animais provenientes da RFMG (Capítulo 2). Também serão comparados os parâmetros fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico para a espécie *E. russatus*, submetido a um regime *ad libitum*, com o intuito de comparar os dados em condições fisiológicas normais da população da MSJ em comparação com dados observados em nosso trabalho anterior para animais provenientes da RFMG.

## **Métodos**

### *Área de Estudo*

O estudo foi realizado com animais provenientes da Mata São José (MSJ), um remanescente de floresta estacional semidecídua, localizado entre as cidades de Rio Claro e Araras (230 ha, 47°28'W e 22°22'S; Bernardo e Galetti, 2004). Os dados obtidos neste experimento foram comparados com dados previamente obtidos para animais provenientes da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), e submetidos ao mesmo protocolo experimental, apresentados no Capítulo 2.

### *Protocolo experimental*

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA-UNESP/Rio Claro - Protocolo 3062). Ao todo 9 animais da espécie *Akodon montensis* e 2 da espécie *E. russatus* foram capturados (com autorização do ICMBio Sisbio - Processo: 33096-4) com armadilhas Sherman® em trilhas previamente estabelecidas na área de estudo. Para se evitar efeitos do sexo e estado reprodutivo, somente machos adultos e não reprodutivos foram utilizados. Após a captura os animais foram transportados para as dependências do

Departamento de Zoologia da UNESP (Rio Claro/SP) e acondicionados em gaiolas metabólicas individuais que permitiram a separação e a coleta das fezes e da urina produzida, além da quantificação da ingestão de alimento e de água, e mantidas em sala climatizada (Fitotrom – Eletrolab, Brasil) inicialmente ajustada para 25°C, com Umidade Relativa (UR) em torno de 70 a 80% e fotoperíodo de 12:12hs. Posteriormente os animais foram aclimatados durante 7-10 dias a 25°C com água e alimento (ração Nuvilab CR-1 para camundongos e ratos, Nuvital Nutrientes Ltda., Brasil) fornecidos *ad libitum*. Para avaliar as variáveis fisiológicas das espécies e compara-las com nossos resultados prévios, os animais foram submetidos a um experimento de “jardim comum”, onde foram aclimatados em laboratório em condições abióticas e de dieta idênticas ao realizado nos experimentos com animais provenientes da RFMG.

Após o período de aclimação, os animais da espécie *A. montensis* foram divididos em dois grupos e submetidos a protocolo experimental modificado a partir de Ribeiro e colaboradores (2004). Um grupo foi submetido a um período de cinco dias alimentados com ração e água *ad libitum* (regime *Ad libitum* – AL; n=5). O outro grupo foi submetido a um período de 48h no qual toda a fonte de água exógena foi retirada (regime Privação de Água – PA; n=4). Devido ao baixo número de indivíduos capturados na MSJ, a espécie *E. russatus* foi avaliada apenas no regime AL.

Durante os dois regimes (AL e PA) a massa corporal ( $M_c$ ), a ingestão de alimento (IA), a ingestão de água (água livre + água contida no alimento –  $I_{H_2O}$ ), a produção de fezes (PF) e o volume de urina (VU) foram medidas em bases diárias. A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação entre a ingestão de alimentos (IA) e a produção de fezes (PF). A relação  $I_{H_2O}:VU$  foi calculada a partir dos dados de  $I_{H_2O}$  e VU. A osmolalidade da urina (U) foi determinada através de osmômetro (ML Knauer Semi-Micro Osmometer, Alemanha) para amostras maiores que 50 $\mu$ L. Osmolalidade das amostras menores que 50 $\mu$ L não puderam ser determinadas. Os valores de U obtidos durante o regime PA foram comparados com os valores de osmolalidade máxima ( $U_{max}$ ) preditos pelos índices morfológicos renais.

### *Perda de água evaporativa*

Os valores de variação na umidade relativa (UR) medidos durante a respirometria de fluxo aberto, realizada na mesma temperatura de aclimação, foram utilizados para calcular a perda de água evaporativa total. Para isso, os animais foram acondicionados em respirômetros customizados (volume interno de 400ml), os quais foram colocados em estufa BOD com controle de temperatura. Ar comprimido, após a eliminação de CO<sub>2</sub> e vapor de água, foi enviado ao respirômetro com volume controlado por um fluxímetro de massa multicanal (MF-8 Mass Flow Meter, Sable System, Las Vegas, NY, USA). O ar foi então empurrado dos respirômetros para um sensor de umidade relativa (Sable Systems RH-100; resolução 0,001% UR, acurácia 1% do valor registrado). Os valores de umidade relativa foram registrados por pelo menos 90 minutos em intervalos de 1 minuto através do programa Expedata® (Sable System, Las Vegas, NY, USA). O conteúdo de água evaporativa foi calculado como a diferença entre a pressão de vapor de água (PVA, kPa, medido pelo RH-100) do ar ambiente (baseline) e o valor produzido pelo animal.

O valor de PVA (medido em kPa) obtido foi então convertido em densidade de vapor de água (DVA) através da equação:  $DVA = PVA / (T \times R_w)$  - segundo Lighton (2008); Eq. 10.10 - onde o T é a temperatura (em °K) e  $R_w$  é a constante dos gases para o vapor de água ( $461,5 \text{ J.Kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ). A taxa de perda de água evaporativa foi então calculada como:  $PAE = DVA \times FR$  - segundo Lighton (2008) - onde FR é o fluxo do ar enviado ao respirômetro (ml/min).

### *Fluxo total de água*

O fluxo total de água (FTA) foi avaliado apenas no último dia de cada regime através da técnica de água duplamente marcada (Doubly Labeled Water - DLW), que envolve a marcação isotópica dos fluidos corporais dos animais. Os animais foram pesados ( $\pm 0,01 \text{ g}$ ) e levemente anestesiados, de modo a permitir a injeção segura de água duplamente marcada ( $35\%O_{18}$  e  $65\%^2H$ ) na cavidade intraperitoneal, e evitando a perda de massa injetável. Para determinar a massa do injetado com precisão, a seringa foi pesada imediatamente antes e depois da injeção ( $\pm 0,0001 \text{ g}$ ).

Os animais foram então devolvidos às gaiolas por 60min para permitir o equilíbrio dos isótopos com a água do corpo. Uma amostra de 100µl de sangue foi então coletada do sino infraorbital utilizando vidros capilares, que foram imediatamente selados a fogo (Voigt e Cruz-Neto, 2009). As amostras de sangue foram enviadas ao Doubly-labelled water Resource Centre (DLWRC, Universidade de Aberdeen - UK), onde foram analisados. O fluxo total de água (FTA) foi calculado segundo a equação:  $FTA = 1,017 \times N \times K_d$  - Speakman, (1997) – onde N é o valor de água corporal (mol) e  $K_d$  é o valor de lavagem do isótopo ( $^2H$ ).

### *Morfologia Renal*

Os rins foram medidos em sua largura, comprimento e espessura, com um paquímetro digital (Mitutoyo – precisão 0,01mm), e o volume do rim (VR – em mm<sup>3</sup>) foi calculado como o produto destas variáveis. Um corte sagital foi realizado no rim direito (se um corte completo não pode ser feito, o rim esquerdo foi utilizado) e, utilizando um scanner, as imagens dos rins foram digitalizadas. As medidas de espessura do córtex, espessura das camadas medulares (interna e externa), área da medula (AM) e área do córtex (AC) foram realizadas com o auxílio do software livre ImageJ. A espessura medular (EM) foi calculada como a soma dos valores de espessura das camadas interna e externa da medula, e os valores de espessura medular relativa ( $EMR = 10 \times [EM] / [VR]^{1/3}$ ) e área medular relativa ( $AMR = AM/AC$ ) foram então calculados (Sperber, 1944; Bronwfield e Wunder, 1976; Al-Kahtani et al, 2004).

Os valores de EMR e AMR foram utilizados para estimar a concentração máxima da urina ( $U_{max} = 542 \times EMR + 154$  - Beuchat, 1996;  $U_{max} = 873 + 2106 \times AMR$  - Bronwfield e Wunder, 1976) valores que foram comparados com os dados obtidos durante o regime PA.

### *Análise estatística*

Antes das análises estatísticas os dados foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk). Foram utilizados os teste t-Student (2 amostras) e o teste-U de Mann-Whitney para comparar os valores das variáveis coletadas para os regimes *ad libitum* (AL) e privação de água (PA), normalizadas para o peso, e para comparação

dos dados obtidos no presente trabalho com os dados provenientes de animais coletados na RFMG (Capítulo 2).

Resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão e  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o software statistiXL (versão 1.8; StatistiXL), SigmaPlot (versão 11; Systat Software) e STATISTICA® (versão 5.1 para Windows).

## Resultados

Para *A. montensis* submetido ao regime I (água *ad libitum* - AL), o valor de massa corporal ( $M_c$ ) foi de  $31,1 \pm 1,6$ g, IA foi de  $253,9 \pm 55,5$  mg.h<sup>-1</sup>, IH<sub>2</sub>O foi  $529,2 \pm 78,6$   $\mu$ L.h<sup>-1</sup>, VU foi  $70,9 \pm 21,2$   $\mu$ L.h<sup>-1</sup> e PF foi  $57,8 \pm 22,8$  mg.h<sup>-1</sup> (valores normalizados se encontram nas Tabelas 1 e 2). A perda de água nas fezes foi em média de 31,4% do peso das fezes. A produção de fezes (FE) está significativamente correlacionada com a ingestão de alimentos ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Ingestão de alimento (IA) e produção de fezes (PF) de *A. montensis* provenientes da Mata São José (MSJ) e da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

Área de Coleta	IA (mg.h <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )		PF (mg.h <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )	
	AL	PA	AL	PA
MSJ	816,4 $\pm$ 178,5 <sup>a</sup>	190,1 $\pm$ 91,7	185,9 $\pm$ 73,3 <sup>a</sup>	32,1 $\pm$ 27,2
RFMG*	765,4 $\pm$ 138,7 <sup>a</sup>	248,2 $\pm$ 126,5	209,9 $\pm$ 44,2 <sup>a</sup>	50,5 $\pm$ 33,1

Nota: \*Dados apresentados e analisados no Capítulo 2, que são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as diferentes populações. <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma área de coleta ( $P < 0,05$ ). Resultados são apresentados em média $\pm$ DP.

A comparação entre os dados obtidos nos regimes AL e PA mostra aumento significativo da osmolalidade da urina (U), passando de  $1439 \pm 285$  mosmol.kg<sup>-1</sup> no regime AL para  $1973 \pm 100$  mosmol.kg<sup>-1</sup> no regime PA. Também foram encontradas diferenças significativas na IA, no VU e na PF, sendo que os valores obtidos no regime PA foram  $59,3 \pm 28,6$  mg.h<sup>-1</sup>,  $23,4 \pm 6,3$   $\mu$ L.h<sup>-1</sup> e  $10,0 \pm 8,5$  mg.h<sup>-1</sup> respectivamente (valores normalizados se encontram nas Tabelas 1 e 2;  $p < 0,05$  para todas as variáveis). A perda de água nas fezes foi em média de 24,1% do peso das fezes.

**Tabela 2.** Ingestão de água (IH<sub>2</sub>O), osmolalidade da urina (U), volume de urina (VU) e relação IH<sub>2</sub>O:VU de *A. montensis* provenientes da Mata São José (MSJ) e da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

Área de Coleta	IH <sub>2</sub> O (μL.h <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )		U (mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )		VU (μL.h <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )		IH <sub>2</sub> O: VU	
	AL	PA	AL	PA	AL	PA	AL	PA
MSJ	1701±253	-	1439±285 <sup>a</sup>	1973±100	228±68 <sup>a</sup>	75±20	7,46	-
RFMG*	1809±597	-	1465±137 <sup>a</sup>	1965±79	222±88 <sup>a</sup>	57±37	6,72	-

Nota: \*Dados apresentados e analisados no Capítulo 2, que são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as diferentes populações. <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma área de coleta (P<0,05). Resultados são apresentados em média±DP.

Os valores de PAE e FTA para os dois regimes são apresentados na Tabela 3. Em comparação com os animais submetidos ao regime PA, não foram observadas diferenças significativas para os valores de PAE. Entretanto, o FTA foi significativamente menor que o valor observado para o regime AL ( $F_{4,5}=26,224$ ;  $P<0,05$ ). Os valores dos índices morfológicos (EMR e AMR) são apresentados na Tabela 4, e a comparação dos valores de U com o predito pela morfologia renal (EMR e AMR) é apresentada na Tabela 5.

**Tabela 3.** Perda de água evaporativa (PAE), fluxo total de água (FTA) e relação PAE/FTA (%) de *A. montensis* provenientes da Mata São José (MSJ) e da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

Área de Coleta	PAE (mLH <sub>2</sub> O.g <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )		FTA (mLH <sub>2</sub> O.dia <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )		PAE/FTA (%)	
	AL	PA	AL	PA	AL	PA
MSJ	0,048 ± 0,005	0,054 ± 0,005	0,324 ± 0,125 <sup>a</sup>	0,063 ± 0,024	14,8	85,7
RFMG*	0,043 ± 0,006	0,052 ± 0,009	0,384 ± 0,062 <sup>a</sup>	0,058 ± 0,008	12,9	89,3

Nota: \*Dados apresentados e analisados no Capítulo 2, que são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as diferentes populações. <sup>a</sup> indica diferença significativa entre os regimes, para a mesma área de coleta (P<0,05). Resultados são apresentados em média±DP.

Para *E. russatus* submetido ao regime AL, o valor de massa corporal ( $M_c$ ) foi de  $89,2 \pm 4,8$ g, IA foi de  $294,4 \pm 36,4$  mg.h<sup>-1</sup>, IH<sub>2</sub>O foi  $1031,3 \pm 120,3$  μL.h<sup>-1</sup>, VU foi  $258,3 \pm 66,7$  μL.h<sup>-1</sup>, e PF foi  $38,3 \pm 5,2$  mg.h<sup>-1</sup>. Os valores normalizados, juntamente com os dados obtidos para animais provenientes da RFMG são apresentados na Tabela 4. A perda de água nas fezes foi em média de 37,3% do peso das fezes. A produção de fezes (PF) foi significativamente correlacionada com a ingestão de alimentos (P<0,05). Os valores de PAE e FTA de *E. russatus* da MSJ, juntamente com os dados obtidos para animais provenientes da RFMG são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 4.** Valores de espessura medular relativa (EMR) e área medular relativa (AMR) para *A. montensis* provenientes da Mata São José (MSJ) e da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), com livre acesso a água (regime AL) e privados de água (regime PA).

	EMR		AMR	
	AL	PA	AL	PA
MSJ	4,55±0,36	4,36±0,23	0,507±0,072	0,509±0,091
RFMG*	4,54±0,50	4,51±0,68	0,519±0,090	0,537±0,237

Nota: \*Dados apresentados e analisados no Capítulo 2, que são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as diferentes populações.

**Tabela 5.** Comparação entre os valores de osmolalidade (U) obtidos durante o regime PA e os valores de osmolalidade máxima ( $U_{max}$ ) preditos através dos índices de morfologia renal (EMR - segundo Beuchat, 1996; AMR – segundo Bronwfield e Wunder, 1976) para *A. montensis* provenientes da Mata São José (MSJ) e da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG).

Área de Coleta	U	$U_{max}$	$U_{max}$
	(mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )	(mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )	(mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )
	regime PA	Predito por EMR	predito por AMR
MSJ	1973 ± 80	2438 (-19,1%)	1979 (-0,3%)
RFMG*	1965 ± 219	2519 (-22,0%)	2004 (- 1,9 %)

Nota: \*Dados apresentados e analisados no Capítulo 2, que são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as diferentes populações. A diferença entre o valor obtido e o predito é apresentada como % entre parênteses.

**Tabela 6.** Variáveis para a espécie *E. russatus*, submetida ao regime da libitum (AL), provenientes da Mata São José (MSJ) e da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG).

Variáveis	MSJ	RFMG*
IA (mg.h <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )	330,0±40,8	420,4±188,2
PF (mg.h <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )	42,9±5,8	53,8±34,2
IH <sub>2</sub> O (μL.h <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )	1156±135	1406±435
U (mosmol.kgH <sub>2</sub> O <sup>-1</sup> )	951±154	1022±48
VU (μL.h <sup>-1</sup> .100g <sup>-1</sup> )	289±75	324±97
IH <sub>2</sub> O: UV	4,00	3,96
PAE (mLH <sub>2</sub> O.g <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	1,89±0,34	0,035 ± 0,001
FTA (mLH <sub>2</sub> O.g <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	0,297±0,011	0,267 ± 0,056

Nota: \*Dados apresentados e analisados no Capítulo 2, que são apresentados novamente aqui para efeito de comparação entre as diferentes populações. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores apresentados (P>0,05 para todas as análises). Resultados são apresentados em média±DP.

A comparação dos dados obtidos neste experimento, para animais provenientes da MJS, com os dados obtidos em experimento anterior, para animais provenientes da RFMG, não evidenciou diferenças significativas entre as duas populações de *E. russatus* submetidos ao regime *ad libitum*. Para *A. montensis*, também não foram evidenciadas diferenças significativas nas variáveis analisadas, para os dois regimes (AL e PA).

## Discussão

As características climáticas da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), onde as variações de precipitação não são suficientes para caracterizar clima com estação seca marcada (Metzger et al, 2006), contrastam com o observado para a Mata São José, um dos poucos remanescentes de floresta estacional semidecídua no interior do Estado de São Paulo, na qual podem ser definidas duas estações distintas, sendo um período seco (precipitação de 180-200mm) e um período chuvoso (precipitação aproximada de 1200mm) (Briani et al, 2001). Assim, espera-se que as populações de *A. montensis* e *E. russatus* encontradas na Mata São José (MSJ) possam apresentar maior flexibilidade dos parâmetros fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico em comparação às populações da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), em decorrência da aclimatização ao ambiente com períodos de seca bem definidos.

Assim como observado para os animais provenientes da RFMG, nenhuma das espécies coletadas na MSJ foi capaz de manter a ingestão de alimento durante o regime de privação de água (PA), apresentando reduções significativas na ingestão alimentar, auxiliando a regulação dos fluidos corporais (Schoorlemmer e Evered, 2002) permitindo maior reabsorção de água no intestino, além de reduzir a perda de água através da urina, resultante da diminuição da carga de solutos (Lepkovsky et al., 1957; Kutscher, 1966; Schoorlemmer e Evered, 1993). A IA e PF não diferem significativamente entre as populações provenientes da MSJ e da RFMG (para *A. montensis* nos regimes AL e PA, e para *E. russatus* no regime AL), podendo indicar capacidades fisiológicas similares para as duas populações, apesar das diferenças entre as áreas de estudo.

Os valores de U, VU e IH<sub>2</sub>O de *E. russatus*, para o regime AL, não apresentam diferenças quando comparadas as populações da MSJ e da RFMG, indicando que

as diferenças climáticas entre as áreas não representam fator estressante para *E. russatus*, e parecem não suficientes para desencadear adaptações fisiológicas diferentes no balanço hídrico das duas populações de *E. russatus*.

*A. montensis* apresentou redução da perda de água nas fezes quando privadas de água, que representa economia de água e importante adaptação a períodos de privação de água. Resultados similares foram obtidos com animais provenientes da RFMG, e são possivelmente decorrentes da presença e atividade dos canais de água aquaporinas (AQP) no cólon (Gallardo et al, 2002, Bozinovic et al, 2003; Gallardo et al, 2005). A espécie *E. russatus* apresentou valores de perda de água nas fezes muito próximos ao observado para os animais da RFMG, novamente indicando similaridades fisiológicas entre as populações.

Quando submetidos ao regime PA os indivíduos da espécie *A. montensis* apresentaram os mesmos padrões respostas para a  $I_{H_2O}$ , U e VU observados nos animais da RFMG, sendo que nenhuma diferença significativa foi observada entre os valores obtidos nos dois experimentos. Apesar disso, a relação  $I_{H_2O}:VU$  para os animais da MSJ foi maior do que o observado em *A. montensis* da RFMG. Essa diferença indica os animais da MSJ pode estar sofrendo maior perda de água evaporativa. Apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas, os valores de PAE para a população de *A. montensis* da MSJ foram ligeiramente maior que para os animais da RFMG. A PAE está relacionada ao tamanho do corpo, e animais menores tendem sofrer maiores efeitos desta perda de água. O animais da espécie *A. montensis* provenientes da MSJ são cerca de 16% menores que os animais coletados na RFMG, e essa diferença pode ser a causa da pequena diferença nos valores de PAE observada entre as populações.

Durante o regime PA, os animais da espécie *A. montensis* provenientes da MSJ foram capazes de reduzir o volume urinário e aumentar a concentração da urina, atingindo os mesmos valores observados para os animais da RFMG. Nossos resultados sugerem que a privação de água de curta duração foi capaz de levar *A. montensis* a exibir sua máxima capacidade de concentração de urina. Esta hipótese é suportada quando analisamos os índices morfológicos renais (EMR e AMR).

O índice EMR vem sendo utilizado como uma estimativa da capacidade máxima de concentração de urina por vários autores (Bronwfield e Wunder, 1976; Beuchat, 1990, 1996; Al-Kahtani et al, 2004; Diaz et al., 2006; Coleman e Downs,

2009). A correlação entre a morfologia renal e a capacidade de concentração de urina em mamíferos é, há muito tempo, reconhecida (Sperber, 1944; Schmidt-Nielsen e O'Dell, 1961; Beuchat, 1990; Al-Kahtani et al, 2004), e os animais com maior capacidade de concentração de urina geralmente possuem medulas renais mais proeminentes devido à presença de longas alças de Henle. Como consequência desta morfologia, estes animais apresentam maiores espessuras medulares, em relação ao volume do rim. Porém, desde a introdução da RMT como método para predição a capacidade de concentração de urina, alguns estudos mostram espécies que não se enquadram nesta predição (Schmidt-Nielsen e O'Dell, 1961; Gutman e Byeth, 1970; Bronwfield e Wunder, 1976). Bronwfield e Wunder (1976) propuseram um novo índice, a área medular relativa (RMA), que permite estimar a capacidade do rim com maior precisão em comparação a outros métodos.

Os valores de concentração de urina observados para *A. montensis* provenientes da MSJ, quando submetidos ao regime PA, foram 19,1% abaixo do predito pela sua EMR, e apenas 0,3% abaixo do valor máximo de concentração de urina predito pela AMR. Nenhuma diferença foi observada entre os animais da MSJ e da RFMG indicando que, apesar das diferenças climáticas entre as áreas de estudo, os processos fisiológicos associados à capacidade de concentração de urina estão atuando de maneira semelhante nas duas populações.

Os valores de PAE e FTA apresentam o mesmo padrão de respostas nos animais das duas áreas de estudo (MSJ e RFMG). Para *A. montensis*, nenhuma diferença significativa foi observada, entre os regimes, para PAE. O FTA apresentou redução significativa quando os animais foram privados de água, resultado que é esperado visto que o fluxo total de água representa a somatória das variáveis envolvidas no balanço hídrico. Nesse caso, o protocolo de privação de água reduz a quantidade de água disponível para o animal, levando à diminuição do volume e aumento da concentração da urina e reduzindo o fluxo global de água que passa pelo organismo.

## **Conclusões**

A ausência de diferenças nas principais variáveis associadas à manutenção do balanço hídrico, para ambas as espécies, entre os indivíduos das duas áreas de

estudo (MSJ e RFMG) indicam que, apesar da diferença climática entre as duas áreas, as espécies não apresentam nenhuma diferença nas adaptações fisiológicas associadas ao balanço hídrico.

As diferenças climáticas entre as duas regiões parecem não representar força seletiva capaz de levar à ampliação da plasticidade fenotípica dos caracteres fisiológicos reguladores do balanço hídrico em *A. montensis* provenientes da MSJ, apresentando resposta à privação de água muito próxima do observado para os animais da RFMG. Os dados obtidos para *E. russatus* não permitem avaliar a variação na capacidade de resposta à tolerância à privação de água entre as populações, mas mostram que os animais provenientes das duas áreas, em condições *ad libitum*, se apresentam em condições fisiológicas muito próximas.

### **Agradecimentos**

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do Projeto Temático “Effects of global climate change on the Brazilian fauna: a conservation physiology approach” (FAPESP 2008/57687-0), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 158975/2011-1).

## Referências Bibliográficas

- Al-kahtani MA, Zuleta C, Caviedes-Vidal E, e Garland T. 2004. Kidney mass and relative medullary thickness of rodents in relation to habitat, body size, and phylogeny. **Physiol Biochem Zool**, 77(3), 346-365.
- Bernardo CSS, Galetti M. 2004. Densidade e tamanho populacional de primatas em um fragmento florestal no sudeste do Brasil. **Rev Bras Zool** 21(4):827–832.
- Beuchat CA. 1990. Body size, medullary thickness, and urine concentrating ability in mammals. **Am J Physiol-Reg I** 258:R298–R308.
- Beuchat CA. 1996. Structure and concentrating ability of the mammalian kidney: correlations with habitat. **Am J Physiol-Reg I** 271: R157–R179.
- Bozinovic F, Gallardo PA, Visser RH, Cortés A. 2003. Seasonal acclimatization in water flux rate, urine osmolality and kidney water channels in free-living degus: molecular mechanisms, physiological processes and ecological implications. **J Exp Biol** 206:2959–2966.
- Briani DC, Santori RT, Vieira MV, Gobbi N. 2001. Mamíferos não-voadores de um fragmento de mata mesófila semidecídua, do interior do Estado de São Paulo, Brasil. **Holos Environment** 1(2):141-149.
- Brownfield MS, Wunder BA. 1976. Relative medullary area: A new structural index for estimating urinary concentrating capacity of mammals. **Comp Biochem Physiol**, 55A:69-75.
- Coleman JC and Downs CT. 2009. Variation in urine concentrating ability and water balance of the Black-tailed Tree Rat *Thallomys nigricauda*, along an aridity gradient. **Comp Biochem Physiol A Physiol** 154:508–513.
- Diaz GB, Ojeda RA, Rezende EL. 2006. Renal morphology, phylogenetic history and desert adaptations of South American hystricognath rodents. **Funct Ecol** 20:609-620.
- Gallardo P, Olea N, Sepúlveda F. 2002. Distribution of aquaporins in the colon of *Octodon degus*, a South American desert rodent. **Am J Physiol** 283, R779– R788.
- Gallardo P, Cortés A, Bozinovic F. 2005. Phenotypic flexibility at the molecular and organismal level allows desert-dwelling rodents to cope with seasonal water availability. **Physiol Biochem Zool** 78, 145–152.
- Gutman T, Byeth Y. 1970. Discrepancy between concentrating ability and kidney structure. **Life Sci** 9:37-42.
- Kutscher CL. 1966. Effect of hypertonic saline injections and water deprivation on drinking, serum osmolality and gut water. **Physiol Behav** 1:259–268.
- Lepkovsky S, Lyman R, Fleming D, Nagumo M, Demick MM. 1957. Gastrointestinal regulation of water and its effect on food intake and rate of digestion. **Am J Physiol** 188:327–331.
- Lighton JRB. 2008. *Measuring Metabolic Rates: A Manual for Scientists*. Oxford University Press.
- Metzger JP, Alves LF, Goulart W, Teixeira AMG, Simões SJC, Catharino ELM. 2006. Uma área de relevante interesse biológico, porém pouco conhecida: a Reserva Florestal do Morro Grande. **Biota Neotrop** 6(2).
- Pagano SN, Leitão Filho HF, Cavassan O. 1995. Variação temporal da composição florística e estrutura fitossociológica de uma floresta mesófila semidecídua – Rio Claro – Estado de São Paulo. **Rev Bras Biol** 55(2):241-258.

Ribeiro MFS, Rocha PLB, Mendes LAF, Perry SF, Oliveira ES. 2004. Physiological effects of short term water deprivation in the South American sigmodontine Rice rat *Oligoryzomys nigripes* and water rat *Nectomys squamipes* within a phylogenetic context. **Can J Zool** 82(8):1326-1335.

Schmidt-Nielsen B, O'Dell R. 1961. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney. **Am J Physiol** 200:1119-1124.

Schoorlemmer GHM, Evered MD. 1993. Water and solute balance in rats during 10h water deprivation and rehydration. **Can J Physiol Pharmacol** 71:379–386.

Schoorlemmer GHM, Evered MD. 2002. Reduced feeding during water deprivation depends on hydration of the gut. **Am J Physiol-Reg I** 283: R1061-R1069.

Speakman JR. 1997. **Doubly Labelled Water: Theory and Practice**. Chapman & Hall, London.

Sperber I. 1944. Studies on the mammalian kidney. **Zool Bidr Uppsala** 22:249-257.

## CONCLUSÃO GERAL

---

A fragmentação é apontada como uma das principais causas de perda da biodiversidade nas regiões tropicais, e para a Floresta Atlântica este é um fenômeno comum, em muito associado à transformação de extensas áreas naturais em matrizes agropecuárias e outros habitats de baixa – ou nenhuma – relevância para a conservação. Ao mesmo tempo em que os impactos dessa ação são expostos, intensifica-se a necessidade de atenuá-los.

Este estudo concluiu em seu Capítulo 1 que, apesar da baixa plasticidade dos caracteres fisiológicos associados ao balanço hídrico exibido pelas espécies *A. montensis*, *E. russatus* e *O. nigripes*, as diferenças intrínsecas na tolerância à privação de água entre elas pode representar parte do mecanismo responsável pela resiliência diferenciada destas espécies à fragmentação.

No Capítulo 2, observamos que a maior tolerância à privação de água de *A. montensis* em comparação a *E. russatus* demonstrada é decorrente de uma maior plasticidade dos caracteres fisiológicos associados à manutenção do balanço hídrico, e que apesar do baixo grau de adaptação de ambas ao estresse hídrico, as diferenças intrínsecas entre elas garante à *A. montensis* maior capacidade de tolerar períodos de privação de água, uma vantagem adaptativa as mudanças abióticas observadas em habitats altamente modificados, em comparação à *E. russatus*.

Com os resultados obtidos no Capítulo 3 ficam evidentes os efeitos da temperatura sobre o balanço hídrico de *A. montensis*, com o aumento da perda de água evaporativa, quando submetidos à temperatura próxima das máximas registradas na área de coleta, representando uma pressão adicional sobre o sistema de equilíbrio. Entretanto, quando submetida à privação de água, a espécie parece capaz de reduzir os efeitos da temperatura elevada, através de alterações nos componentes de seu balanço hídrico, principalmente da modulação da perda de água evaporativa. Entretanto nossos resultados sugerem que a máxima capacidade de concentração de urina tenha sido atingida através do protocolo de privação de água, independente do efeito da temperatura, que pode significar que esta espécie pode não conseguir manter seu balanço hídrico ao enfrentar períodos prolongados de privação de água.

Por fim, o Capítulo 4 mostra que apesar da diferença climática entre as duas áreas estudadas (Reserva Florestal do Morro Grande e Mata São José), as espécies

não apresentam nenhuma diferença nas adaptações fisiológicas associadas ao balanço hídrico. As diferenças climáticas entre as duas regiões parecem não representar força seletiva capaz de levar à ampliação da plasticidade fenotípica dos caracteres fisiológicos reguladores do balanço hídrico em *A. montensis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asbjornsen H, Ashton MS, Vogt DJ, Palacios S. 2004. Effects of habitat fragmentation on the buffering capacity of edge environments in a seasonally dry tropical oak forest ecosystem in Oaxaca, Mexico. **Agric Ecosyst Environ**, 103:481–495.
- Beuchat CA. 1990. Body size, medullary thickness, and urine concentrating ability in mammals. **Am J Physiol-Reg I**, 258:R298–R308.
- Bozinovic F, Gallardo PA, Visser GH, e Cortes A. 2003. Seasonal acclimatization in water flux rate, urine osmolality and kidney water channels in free-living degus: molecular mechanisms, physiological processes and ecological implications. **J Exp Biol**, 206(17):2959-2966.
- Bozinovic F, Cruz-Neto AP, Cortes A, Diaz GB, Ojeda RA, Giannoni SM. 2007. Physiological diversity in tolerance to water deprivation among species of South American desert rodents. **J Arid Environ** 70:427-442.
- Brady MJ, Mcalpine CA, Miller CJ, Possingham HP, e Baxter GS. 2011. Mammal responses to matrix development intensity. **Austral Ecol**, 36:35–45.
- Bueno AA. 2008. Pequenos mamíferos da Mata Atlântica do Planalto Atlântico Paulista: uma avaliação da ameaça de extinção e da resposta a alterações no contexto e tamanho dos remanescentes. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Carey C. 2005. How physiological methods e concepts can be useful in conservation biology. **Integr Comp Biol**, 45:4–11.
- Casotti G, Herrera LG, Flores JJ, Mancina CA, e Braun EJ. 2006. Relationships between renal morphology and diet in 26 species of new world bats (suborder microchiroptera). **Zoology**, 109(3):196-207.
- Chown SL e Gaston KJ. 2008. Macrophysiology for a changing world. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, 275(1642):1469-1478.
- Coleman JC e Downs CT. 2009. Variation in urine concentrating ability and water balance of the Black-tailed Tree Rat *Thallomys nigricauda*, along an aridity gradient. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol**, 154:508–513.
- Collinge SK. 1996. Ecological consequences of habitat fragmentation: implications for landscape architecture and planning. **Landscape Urban Plan**, 36:59-77.
- Cooper CE e Withers PC. 2008. Allometry of evaporative water loss in marsupials: implications of the effect of ambient relative humidity on the physiology of brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). **J Exp Biol**, 211(17):2759-2766.
- Cordeiro, NJ e Howe HF. 2001. Low recruitment of trees dispersed by animals in African forest fragments. **Conserv Biol**, 15:1733–1741.
- Cortés A, Zuleta C, Rosenmann M. 1988. Comparative water economy of sympatric rodents in a Chilean semi-arid habitat. **Comp Biochem Physiol A Physiol** 91:711–714.
- Cottontail, VM, Wellinghausen N., e Kalko EKV. 2009. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panama. **Parasitology**, 136:1133–1145.

- Diaz GB, Dacar M., e Ojeda RA. 2001. Water conservation in the South American desert mouse opossum *Thylamys pusilla* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Comp Biochem Physiol**, 130:323–330.
- Diaz GB, Ojeda RA, e Rezende EL. 2006. Renal morphology, phylogenetic history and desert adaptation of South American hystricognath rodents. **Functional Ecol**, 20:609–620.
- Donnelly MA. 1998. Potential effects of climate change on two neotropical amphibian assemblages. **Climatic Change**, 39(2-3):541-561.
- Fahrig L. 2003. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. **Annu Rev Ecol Evol S**, 34:487–515.
- Favaroni-Mendes LA, Rocha PLB, Ribeiro MFS, Perry SF, Oliveira ES. 2004. Differences in ingestive balance of two populations of neotropical *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Comp Biochem Physiol A Physiol** 138:327-332.
- Gallardo P, Cortés A, Bozinovic F. 2005. Phenotypic flexibility at the molecular and organismal level allows desert-dwelling rodents to cope with seasonal water availability. **Physiol Biochem Zool** 78, 145–152.
- Helmuth B, Kingsolver JG, e Carrington E. 2005. Biophysics, physiological ecology, and climate change: Does Mechanism Matter?. **Annu Rev Physiol**, 67:177–201.
- Henry M, Cosson J-F, Pons J-M. 2007. Abundance may be a misleading indicator of fragmentation-sensitivity: The case of fig-eating bats. **Biol Conserv** 139(3–4):462-467.
- Jones, MEE, Bradshaw SD, Fergusson B, Watts R. 1990. Effect of available surface water on levels of anti-diuretic hormone (lysine vasopressin) and water and electrolyte metabolism of the Rottneest Island quokka (*Setonix brachyurus*). **Gen Comp Endocrinol**, 77:75–87.
- Karasov WH e Martínez del Rio C. 2009. Physiological Ecology: How animals process energy, nutrients, and toxins. **Princeton University Press**.
- King JM e Bradshaw SD. 2010. Stress in an Island kangaroo? The Barrow Island euro, *Macropus robustus isabellinus*. **Gen Comp Endocrinol**, 167:60–67.
- Laurance WF, Delamonica P, Laurance SG, Vasconcelos HL, Lovejoy TE. 2000. Rainforest fragmentation kills big trees. **Nature**, 404:836.
- Lienert J. 2004. Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations – a review. **J Nat Conserv**, 12:53–72.
- Lindenmayer DB e Fischer J. 2006. Tackling the habitat fragmentation panchreston. **Trends Ecol Evol**, 22(3):127-132.
- Mares MA. 1975. South American mammal zoogeography: evidence from convergent evolution in desert rodents. **P Natl Acad Sci USA** 72(5), 1702–1706.
- Mares MA. 1977. Water economy and salt balance in a South American desert rodent, *Eligmodontia typus*. **Comp Biochem Physiol A** 56:325-332.
- Mares MA, Willig MR, Streilein KE, Lacher Jr TE. 1981. The mammals of Northeastern Brazil: a preliminary assessment. **Ann Carnegie Mus**, 50:81–137.
- Mcewen BS e Wingfield JC. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, v.43(1), p.2-15.

- Mcewen, B. S., Wingfield, J. C., 2010. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. **Horm Behav**, 57:105-111.
- McNab BK. 2002. The physiological Ecology of Vertebrates: A view from energetics. Ithaca, NY, **Cornell University Press**.
- Melo FPL, Dirzo R, Tabarelli M. 2006. Biased seed rain in forest edges: evidence from the Brazilian Atlantic forest. **Biol Conserv**, 132:50–60.
- Metzger JP. 2000. Tree functional group richness and landscape structure in a Brazilian tropical fragmented landscape. **Ecol Appl**, 10:1147–1161.
- Metzger JP, Martensen AC, Dixo M, Bernacci LC, Ribeiro MC, Teixeira AMG, Pardini, R. 2009. Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic forest region. **Biol Conserv**, 142:1166–1177.
- Michalski F, Nishi I, Peres CA. 2007. Disturbance-mediated drift in tree functional groups in Amazonian forest fragments. **Biotropica**, 39:691–701.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Natura**, 403:853-858.
- Nielsen S, Know T, Dimke H, e Frøkiær J. 2008. Aquaporin Water Channels in Mammalian Kidney. In: Seldin And Giebisch's The Kidney, 4<sup>a</sup> Edição, Alpern, R. J. Hebert, S.C. (eds.), 1095-1121, Academic Press.
- Olifiers N, Gentile R, e Fiszon J. 2005. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the brazilian atlantic forest. **Braz J Biol**, 65(3):495-501.
- Oliveira MA, Grillo AS, Tabarelli M. 2004. Forest edge in the Brazilian Atlantic forest: drastic changes in tree species assemblages. **Oryx**, 38:389–394.
- Pardini R. 2004. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. **Biodivers Conserv**, 13:2567-2586.
- Pardini R, Souza SM, Braga-Neto R, Metzger JP. 2005. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. **Biol Conserv**, 124:253-266.
- Pardini R e Umetsu F. 2006. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande – distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. **Biota Neotrop**. v.6(2).
- Pardini R, Bueno AA, Gardner TA, Prado PI, Metzger JP, Fenton B. 2010. Beyond the Fragmentation Threshold Hypothesis: Regime Shifts in Biodiversity Across Fragmented Landscapes. **Plos One**, 5:e13666.
- Peinke DM, e Brown CR. 1999. Osmoregulation and water balance in the springhare (*Pedetes capensis*). **J Comp Physiol B**, 169:1–10.
- Pinotti BT. 2010. Pequenos mamíferos terrestres e a regeneração da Mata Atlântica: influência da estrutura do habitat e da disponibilidade de alimento na recuperação da fauna. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.
- Ranta P, Blom T, Niemelä J, Joensuu E, Siitonen M. 1998. The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. **Biodivers Conserv** 7:385–403.

- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biol Conserv**, 142:1141-1153.
- Ribeiro MFS, da Rocha, PLB, Mendes LAF, Perry SF, de Oliveira, ES. 2004. Physiological effects of short-term water deprivation in the South American sigmodontine rice rat *Oligoryzomys nigripes* and water rat *Nectomys squamipes* within a phylogenetic context. **Can J Zoolog**, 82:1326–1335.
- Romero LM. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends Ecol Evol**, 19(5):249-255.
- Sands JM e Layton HE. 2008. The Urine Concentrating Mechanism and Urea Transporters. In: Seldin And Giebisch's The Kidney, 4<sup>a</sup> Edição, Alpern, R. J. Hebert, S.C. (eds.), pp: 1143-1178, Academic Press.
- Santos BS, Peres CA, Oliveira MA, Grillo A, Alves-Costa CP, Tabarelli M., 2008. Drastic erosion in functional attributes of tree assemblages in Atlantic forest fragments of northeastern Brazil. **Biol Conserv**, 141:249–260.
- Schmidt-Nielsen K. 2002. Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente. 5.<sup>a</sup> Edição. Editora Santos.
- Tabarelli M, Mantovani W, Peres CA. 1999. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biol Conserv**, 91:119-127.
- Tabarelli M, Cardoso da Silva JM, e Gascon C. 2004. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of Neotropical forests. **Biodivers Conserv**, 13:1419–1425.
- Umetsu F e Pardini R. 2007. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats: evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. **Landscape Ecol**, 22:517-530.
- Umetsu F, Metzger JP, Pardini R. 2008. The importance of estimating matrix quality for modeling species distribution in complex tropical landscape: a test with Atlantic forest small mammals. **Ecography**, 31:359–370.
- Walker BG, Boersma PD, e Wingfield JC. 2005. Field endocrinology and conservation biology. **Integr Comp Biol**, 45(1):12-18.
- Walsberg GE. 2000. Small mammals in hot deserts: some generalizations revisited. **Bioscience**, 50:109-120.
- Walsberg GE. 2003. How useful is energy balance as a overall index of stress in animals? **Horm Behav**, 43:16–17.
- Wikelski M e Cooke SJ. 2006. Conservation physiology. **Trends Ecol Evol**, 21:38–46.
- Williams JB, Anderson MD, Richardson PRK. 1997. Seasonal differences in field metabolism, water requirements, and foraging behavior of Free-living aardwolves. **Ecology**, 78(8):2588–2602.