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

Fisiologia térmica e balanço hídrico em anfíbios anuros

RAFAEL PARELLI BOVO

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

Mai - 2015

RAFAEL PARELLI BOVO

Fisiologia térmica e balanço hídrico em anfíbios anuros

Orientador: Denis Otávio Vieira de Andrade

Co-orientador: Carlos Arturo Navas

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

Rio Claro

2015

597.6 Bovo, Rafael Parelli
B783f Fisiologia térmica e balanço hídrico em anfíbios anuros /
Rafael Parelli Bovo. - Rio Claro, 2015
135 f. : il., figs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Denis Otavio Vieira de Andrade
Coorientador: Carlos Arturo Navas

1. Anfíbios. 2. Ecofisiologia. 3. Altitude. 4.
Quitridiomicose. 5. Atividade diurna. 6. Tolerância térmica. I.
Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FISILOGIA TÉRMICA E BALANÇO HÍDRICO EM ANFÍBIOS ANUROS

AUTOR: RAFAEL PARELLI BOVO


ORIENTADOR: Prof. Dr. DENIS OTAVIO VIEIRA DE ANDRADE

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ARTURO NAVAS IANNINI


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


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

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


Prof. Dr. CÉLIO FERNANDO BAPTISTA HADDAD
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. FERNANDO RIBEIRO GOMES
Departamento de Fisiologia / Universidade de São Paulo


Prof. Dr. SIDNEY FEITOSA GOUVEIA
Departamento de Ecologia / Universidade Federal de Sergipe

Data da realização: 22 de maio de 2015.

Dedico esta tese aos meus pais,
José e Maria.



“O mundo não está interessado nas
tempestades que você encontrou.
Querem saber se trouxe o navio de
volta.”
—William McFee

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para que eu pudesse cumprir todas as etapas deste Doutorado, incluindo a redação da presente tese.

Agradeço primeiramente aos meus pais por tudo. Faltam palavras para descrever o apoio, suporte e amor incondicionais que recebi da minha família (incluindo minha irmã), os quais garantiram tranquilidade suficiente para me dedicar a este trabalho nestes últimos quatro anos. O novo membro familiar, meu sobrinho Caio, também foi combustível motivacional nessa jornada, trazendo luz e alegria para nossas vidas, minha e de minha família.

Ao Denis Andrade pela amizade, oportunidade, supervisão, confiança depositada, inspiração, paciência e motivação fundamentais em cada etapa deste trabalho. Sua conduta correta, coerente, e o dinamismo em solucionar problemas são exemplo para todos a sua volta.

Ao Carlos Navas pelas discussões que invariavelmente abrem novas percepções sobre os paradigmas envolvendo os assuntos abordados.

Ao Célio Haddad pelas portas sempre abertas de seu laboratório e pelo empréstimo de parte da sala de manutenção dos animais, essenciais para a realização deste estudo.

Ao Itamar Martins, que prontamente se dispôs a auxiliar nos trabalhos de campo na Serra da Mantiqueira e foi fundamental para a coleta de diversos espécimes.

Ao Guilherme Becker pela oportunidade de trabalharmos juntos, possibilitando pesquisa e aprendizado em um novo tema relacionado ao balanço hídrico dos anfíbios no decorrer desta tese.

Ao Guilherme Gomes pelo tempo dispendido na discussão das diversas formas de análise dos dados desta tese. Agradeço também a Thais Condez, que me auxiliou bastante nesta etapa.

Ao Ariovaldo Neto pelo tempo dispensado em auxiliar nas discussões sobre filogenia e análise dos dados.

Ao Braz Titon Jr. pelas discussões ao longo do último ano.

Ao Barry Sinervo pela oportunidade de trabalhar no Sinervo's Lab, oferecendo-me a oportunidade de conhecer pessoas incríveis que me ajudaram muito dentro e fora da Universidade da Califórnia durante minha

estadia nos EUA, em especial Pauline, Mary, Nadj, Carla, Diana e Rob Cooper.

Ao Sidney Gouveia que embarcou mais tardiamente nessa aventura, mas comprou a ideia, esteve sempre disponível em “tempo real” discutindo diversos dos meus resultados, o que me forneceu motivação extra quando eu já estava sem gás.

Ao Rodrigo Penapolense pelos auxílios “informáticos”, colaborações diversas (papers, cafeteira, afanar comida em certa sala do lab., churrascos, etc.) e por discussões acadêmicas e não-acadêmicas (conforme os anos passam, vamos ficando mais ranzinzas, pelo menos eu, e tenho ciência que sobrecarreguei ele em alguns momentos com diversas reclamações sobre muita gente que passou pelo Jacarezário atravancando o cotidiano do lab.).

Agradeço a todos que me ajudaram imensamente no trabalho de campo: Denis Andrade (ajudou pra caramba!), Itamar Martins, Ailton Cascão Neto, Thais Condez, Lucas Azeitona Bandeira, Vanessa Cunha, Eliziane Garcia, Glenn Tattersall, Michel Garey, Lilian Sayuri, Lucas Santos, e mais alguém que eu possa ter esquecido.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Comparada (vulgo Jacalab), Rodrigo Penapolense, Adriana Fuga, Fernanda Centeno, Jussara Chaves, Rodolfo Muzambinho, Ailton Cascão, e mais recentemente Luá e Juliana. Aos colegas de Rio Claro, são muitos, me vem à cabeça por agora Renato Filogonio e Manuel Fourcade.

Batutas sempre batutas, amigos ad eternum.

Ao Brutus Nobreza e Coragem, pelo companheirismo em nossas caminhadas semanais, mas que infelizmente se foi no ano passado deixando saudade eterna.

À Letícia Sueiro por me ensinar constantemente o que é amizade.

À Susan Michelz, companheira dos últimos anos que me desafia diariamente para eu ser uma pessoa melhor.

Peço desculpas se esqueci de agradecer a alguém nominalmente.

Por fim, agradeço à FAPESP pelo suporte financeiro, Bolsa no País (Proc. 10/20061-6) e Bolsa no Exterior (Proc. 14/05624-5).

Obrigado e “vamo que vamo”!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	9
ABSTRACT	10
CONCLUDING REMARKS	11
CAPITULO I – FISILOGIA TÉRMICA EM ANFÍBIOS	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO II – CLIMBING THE ATLANTIC FOREST MOUNTAINS: DO PHYSIOLOGICAL TRAITS OF AMPHIBIANS VARY ALONG ELEVATIONAL GRADIENTS ?	65
ABSTRACT	66
INTRODUCTION	67
MATERIAL AND METHODS.....	69
RESULTS	75
DISCUSSION	77
LITERATURE CITED	82
TABLES	89
FIGURES	92
CAPÍTULO III – RESPONSES OF BRAZILIAN AMPHIBIANS TO AN ENZOOTIC INFECTION OF THE FROG KILLING FUNGUS.....	101
ABSTRACT.....	102
INTRODUCTION	102
MATERIAL AND METHODS.....	102
RESULTS	106
DISCUSSION	107
LITERATURE CITED.....	109
TABLES	113
FIGURE	114

CAPÍTULO IV – IS THE DIURNAL ACTIVITY OF DISPERSING JUVENILE BURROWING FROGS CORRELATED WITH CHANGES IN PHYSIOLOGICAL TRAITS ?	115
ABSTRACT.....	116
INTRODUCTION	117
MATERIAL AND METHODS	118
RESULTS	121
DISCUSSION	121
LITERATURE CITED	124
TABLE.....	131
FIGURES.....	132
 CONCLUSÕES GERAIS.....	 134

RESUMO

Temperatura e disponibilidade de água são fatores que afetam importantemente a ecologia, a fisiologia e o comportamento de anfíbios. Nesse sentido, estes animais necessitam apresentar uma série de características ecofisiológicas que permita a eles lidarem potencialmente com aspectos ambientais desafiadores. Na presente tese, objetivei explorar diferentes tópicos (gradientes ecológicos, doenças e atividade) enfocando a fisiologia térmica e o balanço hídrico de anfíbios. O primeiro capítulo apresenta uma introdução geral abordando um dos temas centrais da presente tese, a fisiologia térmica de anfíbios. Entretanto, este capítulo também explora a inter-relação entre regulação da temperatura corpórea e balanço de água. O segundo capítulo investiga se parâmetros fisiológicos associados à tolerância térmica e ao balanço hídrico, em cinco espécies de anfíbios anuros, variam ao longo de gradientes altitudinais em duas cadeias montanhosas, Serra do Mar e Serra da Mantiqueira, da Floresta Atlântica. O terceiro capítulo examina os potenciais efeitos da quitridiomicose – uma doença emergente causada por fungo, considerada responsável por declínios populacionais e extinções de anfíbios em todo o mundo devido a alterações osmorregulatórias cutâneas – sobre o balanço hídrico e mortalidade de espécies de anfíbios anuros do Brasil. O quarto capítulo investiga se a atividade de dispersão diurna em juvenis do sapo *Dermatonotus muelleri* estaria correlacionada com parâmetros fisiológicos associados à fisiologia térmica e balanço hídrico.

PALAVRAS-CHAVE: ecofisiologia, perda evaporativa de água, resistência ao efluxo de água, reidratação, tolerância térmica, temperaturas críticas, altitude, quitridiomicose, atividade diurna.

ABSTRACT

Temperature and water availability are factors that affect, importantly, the ecology, physiology, and behavior of amphibians. In this sense, these animals need to present a number of ecophysiological characteristics that allows them to cope with potentially challenging environmental features. In this thesis, I aimed to explore different topics (ecological gradients, diseases, and activity) focusing on the thermal physiology and water balance of anuran amphibians. The first chapter presents a general introduction focused on one of the central themes of this thesis, the thermal physiology of amphibians. However, this chapter also explores the inter-relationship between body temperature regulation and water balance. The second chapter investigates whether or not physiological traits associated to thermal tolerances and water balance, in five anuran amphibians, vary along elevational gradients along two mountain ranges, Serra do Mar and Serra da Mantiqueira, in the Brazilian Atlantic Forest. The third chapter examines the potential effects of chytridomycosis – an emerging fungal disease claimed to cause amphibian population declines and extinctions worldwide due to cutaneous osmoregulatory disorders – on the water balance and mortality of anuran species from Brazil. The fourth chapter investigates whether or not the diurnal activity of dispersing juveniles of the burrowing frog, *Dermatonotus muelleri*, might be correlated with physiological traits associated to thermal physiology and water balance.

KEYWORDS: ecophysiology, evaporative water loss, resistance to water efflux, water uptake, thermal tolerance, critical temperatures, altitude, chytridiomycosis, diurnal activity.

INTRODUÇÃO GERAL

O primeiro capítulo desta tese foi idealizado como sendo parte integrante do livro texto “Fisiologia Térmica de Vertebrados” (em preparação). O objetivo foi realizar uma breve introdução geral aos efeitos da temperatura sobre o grupo dos anfíbios. Uma vez que é praticamente impossível discutir a fisiologia térmica em anfíbios de maneira dissociada da manutenção de um balanço de água adequado, redigir aqui neste espaço uma introdução geral seria, em suma, redundante. Portanto, o Capítulo 1 em si já oferece uma introdução geral ao tema central desta tese de doutorado.

O Capítulo 2 investigou se parâmetros fisiológicos associados à tolerância térmica (temperatura crítica mínima e máxima, CTMin e CTMax, respectivamente) e ao balanço hídrico (perda evaporativa de água, resistência da pele e reidratação), em cinco espécies de anfíbios anuros, variam ao longo de gradientes altitudinais em duas cadeias montanhosas, Serra do Mar e Serra da Mantiqueira, da Floresta Atlântica.

O Capítulo 3 examinou os potenciais efeitos da quitridiomicose – uma doença emergente causada por fungo, considerada responsável por declínios populacionais e extinções de anfíbios em todo o mundo devido a alterações osmorregulatórias cutâneas – sobre a mortalidade e o balanço hídrico de três espécies de anfíbios anuros do Brasil.

O capítulo 4, por fim, investigou se a atividade de dispersão diurna em juvenis do sapo *Dermatonotus muelleri*, cujos adultos são noturnos, estaria correlacionada com parâmetros fisiológicos associados à fisiologia térmica (tolerância e metabolismo) e balanço hídrico (perda evaporativa de água, resistência da pele e reidratação).

CAPITULO I

FISIOLOGIA TÉRMICA EM ANFÍBIOS

Rafael P. Bovo¹, Tiana Kohlsdorf² & Denis V. Andrade¹

¹ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP.

² Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Origem, evolução e diversidade dos anfíbios

Todos os anfíbios atuais, ou Lissamphibia, compartilham um ancestral comum e exclusivo e, portanto, formam um clado monofilético. Os primeiros representantes da linhagem da qual os anfíbios modernos, bem como todos os Tetrapoda, evoluíram aparecem no registro fóssil durante o Devoniano, há aproximadamente 400 milhões de anos, a partir de ancestrais sarcopterigeos (peixes de nadadeiras lobadas). Com características intermediárias entre estes e os Tetrapoda primitivos, os panderichthyideos são apontados como o grupo ancestral provável na base da posterior diversificação dos tetrápodes. Ainda no Devoniano há o aparecimento de formas como Acanthostega e Ichthyostega com características definitivamente mais derivadas em direção àquelas posteriormente exibidas pelos anfíbios, mas, muito provavelmente, representando linhagens independentes e paralelas àquelas deste grupo. Já no final do Carbonífero, há aproximadamente 328 milhões de anos, houve uma enorme diversificação das linhagens de Tetrapoda e o surgimento dos Lepospondyli, grupo no qual os Lissamphibia tiveram sua origem. Embora ainda exista bastante controvérsia sobre estas relações basais, é certo que naquele momento os anfíbios já constituíam um clado separado dos restantes (amniota) tetrápodes. Ou seja, a visão largamente difundida dos anfíbios como um grupo transicional entre um ancestral pisciforme e os répteis, embora possa ser válida sob determinadas perspectivas funcionais, é altamente incorreta em termos evolutivos. Anfíbios e demais tetrápodes amniotas (répteis, aves e mamíferos) formam agrupamentos separados experimentando trajetórias evolutivas totalmente distintas há pelo menos 300 milhões de anos (Pyron, 2011).

A diversificação dos grupos modernos de Lissamphibia (i.e., Gymnophiona, Caudata e Salientia) é estimada como tendo ocorrido em um período relativamente curto após o surgimento deste grupo no final do Carbonífero. Neste cenário, os Gymnophiona divergiram basalmente das demais linhagens do grupo por volta de 240 milhões de anos atrás e, logo a seguir, por volta de 230 milhões de anos atrás, os Anura divergiram dos Caudata. Em linhas gerais, estas formas ancestrais já apresentavam características e modo de vida similares aos anfíbios modernos e eram igualmente dependentes do meio aquático, em especial para a reprodução. De fato, a dependência dos anfíbios do meio aquático para a reprodução, com algumas poucas exceções, é uma característica definidora desse grupo como um todo, podendo ser atribuída à ausência do ovo cleidóico (kleidos = fechado). Em contraste, répteis, aves e mamíferos encapsulam o embrião dentro de um micro-cosmos fechado, o ovo, provido de um anexo embrionário, o âmnio, o qual permite que o embrião possa se desenvolver com relativa independência das condições ambientais. Estes amniotas, portanto, podem agora fazer frente ao risco potencial de dessecação no meio terrestre ficando definitivamente livres da dependência do meio aquático para a reprodução, diferentemente do que ocorre com os anfíbios. Outras características que impõem restrições à conquista absoluta do meio terrestre pelos anfíbios incluem a pele altamente permeável à água (também a íons e gases) e, portanto a alta susceptibilidade à perda de água evaporativa (ver Tracy et al., 2014), além da incapacidade dos rins em concentrar a urina acima da concentração osmótica do plasma (implicando na impossibilidade de economizar a água utilizada para a excreção). Desta forma, é lugar comum que os anfíbios sejam apontados como os invasores do meio terrestre (dentro os vertebrados), enquanto a conquista definitiva de tal meio só ocorrerá com o aparecimento dos ancestrais das demais linhagens dos Tetrapoda e o advento do ovo amniótico e dos anexos epidérmicos que permitiram a impermeabilização eficaz do tegumento. Desta forma, os anfíbios representam uma aproximação à vida no ambiente terrestre intrinsecamente diferente das possibilidades exploradas por répteis, aves e mamíferos. Ademais, eles nos fornecem uma janela ímpar para apreciar os problemas potenciais enfrentados pelos primeiros vertebrados a se aventurarem no meio terrestre.

Características gerais

Grosso modo, os vertebrados podem ser divididos (sem rigor filogenético) em ecto (peixes, anfíbios e répteis) ou endotérmicos (aves e mamíferos), na dependência da origem do calor utilizado na regulação da **temperatura corpórea (T_c)**. Animais ectotérmicos dependem primordialmente de fontes externas de calor e de ajustes comportamentais para a regulação da T_c. Isto difere daquilo que ocorre em aves e mamíferos, nos quais a produção metabólica de calor é um dos fatores centrais na regulação da T_c. Duas consequências básicas podem ser relacionadas ao modo de termorregulação: 1 – ectotérmicos apresentam níveis metabólicos que são substancialmente menores do que aqueles apresentados por endotérmicos e; 2 – ectotérmicos podem ter suas atividades restringidas por limitações espaciais e/ou temporais de nichos térmicos adequados. Ademais, em consonância com a menor demanda energética, o sistema cardiorrespiratório dos vertebrados ectotérmicos é menos eficiente em termos de transporte rápido de quantidades grandes dos gases respiratórios e é maior sua dependência da geração anaeróbica de energia para suportar o requerimento ocasional de níveis elevados de atividade (Bennet, 1978; Gatten et al., 1992; Pough, 1980, 1983; Pough et al., 2001).

Pela rica diversidade de espécies encontradas em praticamente todos os habitat do planeta e modos de vida ricamente diversificados, é quase inegável que os anfíbios constituem um grupo ainda pouco explorado, porém, com enorme potencial para estudos em biologia térmica. Ademais, uma vez que a temperatura exerce efeitos importantes sobre virtualmente todos os aspectos da vida dos anfíbios (bem como sobre qualquer outro organismo, vide este livro), o estudo das relações térmicas destes animais é essencial para o entendimento de suas interações ecológicas, de seu comportamento e de suas respostas fisiológicas. A regulação da T_c em anfíbios é obviamente regida pelas leis da termodinâmica comuns a qualquer processo no qual ocorra troca de calor. Porém, a forma como diferentes espécies, muitas vezes encontradas em ambientes com propriedades térmicas díspares, modulam esta troca de calor resulta em uma riqueza estonteante de especializações, muitas das quais insuspeitas ou mesmo ainda desconhecidas (Hutchison e Dupré, 1992). Dentro de uma abordagem taxonômica ampla, excelentes revisões sobre a biologia térmica dos anfíbios podem ser encontradas em Feder e Burggren (1992), Hillman et al. (2009) e Wells (2007), enquanto Angilletta (2009) oferece um panorama teórico e empírico muito útil para situar

estudos sobre biologia térmica. No presente capítulo, buscamos o modesto objetivo de oferecer uma apreciação ampla e introdutória sobre a diversidade e a complexidade das relações térmicas dos anfíbios, sem pretensão de esgotar este tema. Em complemento a esta abordagem, o outro ponto focal deste capítulo será direcionado às consequências da variação da T_c sobre diferentes funções relevantes para aptidão dos anfíbios.

Balanço térmico e trocas de calor

A temperatura corpórea de um animal resulta do balanço térmico entre o animal e o ambiente, o qual pode levar tanto ao ganho quanto à perda de energia térmica, acrescido do calor metabolicamente produzido (i.e., termogênese). A troca de calor entre dois corpos pode ocorrer por condução, condução combinada com convecção, radiação e evaporação ou condensação, i.e., mudanças de fase (Figura 1). Porém, a importância relativa de cada uma destas formas de troca de calor irá variar na dependência das características particulares dos animais e do ambiente em consideração. Assim, abaixo, examinamos cada um dos componentes do balanço térmico destacando sua potencial contribuição para a regulação da T_c dos anfíbios.

Calor metabólico

Como comentado anteriormente, ectotermia e patamares relativamente modestos de atividade metabólica ocorrem de maneira indissociável e possuem implicações importantes para o balanço térmico dos anfíbios. Anfíbios possuem taxas metabólicas próximas daquelas de peixes e répteis, as quais são ordens de magnitude menor do que as encontradas nas aves e nos mamíferos (Gatten et al., 1992; Gillooly et al., 2001; White et al., 2006). Como consequência, a produção de calor metabólico pelos anfíbios pode ser considerada desprezível em termos de potencial para modificar a T_c destes animais (Fromm, 1956; Hillman et al., 2009). No entanto, eventuais incrementos transitórios da taxa metabólica podem aumentar a contribuição da produção endógena de calor a ponto de influenciar a T_c de um animal ectotérmico. Em répteis, por exemplo, a digestão e a incubação dos ovos por algumas espécies de serpentes, pode levar ao aumento da T_c por termogênese (Hutchison et al., 1966; Tattersall et al., 2004). Nos anfíbios, a atividade que

sabidamente implica em aumentos extremos da taxa metabólica é a vocalização: na rã *Hyla versicolor*, por exemplo, os animais podem experimentar aumentos estimados em até 30 vezes acima da taxa metabólica de repouso (Wells e Taigen, 1986). No entanto, incrementos da taxa metabólica devido à vocalização parecem não impactar a Tc dos anfíbios. Por exemplo, embora machos vocalizantes da rã *Hyperolius marmoratus* exibam uma Tc cerca de 3°C acima da temperatura do ar, esta mesma diferença é também encontrada para as fêmeas não-vocalizantes. Ou seja, este diferencial térmico entre o animal e o ambiente não está relacionado à produção metabólica de calor, mas muito provavelmente deve envolver diferenças na dinâmica da troca de calor entre os animais e os vários elementos do seu entorno (ver Passmore e Malherbe, 1985).

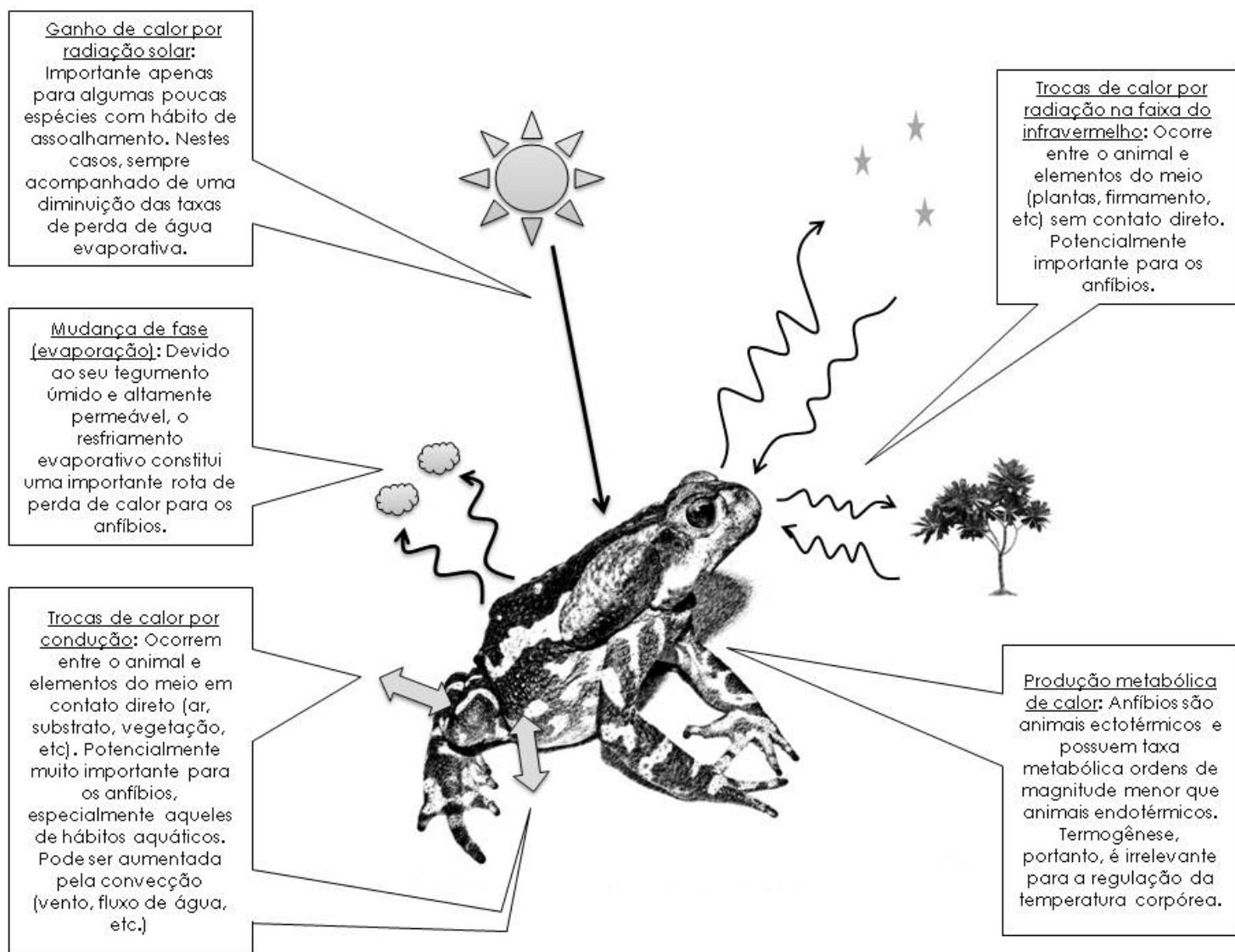


Figura 1. Modos de troca de calor e comentários sobre a importância relativa de cada via para os anfíbios, em geral.

Mudança de fase: condensação e evaporação

Outro aspecto bastante particular dos anfíbios no que tange ao balanço térmico e troca de calor está intimamente associado ao tegumento altamente permeável e susceptível à perda evaporativa de água. A água, ao ser vaporizada na superfície da pele permanentemente úmida dos anfíbios, na verdade sobre qualquer superfície, requer o aporte de calor para que a mudança de fase, líquido para gás, ocorra. Este calor latente é removido do próprio líquido e dos corpos em contato com ele promovendo um resfriamento evaporativo que faz com que a temperatura superficial dos anfíbios esteja, quase sempre, algo abaixo da temperatura ambiente (Figura 2a) . Portanto, a perda de água por meio da evaporação na superfície do corpo constitui uma importante, ainda que incidental, via de perda de calor para a maioria dos anfíbios. Esta perda evaporativa de água e concomitante resfriamento é uma função tanto da temperatura quanto da umidade relativa do ambiente. Quanto maior a temperatura e menor a umidade relativa, maior o potencial para evaporação/resfriamento (ver Wygoda, 1989; Wygoda e Kersten, 2013).

Por outro lado, se um anfíbio for capaz de se expor a mudanças de temperaturas apropriadas em ambientes com alta umidade, há a possibilidade de ocorrer uma mudança de fase na direção contrária da evaporação, ou seja, do vapor de água ser condensado. Recentemente uma resposta deste tipo foi descrita em *Litoria caerulea*, uma espécie de perereca que habita zonas tropicais da Austrália e permanece ativa durante a estação seca do ano. A T_c de *L. caerulea* diminui enquanto o animal encontra-se exposto a diferença de temperatura entre o animal e o abrigo promove a condensação de água sobre a superfície corpórea da perereca, a qual é absorvida e irá contribuir para a manutenção de um balanço de água adequado. Estima-se que a condensação pode contribuir por ganhos de água de aproximadamente 0,9% da massa corpórea de *L. caerulea* e ser uma importante via de aquisição de água em regiões onde não há disponibilidade de água livre por longos intervalos de tempo durante o ano (Tracy et al., 2011). Embora caso em atividade durante a fase noturna, porém, após o cessar das atividades, ela busca abrigo em troncos ocos, nos quais a temperatura e a umidade são mais elevadas. Nestas condições, as similares ao de *L. caerulea* não tenham sido ainda registrados, a condensação na paisagem ocorre de maneira rotineira em muitos biomas, pela formação do orvalho. Ao cair da noite e sob determinadas condições

climáticas, elementos do ambiente podem experimentar uma queda de temperatura mais rápida do que o ar, resultando na formação de orvalho sobre tais elementos (ver Agam e Berliner, 2006), o que pode constituir uma importante via de aquisição de água para pequenos animais. Por exemplo, a perereca *Bokermannohyla alvarengai* é encontrada em campos rochosos da Serra do Cipó, em Minas Gerais, por vezes muito distantes de qualquer fonte de água livre. No entanto, durante a noite a paisagem desta região serrana é coberta por abundante orvalho, o qual, suspeitamos, é de crucial importância para a manutenção do balanço de água desta espécie (Centeno e Andrade, obs. pessoal). Ademais, como *B. alvarengai* possui o hábito de se expor ao sol durante o dia (Figura 2b), situação potencialmente estressante do ponto de vista hídrico, a água ganha do orvalho durante a noite pode ser de crucial importância para um adequado balanço térmico durante o dia. Estudos quantitativos sobre a importância da condensação para o balanço de água e as relações térmicas dos anfíbios são claramente necessários.

Radiação

O alto potencial para resfriamento evaporativo devido ao tegumento úmido dos anfíbios também cria conflitos para o ganho de calor pela exposição direta à radiação solar. Este comportamento de assoalhar constitui uma via importante para ganho de calor para os répteis, em especial para os lagartos. No entanto, a exposição ao sol de um animal de pele úmida resultaria em um aumento do risco de desidratação e, devido ao resfriamento evaporativo, pouco (ou nenhum) ganho de calor ocorreria (Figura 2a). Desta forma, apenas um grupo bastante restrito de anfíbios é conhecido por fazer uso do comportamento de assoalhar. Em todos estes casos, o assoalhamento é sempre acompanhado por uma redução significativa das taxas de perda de água evaporativa diminuindo ou cancelando o conflito entre resfriamento evaporativo e ganho de calor, descrito acima (ver Tracy et al., 2010) (Figura 2b). Na perereca *Phyllomedusa sauvagii*, por exemplo, a pele é impermeabilizada por uma cera produzida por glândulas lipídicas da pele, a qual o animal espalha com os pés e mãos por todo o corpo em um comportamento bastante elaborado chamado de “*whipping*” (Blaylock et al., 1976). Assim, uma vez impermeabilizada, *P. sauvagii* pode ganhar calor rapidamente do meio, no entanto, conforme a temperatura aumenta, o problema agora pode ser o risco de hipertermia. Como o animal agora encontra-se impermeabilizado, ele não pode ser resfriado pela

evaporação na pele, e como os anfíbios não tem glândulas sudoríparas eles também não podem transpirar e tampouco são conhecidos por ofegarem (mecanismos que outros animais empregam para diminuir a T_c). Porém, conforme a T_c aumenta acima dos 35–37°C, glândulas presentes na pele destas pererecas, possivelmente glândulas mucosas, começam a produzir uma secreção que coalesce em gotículas de água sobre a superfície da pele e são rapidamente evaporadas (ver Lillywhite e Licht, 1975). Desta forma, a perda de água evaporativa, nestas situações de altas temperaturas, sofre um aumento abrupto acompanhado de uma diminuição nas taxas de ganho de calor. Ou seja, o animal sacrifica a economia de água para prevenir um aumento descontrolado da T_c de maneira análoga à nossa transpiração. Além de *P. sauvagii*, tais respostas foram ainda descritas para *P. azureae*, *Chiromantis xerampelina* (ver Figuras 5 e 6 de Shoemaker et al., 1987) e *Hyperolius viridiflavus* (Geise e Linsenmair, 1986).

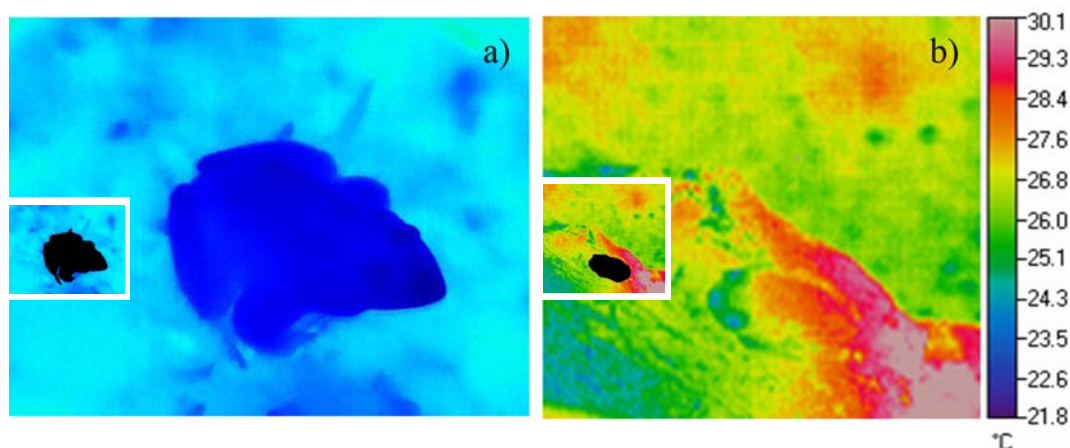


Figura 2. Imagem termográfica (a) de uma rã, *Leptodactylus latrans*, susceptível a alta taxa de evaporação cutânea tipicamente encontrada nos anfíbios e (b) de uma perereca, *Bokermannohyla alvarengai*, espécie conhecida pelo hábito de assoalhar e pela baixa permeabilidade da pele. Repare que o resfriamento evaporativo torna *L. latrans* mais fria que o ambiente no entorno; por outro lado, as baixas taxas de evaporação de *B. alvarengai* permitem o ganho de calor durante o assoalhamento. *Insets* indicam o contorno e a posição dos animais na figura maior.

Como cerca de 50% da energia radiante do sol que atinge o nosso planeta cai dentro do espectro visível, a quantidade de energia eletromagnética absorvida/refletida por um animal assoalhando será influenciada por sua coloração. Em linhas gerais, cores mais escuras possuem maior capacidade de absorção em comparação com cores mais claras. Desta forma, a magnitude da absorção de calor

durante a exposição ao sol pode ser modulada pela mudança fisiológica na coloração da pele. Esta resposta foi descrita em *Hyla versicolor* (Edgren, 1954), *Rana clamitans* (Porter, 1972), *Agalychnis dacnicolor* (Iga e Bagnara, 1975) e *Bokermannohyla alvarengai* (Tattersall et al., 2006), e em todas elas os animais tornam-se marcadamente embranquecidos quando expostos ao sol. Em *B. alvarengai*, a mudança fisiológica de cor ocorre em antecipação a qualquer alteração de temperatura parecendo ser uma resposta primariamente mediada pela exposição à luz e pouco influenciada pela coloração de fundo (Tattersall et al. 2006, Figura 3). Embora a mudança fisiológica de cor seja comumente associada à termorregulação, outros fatores podem estar envolvidos. Por exemplo, em *Hyperolius viridiflavus*, ocorre uma aceleração na deposição dos iridóforos presentes na pele quando os animais são privados de água. Como os iridóforos são primariamente constituídos de guanina (80-90%), a sua deposição além de melhorar as propriedades de reflexão de luz da pele, pode ter também um papel relevante como forma de acúmulo de produtos de excreção (Withers et al., 1982; Kobelt e Linsenmair, 1986; Schmuck e Linsenmair, 1988). Em outras espécies, a alteração de cor pode ser um componente importante para a reprodução e/ou conferir camuflagem contra predadores visualmente orientados (ver Rudh e Qvarnström, 2013). Em algumas espécies que assoalham sobre rochas, a coloração do animal, escura ou clara, o confunde com a coloração de fundo, rochas ou líquens, respectivamente, encontrados no ambiente (Tattersall et al., 2006; Figura 3). O comportamento de assoalhar parece ser particularmente comum em espécies encontradas em regiões de altitude auxiliando-as no alcance de temperaturas compatíveis com a atividade, a despeito das temperaturas relativamente frias destes ambientes (veja Wells, 2007), embora não seja totalmente imprescindível para sua ocupação (Navas, 1996a; 2003). Já no ambiente arbóreo, algumas espécies de pererecas de coloração verde possuem um pigmento bastante incomum denominado de pterodina (*pterorhodin*) o qual causa um escurecimento da pele na faixa do visível ao mesmo tempo em que reflete fortemente os comprimentos de onda na faixa do infravermelho próximo (Bagnara et al., 1978). Desta forma, estes animais conseguem conjugar a camuflagem tanto na faixa do visível como no infravermelho próximo, uma vez que as plantas ocupadas por eles apresentam perfil de reflectância bastante similar, ao mesmo tempo em que evitam a absorção excessiva de energia radiante na faixa do infravermelho próximo (Buttermer et.al., 1996). Por outro lado, um animal que

usasse o pigmento mais comumente encontrado para o escurecimento da pele, a melanina, poderia tornar-se conspícuo na faixa do infravermelho próximo e obrigatoriamente absorveria a maior parte da energia radiante desta faixa de comprimentos de onda.

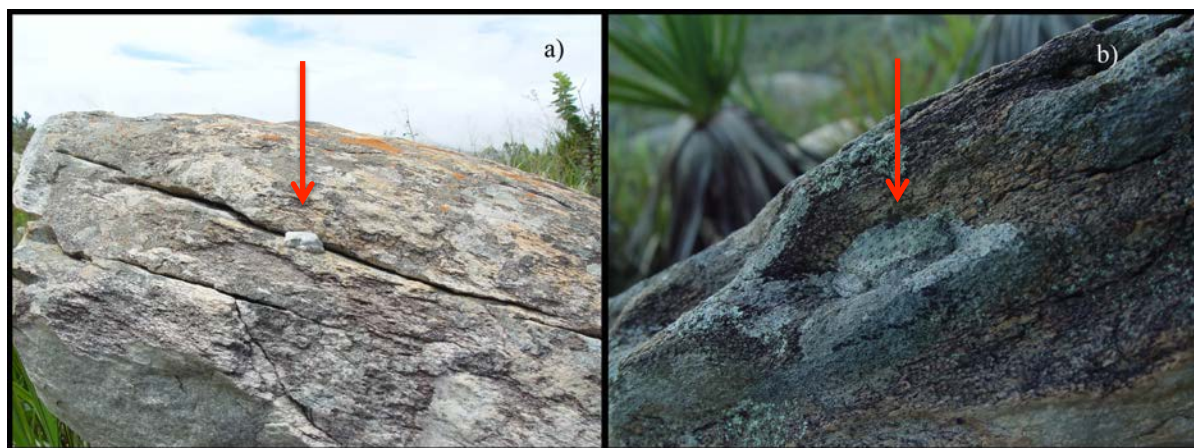


Figura 3. Mudança fisiológica de cor na perereca *Bokermannohyla alvarengai*. Em a) indivíduo assoalhado exibindo coloração esbranquiçada. Em b) indivíduo exibindo coloração cinza mosqueada. Em ambos os casos, o animal encontra-se igualmente bem camuflado.

Se a troca de calor via exposição direta à radiação solar é pouco importante para a maioria dos anfíbios (também pelo fato deles geralmente passarem o dia abrigados e serem ativos durante a noite), a troca inescapável de calor radiativo entre o animal e os outros elementos do ambiente constitui uma importante determinante da T_c dos anfíbios. Qualquer corpo com temperatura acima do zero absoluto (-273°C) emite radiação eletromagnética em razão de sua temperatura superficial à quarta potência e emissividade (ver Capítulo 2). Ou seja, a todo momento, um anfíbio qualquer estará ao mesmo tempo emitindo e recebendo energia radiante de outros corpos ao seu redor, podendo resultar em ganho ou perda de calor. A emissividade (e a absorvidade) de materiais biológicos, também válida para os anfíbios, varia de 0,95 a 1, significando que de 95 a 100% da radiação infravermelha emitida tem como origem o próprio animal (e não o reflexo da radiação incidente originada em outros corpos/objetos do ambiente) e também que 95 a 100% da radiação IR incidente é absorvida pelos animais. Como nas temperaturas

experimentadas pelos animais toda a emissão de radiação eletromagnética ocorre na faixa do infravermelho e, portanto fora do espectro visível, a cor da pele obviamente não possui relação com a emissividade dos animais (ver Nussear et al., 2000).

A troca de calor por radiação na faixa do infravermelho é influenciada pela presença de água na atmosfera, na forma de gotículas ou vapor, a qual atenua consideravelmente a propagação da radiação infravermelha através do ambiente. Por exemplo, um anfíbio exposto no ambiente em uma noite clara, sem nuvens, experimentará uma troca de calor radiativo com as camadas mais distantes da atmosfera, o que, nestas condições, pode se traduzir em comprimentos de onda equivalentes a aproximadamente 20°C abaixo da temperatura do ar ao redor do animal. Porém, para a mesma temperatura do ar, em uma noite com nuvens ou com muita neblina, esta diferença pode cair para entre 10 e 5°C apenas (Gates, 1980). Para anfíbios em atividade sob uma área florestada ou sob outros elementos do ambiente que bloqueiem a exposição direta ao firmamento, as trocas de calor radiativo ocorrerão na dependência da temperatura superficial destes elementos. Via de regra, como as temperaturas destes elementos são mais elevadas que a do firmamento, em geral próximas da temperatura do ar, isto pode representar uma diminuição da perda de calor radiativo. Enfim, a atividade em noites mais úmidas, na proximidade de corpos de água ou em locais abrigados, diminui não apenas o risco de perda excessiva de água pela evaporação cutânea, fator sempre relevante para os anfíbios, mas pode também contribuir para minimizar a perda de calor através da radiação para camadas mais distantes (e frias) da atmosfera.

Condução

A próxima avenida de troca de calor importante para os anfíbios é a transferência direta da energia cinética entre as partículas constituintes de dois corpos em contato, ou seja, pela condução. Esta via é conceitualmente bastante simples e depende da área de superfície em contato, do gradiente térmico entre os corpos em contato e da facilidade com que o calor é transmitido pelos diferentes tipos de materiais, ou seja da condutibilidade (ver capítulo 2). Como a transferência de calor por condução depende da interação direta entre partículas adjacentes, materiais cujas partículas constituintes estejam mais próximas entre si, i.e., materiais de maior densidade conduzirão calor com maior facilidade. Desta forma, em termos

gerais, a condutibilidade dos sólidos é maior do que a dos fluídos que por sua vez é maior que a dos gases. Além da densidade, a condutibilidade térmica ainda é afetada pela temperatura *per se* e pela natureza das ligações moleculares dos materiais. A troca de calor por condução pode ocorrer entre o animal e o substrato (solo, vegetação, etc.), entre o animal e água, no caso de espécies aquáticas, e entre o animal e o ar. Assim, pelos motivos comentados acima, anfíbios aquáticos possuem poucas possibilidades de controlar a Tc em valores diferentes daquele da água circundante. De fato, a troca de calor por condução na água ocorre cerca de 24 vezes mais rapidamente do que no ar, sob as mesmas condições. Ademais, esta situação pode ser ainda mais acentuada em ambientes de água corrente como riachos, nos quais a troca de calor por condução é conjugada com a convecção do meio. De modo similar ao que ocorre no meio aquático, a troca de calor de anfíbios com hábito fossorial também é dominada pela condução e deve resultar em Tc's diferindo minimamente da temperatura ambiente. É fato, porém, que o comportamento termorregulador e a dinâmica da troca de calor em espécies de anfíbios aquáticos e fossoriais permanecem praticamente desconhecidos (Spotila et al., 1992).

Uma situação totalmente dominada pelas trocas de calor por condução e na qual a regulação da Tc assume importância vital é o caso de espécies aquáticas ou semi-aquáticas, as quais atravessam o inverno aprisionadas sob uma camada de gelo em lagos nas regiões de alta latitude da América do Norte. Nestas situações, os animais enfrentam uma série de desafios importantes como a baixa disponibilidade (hipóxia) ou mesmo a total ausência (anóxia) de oxigênio, o risco fatal de congelamento, a necessidade de regular o balanço energético e considerações ecológicas, por exemplo, risco de predação. Durante o tempo gasto sob o gelo, os animais devem integrar todos estes fatores de forma a garantir a sobrevivência até o degelo na primavera. Por exemplo, a exposição à hipóxia faz com que rãs, bem como outros animais, busquem ambientes mais frios, uma resposta comumente referida como queda regulada da Tc induzida por hipóxia. Em rãs submersas na água, esta resposta pode resultar em uma queda de até 5°C na Tc o que, por sua vez, representa uma redução da ordem de 70% da taxa metabólica (Tattersall e Boutilier, 1997). Assim, a simples escolha de um ambiente mais frio permite uma redução do gasto energético altamente relevante para animais com reservas energéticas finitas e que não são renovadas durante o intervalo de tempo sob o

gelo. Ademais, a redução do gasto metabólico também reduz a necessidade em potencial dos animais incorrerem em anaerobiose. Embora estas considerações façam sentido em termos funcionais e tenham sido demonstradas de forma convincente em estudos realizados em laboratório, é ainda bastante discutível até que ponto a queda de T_c induzida pela hipóxia constitui uma resposta primariamente termorreguladora ou represente uma mera consequência da busca por concentrações adequadas de oxigênio, pelo menos em anfíbios. Ademais, a relevância desta resposta termorreguladora sob estas condições de aprisionamento sob o gelo invernal é igualmente questionável (Tattersall e Ultsch, 2008).

De fato, as variáveis ambientais e as respostas das rãs podem ser bem mais complexas sob condições naturais do que aquelas simuladas em laboratório. Por exemplo, mesmo aprisionadas sob o gelo invernal, as rãs tendem a se locomover em direção a áreas de temperatura mais elevada, o que parece não fazer sentido com os resultados e considerações energéticas comentados acima. Porém, estas áreas mais quentes são também presumivelmente as áreas de melhor oxigenação, sendo novamente difícil de separar uma resposta puramente termorreguladora daquela associada à disponibilidade do oxigênio. Ademais, vários aspectos ecologicamente relevantes podem ser favorecidos pela tendência em buscar temperaturas mais quentes. Em primeiro lugar, como as espécies que atravessam o inverno sob o gelo, no meio aquático, não são tolerantes ao congelamento, é de vital importância que elas evitem o risco potencial de congelamento e, obviamente, este risco será menor quanto maior for a temperatura. Em segundo lugar, águas mais quentes podem servir como pistas ambientais de áreas de degelo servindo de orientação para a retomada das atividades pelos animais no início da primavera. Finalmente, temperaturas mais elevadas podem favorecer o desempenho das rãs em resposta a fatores externos como risco de predação, por exemplo (Tattersall e Boutilier, 1999; Tattersall e Ultsch, 2008).

Balanço térmico e balanço de água

Dentre os vertebrados ectotérmicos, os anfíbios foram tradicionalmente relegados a um plano secundário em comparação com os répteis, especialmente os lagartos, em estudos de biologia térmica. Em grande parte devido a sua labilidade no controle da T_c , a termorregulação dos anfíbios pode passar uma primeira impressão de ser desinteressante, pois, em geral, uma regulação ativa da T_c não é

aparente e sua temperatura é, quase sempre, pouco diferente da temperatura do ambiente. A regulação da Tc em anfíbios, porém, envolve a interação com outras funções absolutamente relevantes de forma muito mais íntima do que pode ser encontrada em outros grupos animais. Por exemplo, os casos ilustrados acima e discutidos adiante deixam claro que é impossível pensar em termorregulação em anfíbios de maneira dissociada da manutenção de um balanço de água adequado. Interações deste tipo adicionam uma dimensão de complexidade cientificamente estimulante que, associada à alta diversidade de espécies e modos de vida encontrados neste grupo, apontam para o fato de que o potencial para estudos em biologia térmica em anfíbios tem sido largamente subestimado. Situação que, felizmente, vem sendo revertida em anos recentes.

Termorregulação

Desenvolvimento conceitual

Os vertebrados endotérmicos, aves e mamíferos, tratados em outras seções deste livro, normalmente mantém uma Tc relativamente alta e constante. Em contraste, vertebrados ectotérmicos, anfíbios incluídos, dependem primariamente da exploração de fontes externas de calor e, por este motivo, geralmente experimentam uma variação bastante ampla da Tc. Esta variação pode ocorrer ao longo do ciclo circadiano, sazonalmente, ou mesmo no decurso de algumas poucas horas e é largamente ditado por contingências ambientais, i.e., disponibilidade de nichos térmicos. Por estes motivos, historicamente acreditou-se que os animais ectotérmicos, os então chamados animais de sangue-frio, não apresentavam qualquer mecanismo para a regulação da Tc. Tal paradigma permaneceu vigente até que os estudos pioneiros de Cowles e Bogert (1944) demonstraram que répteis encontrados em zonas áridas da América do Norte eram capazes de regular a Tc, primariamente por meio do comportamento. Esta quebra de paradigma conduziu a duas derivações lógicas que logo começaram a ser exploradas com crescente rigor científico: 1- se os animais investem tempo e energia na regulação da Tc é porque sua temperatura deve afetar de maneira importante funções ecologicamente relevantes e, em última instância, a aptidão (tema retomado em seção adiante) e; 2 – se existe uma regulação da Tc, isso pressupõe a existência de um ponto de ajuste (*setpoint*) para o qual os mecanismos de regulação da Tc devem convergir. Este

ponto de ajuste é comumente referido em termos de preferência térmica, temperatura preferencial, ou mais comumente como temperatura corpórea preferida (Hutchison e Dupré, 1992), geralmente determinada em um ambiente artificial onde o custo termorregulador seja inexistente, i.e., em um gradiente térmico. Neste gradiente, os animais são monitorados quanto a sua preferência térmica e o cálculo das Tc's mais frequentes ou mais apropriadamente o intervalo determinado entre um valor mínimo e máximo, é denominado como a temperatura corpórea preferida (T_{pref}). A T_{pref} fornece um parâmetro balizador contra o qual as temperaturas experimentadas pelos animais na natureza podem ser comparadas. Ademais, ela consiste em um atributo organismal consistente que emerge de um controle neural subjacente aos mecanismos de regulação da Tc e independente (idealmente) de contingências externas. A T_{pref} constitui, portanto, um caráter de enorme relevância para o entendimento da biologia térmica sob uma perspectiva ecológica e evolutiva (Hertz et al., 1993).

Em um primeiro momento após a contribuição de Cowles e Bogert (1944), os estudos dedicados à termorregulação em vertebrados ectotérmicos consistiram de um acúmulo enciclopédico de valores de Tc de diferentes espécies, em sua maioria répteis Squamata, registrados quase sempre de maneira pouco criteriosa (para os padrões atuais) e, quando muito, equacionadas contra a temperatura do ar. Foram necessários mais 20 anos para que Heath (1964) demonstrasse que as propriedades físicas de diferentes materiais (e.g., ar, lagartos, sapos, ou no caso do estudo de Heath, latas de cerveja cheias de água) podem gerar diferenças significativas em temperatura que não necessariamente implicam na existência de uma regulação da temperatura (como obviamente era o caso das latas de cerveja). Esta contribuição de Heath culminou na adoção de modelos térmicos que simulam as propriedades físicas envolvidas na troca de calor entre o animal em estudo e o ambiente. Desta forma, o ambiente térmico pode ser amostrado de maneira independente de vieses externos ao organismo em estudo, ou seja, podemos determinar a temperatura operativa que determinado animal teria sob um determinado conjunto de condições no caso de não estar termorregulando. Ademais, a distribuição de frequência de temperaturas operativas amostradas de maneira sistemática e não direcionada em campo fornecem um modelo nulo sobre o qual os valores de Tc dos animais podem ser comparados. Dentro dessa abordagem, quanto maior o desvio entre a distribuição de frequência das temperaturas corpóreas

dos animais da distribuição de frequência da temperatura operativa, mais forte é a evidência de que os animais estão termorregulando ativamente. Mas quão bem eles estão termorregulando? Qual a acurácia, precisão e a efetividade da termorregulação? Estas questões apenas recentemente puderam ser abordadas pelo desenvolvimento dos índices térmicos por Hertz et al., (1993) e posteriores modificações (e.g., Christian e Weavers, 1996; Blouin-Demers e Weatherhead, 2001). Não iremos aqui explorar os detalhes destes índices e a racionalização por trás do seu desenvolvimento (ver Hertz et al., 1993). Basta aqui destacar que estes autores foram capazes de situar a T_c dos animais amostrada na natureza dentro de um sistema elegante, biologicamente relevante e matematicamente sólido que incorpora valores de temperatura corpórea preferida e temperatura operativa. Com estes índices passou a ser possível expressar a qualidade térmica do ambiente, a efetividade e a acurácia da termorregulação por meio de indicadores que podem ser objetivamente comparados entre diferentes espécies e situações. O desenvolvimento dos índices termorregulatórios certamente nos fornece o paradigma mais robusto no qual podemos situar estudos de biologia térmica.

Este desenvolvimento histórico dos estudos em biologia térmica que acabamos de comentar brevemente, muito possivelmente estaria melhor situado no próximo capítulo deste livro, naquele dedicado aos répteis. Grupo este que, de fato, serviu como a matéria prima fundamental para que esse desenvolvimento ocorresse. Sob muitos aspectos, os estudos sobre a termorregulação em anfíbios ainda consistem na coleção de valores de T_c , por vezes registrados de maneira isolada, pouco criteriosa e desacompanhada de informações úteis para contextualizar os registros. Mais surpreendentemente ainda é constatar que mesmo valores isolados de T_c estão disponíveis apenas para um grupo bastante restrito de espécies. Incrivelmente, apenas há pouco mais de 10 anos, e quase 40 após o trabalho de Heath (1964), foi proposto o uso de modelos para a amostragem de temperaturas operativas de anfíbios (Navas e Araújo, 2000). Não há, até o momento, um único estudo que tenha abordado a biologia térmica de uma espécie de anfíbio no contexto dos índices termorreguladores. A termorregulação, portanto, permanece como um terreno singularmente pouco explorado nos anfíbios.

Determinantes da termorregulação

Em termos mecanísticos, a regulação da Tc envolve a coleta de informações sobre o ambiente térmico (termossensibilidade), a integração destas informações, geralmente envolvendo algum processamento neural, e a coordenação das respostas efectoras adequadas (Hutchison e Dupré, 1992). Em uma abordagem mais integrativa, porém, a regulação da Tc em determinado nível ou intervalo pode ser pensada a partir da contextualização teórica de um modelo de otimização (ver Angilletta et al., 2002 para uma discussão aprofundada deste tema). Simplificando este modelo ao seu cerne, temos que os animais devem regular a sua Tc em algum ponto onde os custos associados à termorregulação sejam minimizados e os benefícios maximizados. Portanto, por um lado temos que a regulação da Tc em determinado nível deve estar associada a alguma vantagem adaptativa de seus efeitos sobre as funções de desempenho. Enquanto, por outro lado, a regulação da temperatura nestes níveis ótimos é comprometida pela existência de conflitos que podem ser internos (características morfológicas e fisiológicas do animal em estudo) e/ou externos (fatores climáticos, risco de predação ou outras interações ecológicas). Em qualquer momento, os animais buscarão a maximização da melhora do desempenho enquanto minimizam os custos associados. Simples em sua concepção, este arcabouço teórico pode ser desdobrado em uma complexidade absoluta de possibilidades (Angilletta, 2009). De fato, benefícios e custos associados à termorregulação resvalam em praticamente todo e qualquer aspecto da história de vida de um animal. Ademais, a relação entre custos e benefícios associados à regulação da Tc pode variar entre diferentes espécies, em função do ambiente, da época do ano, do estágio de desenvolvimento, do estado fisiológico, etc. Esta variação nos custos/benefícios pode ser traduzida em variações intraespecíficas, geográficas, sazonais, ontogenéticas, associadas à reprodução, alimentação, etc. nos padrões de regulação da temperatura corpórea. Finalmente, coroando esta complexidade, fatores históricos podem influenciar consideravelmente a biologia térmica de um animal, tanto que padrões detectados no presente podem refletir não apenas compromissos atuais, mas também aspectos relacionados ao histórico evolutivo dos animais (Angilletta e Werner, 1998; Angilletta, 2009, Kohlsdorf e Navas, 2006).

Em termos de custos envolvidos com a regulação da Tc em anfíbios, talvez o mais relevante seja, de fato, o risco de perda evaporativa de água em excesso. Este

é um risco real que certamente permeia a biologia térmica da maioria absoluta dos anfíbios. Por exemplo, apenas em alguns casos muito particulares de anuros arbóreos ou de regiões de altitude, o uso do assoalhamento para ganho de calor assume importância como via de ganho de calor. Porém, nestes casos, uma série de modificações morfológicas, comportamentais e fisiológicas entram em cena para minimizar o conflito potencial entre perda de água e termorregulação (ver Shoemaker et al., 1987; Shoemaker et al., 1992; Wells, 2007). O assoalhamento (exposição ao sol), que pode implicar ainda em riscos ecológicos, uma vez que ao buscarem lugares expostos à radiação solar, aumenta a probabilidade dos animais serem detectados por predadores visualmente orientados. Riscos aumentados de desidratação e/ou predação podem ser computados como custos potencialmente associados à termorregulação, os quais comprometem diretamente a sobrevivência dos animais. No entanto, há outros custos menos óbvios que, apesar de não comprometerem diretamente a sobrevivência dos animais, podem ter consequências importantes para aptidão. Tais custos podem ser computados como compromissos de investimento, de energia e tempo. A energia gasta por um animal para se locomover para/de um microambiente frio/quente com o objetivo de diminuir/aumentar a T_c (*shuttling behavior*) não pode, obviamente, ser investida em outras atividades ecologicamente relevantes como, por exemplo, produção de ovos. Da mesma forma, o tempo investido na termorregulação pode representar a perda de oportunidades de reprodução ou aquisição de alimento.

Equilibrando os custos envolvidos com a regulação da T_c , há os benefícios. E eles podem ser consideráveis. Desempenho motor e sensorial de animais ectotérmicos sabidamente são afetados pela temperatura, e a regulação da mesma em níveis que melhorem tais funções pode ser traduzido em maiores taxas de sucesso na captura de presas, fuga de predadores, interações sociais, atividade reprodutiva, etc. Do mesmo modo, a eficiência de processos celulares e bioquímicos também sofre forte influência da temperatura. Por exemplo, a termorregulação pode melhorar a digestão do alimento e, por consequência, as taxas de crescimento e a energia disponível para investimento em outras atividades ecologicamente relevantes. Neste contexto, uma resposta comumente exibida por animais ectotérmicos (Regal, 1966; Marcellini e Peters, 1982; Brown e Roberts, 2008) incluindo anfíbios anuros (Witters e Sievert, 2001; Gvoždík, 2003), é o aumento da T_c por meio da seleção de locais mais quentes após a ingestão do alimento,

geralmente referido como resposta termofílica pós-prandial. O aumento da temperatura corpórea durante a digestão pode otimizar a razão entre quebra enzimática e absorção (Logan et al., 2002), melhorar a motilidade intestinal (Dandriofosse, 1974; Skoczylas, 1978; Stevenson et al., 1985), aumentar a taxa de secreção de ácido gástrico (Diefenbach, 1975a,b; Skoczylas, 1970a,b) e a atividade das enzimas digestivas (Licht, 1964) levando ao aumento da eficiência digestiva (Andrade et al., 2005).

A temperatura corpórea pode também afetar a imunocompetência e a capacidade dos animais em combater processos infecciosos. De fato, recentemente, Rowley e Alford (2013) encontraram que o grau de prevalência do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis*, doença emergente implicada em diversos casos de declínios populacionais de anfíbios ao redor do mundo, parece ser afetada por diferenças na Tc de atividade de três espécies de anuros australianos. Entre estas espécies, aquelas com Tc's mantidas frequentemente acima de 25°C exibiram uma diminuição na probabilidade de infestação pelo fungo (Rowley e Alford, 2013). Resultados similares foram também reportados por Catenazzi et al., (2014) para espécies de anuros encontradas ao longo de um gradiente altitudinal nos Andes peruanos. Em ambos os casos, os resultados podem ser explicados pelo fato de que *B. dendrobatidis* tem o seu crescimento comprometido em temperaturas fora do intervalo de 17 a 25°C (Piotrowski et al., 2004). Finalmente, uma mesma espécie de anfíbio pode apresentar um aumento transitório da Tc devido a causas patogênicas, ou seja, uma resposta frequentemente denominada como febre comportamental. Por exemplo, Richards-Zawacki (2010) encontrou que a população de uma espécie de anuro do Panamá alterou sua preferência térmica (produzindo uma febre comportamental) após o aparecimento da infecção pelo mesmo fungo *B. dendrobatidis* nesta população. Embora a febre em ectotérmicos, incluindo anfíbios (ver Kluger, 1977; Myhre et al., 1977; Bicego-Nahas et al., 2000), seja funcionalmente análoga àquela exibida pelos animais endotérmicos, nos ectotérmicos ela é primariamente sustentada pelo comportamento. Em todo caso, acredita-se que os benefícios da febre envolvam tanto o aumento da imunocompetência do animal infectado como a diminuição da patogenicidade dos agentes infectantes (Kluger et al., 1998; ver também Woodhams et al., 2003).

Tanto o aumento da temperatura em resposta à ingestão do alimento como em resposta a algum agente infeccioso ilustram com perfeição como os custos e

benefícios associados à regulação da T_c em determinado nível podem ser alterados em função do estado fisiológico. Ademais, devemos considerar que a identificação dos custos e benefícios associados à termorregulação nem sempre é clara e que uma mesma função biológica pode ser impactada de maneira benéfica ou detrimental, na dependência das condições consideradas. Por exemplo, como mencionado anteriormente, o tempo e a energia dedicados à termorregulação podem representar um compromisso de investimento para a produção de gametas ou outros parâmetros quaisquer associados à reprodução. Por outro lado, a regulação da T_c em níveis adequados pode também ser essencial para a maturação dos gametas, o adequado transcorrer do ciclo reprodutivo e exibição eficaz dos comportamentos reprodutivos (ver Browne e Zippel, 2007).

Mais adiante, ao revisarmos os efeitos da temperatura sobre diferentes funções em anfíbios, ficará evidente que, muito embora tenhamos um bom volume de dados sobre o assunto, em nenhum caso houve a contextualização explícita de um estudo em particular dentro de um modelo de otimização da termorregulação.

Temperatura corpórea

Os limites de tolerância térmica, delimitados pelos críticos térmicos mínimo e máximo, normalmente são determinados experimentalmente e serão discutidos posteriormente. O intervalo térmico no qual os anfíbios estão em atividade encontra-se contido dentro do intervalo de tolerância normalmente deslocado em direção à temperatura crítica máxima. Ou seja, tanto T_{pref} como as temperaturas de atividade encontram-se geralmente mais próximas da temperatura crítica máxima ($T_{crit_{MAX}}$) do que da crítica mínima ($T_{crit_{MIN}}$) (Duellman e Trueb, 1986; Hillman et al., 2009). A T_c dos anfíbios, registrada para animais ativos na natureza, pode variar de valores negativos em alguns anuros, como *Lithobates sylvaticus*, e salamandras, como *Hydromantes platycephalus* (Brattstrom, 1963; 1968), até acima de 40°C em outras espécies, como juvenis de *Rhinella granulosa* (Navas et al., 2008) ou adultos de *Hyperolius viridiflavus* (Kobelt e Linsenmair, 1992) e *Tlalocohyla smithii* (Brattstrom, 1963; 1968) (Tabela 1-A). A coletânea de dados sobre a T_c de anfíbios na natureza revela, como seria esperado para organismos ectotérmicos, que padrões gerais de variação deste parâmetro são fortemente influenciados pela temperatura ambiental. No entanto, esta relação é também sobreposta a fatores filogenéticos. Por exemplo, o grupo dos Caudata (as salamandras) tem temperaturas corpóreas

consideravelmente menores do que Anura (sapos, rãs e pererecas) (Brattstrom, 1963; Feder et al., 1982). Porém, essa diferença pode também estar associada ao fato de que salamandras são majoritariamente encontradas em regiões temperadas com temperaturas tipicamente mais amenas do que nos trópicos, onde encontramos a maioria dos anuros. A relação entre temperatura corpórea e ambiental também pode ser identificada para um mesmo grupo taxonômico. Por exemplo, salamandras das famílias Ambystomatidae e Plethodontidae encontradas em regiões temperadas experimentam temperaturas mínimas mais frias do que os representantes destas mesmas famílias encontrados em regiões tropicais (Feder e Lynch, 1982). O que coincide com o padrão encontrado por Brattstrom (1968; 1970) para diferenças no regime térmico entre anuros de regiões temperadas e tropicais. A relação entre temperatura ambiental e corpórea tanto para salamandras (Feder e Lynch, 1982) como para anuros (Brattstrom, 1968; 1970) também pode ser identificada em função da altitude, com espécies de regiões elevadas experimentando temperaturas menores e regime térmico diário mais amplo (e.g., Tabela 1-B; Carey, 1978; Duellman e Trueb, 1986; Navas, 1996a; 1997). Finalmente, diferenças de hábito e consequentes alterações na dinâmica de troca de calor podem afetar a relação entre temperatura ambiente e corpórea. Por exemplo, em regiões de elevada altitude, salamandras aquáticas exibem T_c 's mais elevadas do que espécies terrestres, provavelmente refletindo a maior estabilidade térmica da água em relação ao ar (Feder e Lynch, 1982).

Tabela 1. (A) Temperatura corpórea (Tc) média, e mínima e máxima voluntárias de diversos grupos de anfíbios anuros (modificado de Vitt e Caldwell, 2009). (B) Tc média (\pm erro padrão) e amplitude de três gêneros de anuros ativos presentes em três elevações diferentes (m) (Modificado de Navas, 1996b).

(A)

	Mínimo voluntário (°C)	Máximo voluntário (°C)	Média (°C)	Número de espécies
CAUDATA				
Cryptobranchidae	9,8	28,0	—	1
Sirenidae	8,0	26,0	24,0	3
Amphiumidae	—	—	24,0	1
Salamandridae	4,5	28,4	16,0	4
Ambystomatideos de regiões temperadas	1,0	26,7	14,5	9
Ambystomatideos de regiões tropicais	10,5	30,0	19,0	12
Plethodontideos aquáticos de regiões temperadas	2,0	22,0	11,3	9
Plethodontideos terrestres de regiões temperadas	- 2,0	26,3	13,5	28
Plethodontideos de regiões tropicais	1,8	30,0	14,2	43
ANURA				
<i>Ascaphus</i>	4,4	14,0	10,0	1
Pelobatidae	12,2	25,0	21,4	2
Leptodactylidae	22,0	28,0	24,7	5
<i>Rhinella</i>	3,0	33,7	24,0	17
Hylidae	3,8	33,7	23,7	14
<i>Gastrophryne</i>	15,5	35,7	26,5	2
<i>Lithobates</i>	4,0	34,7	21,3	12

(B)

Espécie	Localidade	Elevação (m)	Número de indivíduos	Tc (°C)	Amplitude (°C)
<i>C. subpunctatus</i>	Colômbia	3500	28	12,6 \pm 0,48	7,2 - 19,9
<i>C. subpunctatus</i>	Colômbia	2900	30	14,3 \pm 0,44	10,1 - 19,9
<i>C. talamancae</i>	Panamá	90	18	26,3 \pm 0,12	25,5 - 27,7
<i>C. flotator</i>	Panamá	90	17	26,6 \pm 0,26	24,3 - 27,9
<i>E. bogotensis</i>	Colômbia	3500	16	6,8 \pm 0,45	2,4 - 10,8
<i>E. bogotensis</i>	Colômbia	2900	29	8,9 \pm 0,25	6,8 - 11,9
<i>E. diastema</i>	Panamá	90	15	24,3 \pm 0,21	23,3 - 25,6
<i>H. labialis</i>	Colômbia	3500	12	11,1 \pm 0,22	10,0 - 12,7
<i>H. labialis</i>	Colômbia	2900	9	12,4 \pm 0,40	10,5 - 14,8
<i>H. microcephala</i>	Panamá	90	16	25,8 \pm 0,37	24,1 - 25,8
<i>H. ebraccata</i>	Panamá	90	16	24,8 \pm 0,28	23,4 - 27,1

Aclimação/Aclimatização Térmica

A aclimação constitui o conjunto de respostas e ajustes exibidos por um organismo quando submetido experimentalmente a uma mudança de regime térmico (ver Rome et al., 1992). Por outro lado, o conjunto de respostas e ajustes exibidos por um organismo em decorrência de alterações naturais do regime térmico (por exemplo, sazonalmente) é denominado de aclimatização (Pough et al., 1992; Rome et al., 1992). A influência da aclimação sobre taxa metabólica, tolerância térmica, fisiologia da locomoção e vocalização estão entre os temas mais estudados em anfíbios. Dentre os diferentes grupos, a aclimação tem sido extensamente estudada em anuros e urodelos, mas não em cecílias.

Se por um lado a aclimação (quando existente/detectada) permite um animal funcionar mais efetivamente em determinada temperatura (Rome et al., 1992), por outro, os fatores e mecanismos envolvidos na aclimação térmica são complexos e variáveis. Por exemplo, aclimação não parece afetar a performance locomotora de anuros terrestres adultos (Rome et al., 1992), talvez devido à variabilidade térmica do ambiente terrestre (Temple e Johnston, 1998; Wilson e Franklin, 2000). Balanço hídrico, fotoperíodo, variação sazonal da temperatura ambiental são fatores que podem afetar significativamente a $T_{crit_{MIN}}$ e $T_{crit_{MAX}}$ (tolerância térmica discutida na seção a seguir) e T_{pref} (Hutchison e Hill, 1976), enquanto o tamanho corpóreo não parece ter influência sobre a aclimação térmica. Já o estágio de desenvolvimento pode influenciar a tolerância térmica e a aclimação em algumas espécies, como em *Rana pipiens*, em que os indivíduos de maior porte apresentam $T_{crit_{MAX}}$ mais altas (Seibel, 1970), mas não em outras, como em *Ambystoma tigrinum*, em que larvas e adultos apresentam magnitudes e taxas de aclimação térmica similares (Nietfelt et al., 1980). Girinos e adultos de anuros completamente aquáticos (Wilson e Franklin, 2000) e girinos de anuros com adultos terrestres (Wilson e Franklin, 2000) apresentam melhora significativa na natação em temperaturas baixas devido à aclimação. Contudo, independente do grupo anfíbio, um padrão geral pode ser traçado da seguinte maneira: $T_{crit_{MAX}}$ aumenta em temperaturas de aclimação altas e $T_{crit_{MIN}}$ diminui em temperaturas baixas (e.g., Figura 4), além do que a exposição a temperaturas mais baixas resultam na diminuição da $T_{crit_{MIN}}$. Ainda, a taxa de aclimação ao frio geralmente é mais lenta do que aclimação a temperaturas mais altas. Todavia, a magnitude da resposta varia, podendo não ocorrer compensação térmica completa ou a mesma, caso

ocorra, prolongar-se por dias ou semanas (Rome et al., 1992). Enquanto salamandras usualmente aclimatam entre 24 e 72 horas, alguns anuros possuem capacidade de aclimação limitada ou inexistente. Nestes últimos casos, tais espécies apresentam distribuição geográfica restrita e devem, portanto, experimentar mudanças mínimas em seus ambientes térmicos como, por exemplo, anuros encontrados em topos de montanha no leste da Austrália (Brattstrom, 1968; 1970) ou em certas regiões tropicais (Christian et al., 1988). Brattstrom (1968) e Brattstrom e Lawrence (1962) trabalhando com anuros e salamandras na América do Norte e Central chegaram a diversas generalizações a respeito da aclimação em anfíbios: (i) o regime térmico completo de aclimação em anuros tropicais é mais amplo comparado a espécies de zonas temperadas; (ii) espécies com distribuição geográfica restrita possuem habilidade restrita de aclimação; (iii) espécies de zonas de altitude de antigas montanhas dos Estados Unidos e do México são similares às espécies temperadas de latitudes térmicas equivalentes; (iv) espécies de altas altitudes de montanhas mais recentes da América Central são basicamente tipos tropicais de baixas altitudes cuja plasticidade fisiológica é limitada (porém, ver Navas, 1997). Snyder e Weathers (1975) reanalisaram dados de Brattstrom (1968; 1970) sobre tolerância térmica em anfíbios fornecendo duas conclusões similares: (i) populações congêneres e coespecíficas em diferentes habitat possuem caminhos evolutivos parcialmente independentes (i.e., diferenças na $T_{crit_{MAX}}$ ao longo de um transecto altitudinal são esperadas); e (ii) espécies tropicais apresentam menores amplitudes de tolerância que espécies de zonas temperadas.

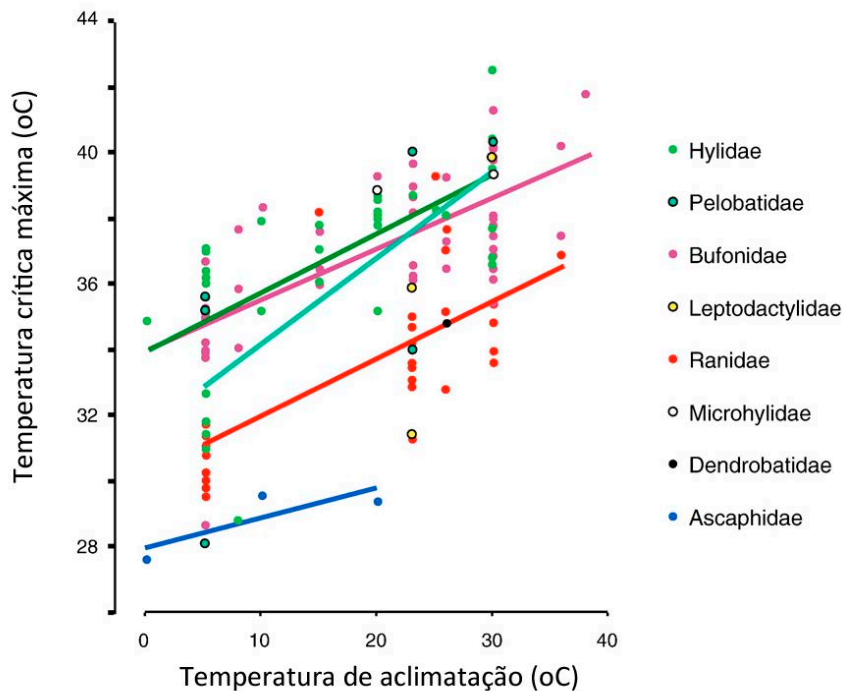


Figura 4. Temperatura crítica máxima ($T_{crit_{MAX}}$) em função da temperatura de aclimação em diversas famílias de anfíbios anuros. Modificado de Navas et al., 2008 (com permissão). Dados retirados de Brattstrom, 1968; Mahoney e Hutchison, 1969; Claussen, 1973.

Tolerância térmica

Existe uma temperatura voluntária mínima e uma voluntária máxima que definem a amplitude de temperaturas que um anfíbio tolerará voluntariamente, por exemplo em um gradiente térmico em laboratório ou na natureza. Este intervalo de temperaturas é denominado de amplitude de tolerância, e animais submetidos, independente se de modo estático ou dinâmico (ver Lutterschmidt e Hutchison, 1997a; Tabela 2), à temperaturas acima ou abaixo dela apresentarão um comprometimento na realização de suas funções. Quanto maior o distanciamento da temperatura em relação à amplitude de tolerância, maior será esse comprometimento (Hillman et al., 2009). Os intervalos térmicos acima ou abaixo dos limites da amplitude de tolerância são chamados de zonas de resistência, estes sendo delimitados pelas temperaturas letais, inferior e superior (porém ver Sunday et al., 2014). Muitos trabalhos denominaram tais limites letais como crítico térmico mínimo e máximo ($T_{crit_{MIN}}$ e $T_{crit_{MAX}}$), respectivamente. Tais temperaturas críticas demarcariam então os limites térmicos, mínimo e máximo, além dos quais os

animais morrem rapidamente, podendo então ser mensurados experimentalmente determinando a mortalidade dos animais em função da variação da temperatura. No entanto, uma abordagem metodológica mais comumente empregada assume que $T_{crit_{MIN}}$ e $T_{crit_{MAX}}$ sejam definidas com base nas temperaturas nas quais os animais perdem a funcionalidade mínima necessária para assegurar sua sobrevivência. Neste estado, que pode ser indicado, por exemplo, pela incapacidade do animal de endireitar o corpo quando virado com o ventre para cima, ocorrência de espasmos ou rigidez muscular, assume-se que o indivíduo estaria “ecologicamente morto”. É relevante salientar a existência de diferentes métodos para determinação da tolerância térmica, sendo Em revisão sobre o assunto, Lutterschmidt e Hutchison (1997b) recomendam o início de espasmos como ponto limite padrão em conjunção com a perda da resposta motora. Entretanto, algumas espécies de anuros neotropicais não exibem espasmos durante medições tanto de sua $T_{crit_{MIN}}$ quanto da $T_{crit_{MAX}}$ (Navas et al., 2007; Bovo, obs. pessoal). Finalmente, os valores de T_{crit} podem ser também utilizados no cálculo de outros parâmetros relevantes para a tolerância térmica, como: (i) “margem de segurança térmica”, dada pela diferença entre a temperatura ótima para desempenho fisiológico (ver Huey e Stevenson, 1979) e a temperatura ambiental média (ou máxima); e, (ii) “tolerância ao aquecimento”, dada pela diferença entre a $T_{crit_{MAX}}$ e a temperatura ambiental máxima (*sensu* Deutsch et al. 2008; Huey et al., 2009). Na literatura recente há uma discussão vigorosa acerca da tolerância térmica, considerando questões como sua relevância ecológica, protocolos experimentais e validade e confiabilidade de tais medições em laboratório e no campo (e.g., Tabela 2; Chown et al., 2009, 2010; Terblanche et al., 2007, 2011; Rezende e Santos 2012; Ribeiro et al., 2012; Tejedo et al., 2012).

Tabela 2. Medições de tolerância térmica aguda em ectotérmicos*.

Limite medido	Descrição	Estresse dinâmico [‡] ou estático [#] usualmente aplicado	Exemplo
Sobrevivência	Sobrevivência de imaturos ou adultos (ou eclosão/pupação) após estresse. Para temperaturas baixas, = ponto de morte devido ao frio (<i>cold-death point, sensu</i> Mellanby, 1939)	Uma ou outra abordagem	Brebs e Loeschke, 1999; Hammond e Hofmann, 2010
Perda de movimento ou atividade	Organismos tornam-se inativos ou perdem a resposta de endireitamento corporal conforme a temperatura muda. Temperatura limite para o movimento espontâneo (<i>sensu</i> Mellanby, 1939)	Dinâmico	Klok e Chown, 1997; Hazell et al., 2008; Yang et al., 2008
Recuperação	Habilidade ou tempo para recuperar a atividade locomotora ou outra característica como fertilidade após estresse térmico. <i>Chill coma tolerance</i> (<i>sensu</i> Gibert e Huey, 2001)	Estático	Gibert e Huey, 2001
Temperatura de recuperação	Temperatura na qual o animal recupera a habilidade motora após uma temperatura de estresse total. Mais frequentemente aplicado a testes dinâmicos em temperaturas baixas (e.g., <i>chill coma recovery</i>)	Dinâmico	Klok e Chown, 2001
Temperatura de “knockdown”	Temperatura na qual os animais são derrubados (= <i>knockdown</i>). Para baixas temperaturas = <i>chill coma temperature</i> (<i>sensu</i> Mellanby, 1939)	Dinâmico	Huey et al., 1992; Mitchell e Hoffmann, 2010
Tempo de “knockdown”	Tempo para o <i>knockdown</i> após exposição ao estresse térmico	Uma ou outra abordagem	McCull et al., 1996; Mitchell e Hoffmann, 2010
Mudança na taxa metabólica	Mudança súbita na taxa metabólica conforme o limite térmico é atingido	Dinâmico	Lighton e Turner, 2004; Sinclair et al., 2004; Stevens et al., 2010
Temperatura crítica ou ponto de super-resfriamento	Exotermia associada com o calor latente de cristalização	Uma ou outra abordagem	Lee e Denlinger, 1991

*Tabela modificada de Terblanche et al., 2011.

‡ “Dinâmico” denota mudança gradual de temperatura, geralmente programada em taxas conhecidas.

“Estático” denota teste em temperatura constante medindo o tempo até a morte do animal.

Muitas espécies de anfíbios já tiveram suas tolerâncias térmicas mínima e máxima (letais e ecológicas) mensuradas (e.g., Figura 5; Brattstrom, 1963; 1968; Kobelt e Linsenmair, 1992; Navas et al., 2008). As $T_{crit_{MIN}}$ e a $T_{crit_{MAX}}$ de anfíbios tendem a estar fora da amplitude das T_c 's registradas em campo existindo claramente um considerável “fator de segurança” entre as temperaturas letais e a

amplitude térmica (porém, ver Sunday et al., 2014). Por exemplo, o bufonídeo *Rhinella marina* (anteriormente conhecido como *Bufo marinus*) apresenta $T_{crit_{MIN}}$ de 11°C e $T_{crit_{MAX}}$ de 41,8°C, enquanto as T_c 's de animais ativos no campo variam de 22°C a 27°C (Brattstrom, 1963). Similarmente, Lillywhite (1970) registrou, para *Lithobates catesbeianus* (rã touro, anteriormente conhecida como *Rana catesbeiana*), T_c 's de atividade entre 26°C e 33°C na natureza e $T_{crit_{max}}$ de 38,2°C. Navas et al. (2008) registraram juvenis de *R. granulosa* com T_c 's em campo entre 24°C e 37,5°C e $T_{crit_{max}}$ de 44,2°C. Assim como para T_c 's de atividade, padrões de tolerância térmica em anfíbios podem variar em função da altitude e/ou latitude. Por exemplo, *Anaxyrus cognatus*, habitante de latitudes baixas, apresenta $T_{crit_{MAX}}$ 2,34°C maior que *Anaxyrus hemiophrys* de latitudes altas (Schmid, 1965). De maneira geral, anfíbios amplamente distribuídos possuem correlação negativa entre elevação e $T_{crit_{MAX}}$ (Brattstrom 1968, 1970; Snyder e Weathers, 1975; Miller e Packard, 1977), e anfíbios de altitudes elevadas possuem menores $T_{crit_{MAX}}$ (Brattstrom 1968), embora existam diversas exceções (Brattstrom, 1968; Heatwole et al., 1968; Christian et al., 1988). Finalmente, cabe destacar que a tolerância termal, a despeito de sua importância, é apenas um dos fatores envolvidos na determinação do nicho de uma espécie em particular e de sua distribuição geográfica (ver Gouveia et al., 2013).

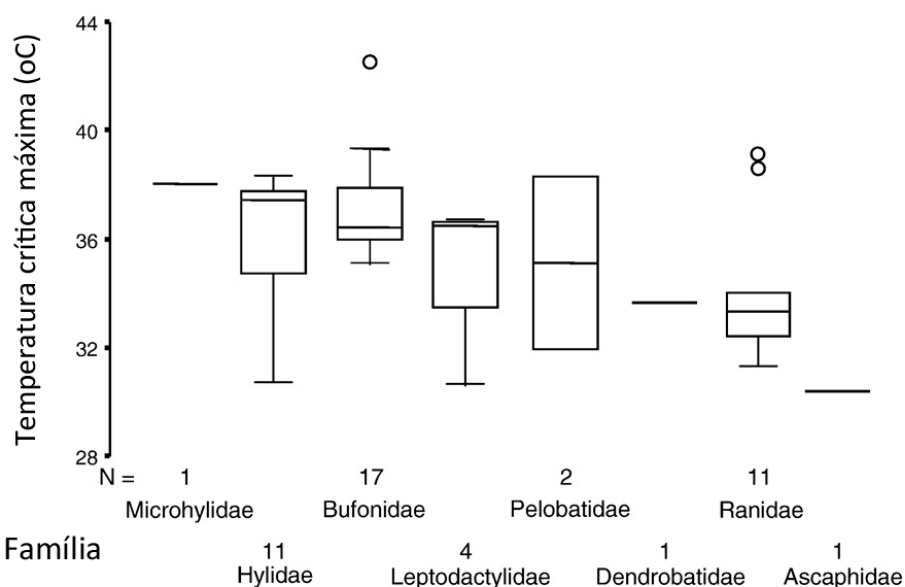


Figura 5. Temperatura crítica máxima ($T_{crit_{MAX}}$) mensurada em diversas famílias de anfíbios anuros. Modificado de Navas et al., 2008 (com permissão). Dados retirados de Brattstrom, 1968; Mahoney e Hutchison, 1969; Claussen, 1973.

Tolerância a temperaturas baixas

Poucos anfíbios são ativos em temperaturas próximas a 0°C. No entanto, algumas salamandras dos gêneros *Hydromantes* podem ser encontradas ativas a -2°C, *Eurycea* a 0°C e *Ambystoma* a <1°C (Brattstrom, 1963; Ireland, 1976; Feder et al., 1982). Em temperaturas levemente mais altas, algumas espécies de anuros são encontradas em atividade como, por exemplo, *Anaxyrus boreas* a 3°C (Brattstrom, 1963) e *Incilius bocourti* a 3,5°C (Stuart, 1951). Quando inativos, uma das estratégias empregadas por diferentes animais para tolerar temperaturas abaixo do ponto de congelamento consiste na diminuição cuidadosa da temperatura corpórea abaixo do ponto de congelamento dos fluidos corpóreos, ou seja, do super-resfriamento. Esta estratégia é bastante arriscada pois qualquer perturbação do sistema, por exemplo, a inoculação por um cristal de gelo do ambiente, promoveria um congelamento imediato, descontrolado e fatal dos animais. Anfíbios possuem uma capacidade baixa de super-resfriamento (geralmente de -2 ou -3°C, apenas) uma vez que seu tegumento altamente permeável à água fornece uma via de inoculação por cristais de gelo do ambiente e, portanto, de congelamento (Storey e Storey, 1986, 1987; Swanson e Graves, 1995; Pinder et al., 1992). Desta forma, em ambientes onde a temperatura ambiente cai abaixo do ponto de congelamento, os anfíbios podem lançar mão de apenas duas estratégias: (i) buscar refúgios termicamente mais amenos e, desta forma, evitar as temperaturas de congelamento; e, (ii) tolerar o congelamento. A primeira estratégia é largamente empregada por diversas espécies de anfíbios conhecidas por hibernar durante os meses frios de inverno. Em geral, estes animais buscam enterrar-se abaixo da linha de congelamento (*frost line*) ficando, desta forma, protegidos do risco de congelar. Embora esta estratégia de evitar o congelamento não implique em nenhum ajuste funcional importante, em invernos especialmente rigorosos, é possível que ela não seja suficiente para garantir a sobrevivência dos animais (Petranka, 1979; Smith, 1969; Kuzmin, 1999). A tolerância ao congelamento, por outro lado, permite a sobrevivência dos anfíbios em temperaturas abaixo do ponto de congelamento dos fluidos corpóreos (geralmente entre -3 a -6°C) e foi documentada, até o momento, em seis espécies de anuros norte-americanos (*Lithobates sylvaticus*, *Pseudacris crucifer*, *P. triseriata*, *P. regilla*, *Hyla versicolor* e *H. chrysoscelis*) e em uma espécie de salamandra siberiana (*Salamandrella keyserlingii*) (Schmid, 1982; Wells, 2007;

Hillman et al., 2009), a qual parece ser capaz de sobreviver congelada em temperaturas abaixo de -35°C por até 90 anos (Shcherbak e Novalyukh, 1973; Berman et al., 1984).

A tolerância ao congelamento depende da produção e acúmulo de crioprotetores (anticongelantes) no espaço intracelular, incluindo glicerol (em *Hyla versicolor*), glicose (em *Pseudacris crucifer*, *P. triseriata*, *Lithobates sylvaticus*) ou ambos (em *Salamandrella keyserlingii*). Estes crioprotetores desempenham papéis de grande importância na orquestração dos eventos bioquímicos envolvidos na tolerância ao congelamento. Em primeiro lugar, eles diminuem o ponto de congelamento dos fluidos intracelulares, de forma que o congelamento seja iniciado no espaço extracelular. De fato, o início do congelamento no espaço extracelular é também favorecido pela presença de proteínas nucleadoras, restritas a este compartimento, que promovem o início da formação dos cristais de gelo em temperaturas próximas ao ponto de congelamento dos fluidos corpóreos (evitando, portanto, os riscos associados ao super-resfriamento). Os crioprotetores intracelulares também contribuem para o aumento da concentração osmótica do meio intracelular e, portanto, ajudam a controlar a desidratação das células durante o congelamento. De fato, conforme o congelamento prossegue, a célula tende a perder água osmoticamente para o meio extracelular, onde os cristais de gelo estão sendo formados, e o aumento da concentração osmótica do meio intracelular devido ao acúmulo de crioprotetores ajuda a controlar este processo. Finalmente, os crioprotetores atuam assegurando a integridade estrutural de organelas subcelulares durante o estado de desidratação osmótica causado pelo congelamento (Storey e Storey, 1988). Quando congelados, respiração, fluxo sanguíneo e batimentos cardíacos dos anfíbios são suspensos (Storey e Storey, 1988; 1992; Ramløv, 2000) e, assim, a capacidade de depressão metabólica e tolerância à isquemia são também cruciais durante o congelamento. Em geral, as espécies de anuros tolerantes ao congelamento toleram a conversão de até 35-45% da água corporal total em gelo, no entanto, *Lithobates sylvaticus* pode tolerar taxas de até 65% (Storey e Storey, 1992). Durante o inverno, os anfíbios podem experimentar ciclos de congelamento/descongelamento associados à variação na temperatura ambiente. Tais ciclos são importantes, pois a maioria das espécies tolerantes ao congelamento não sobrevive neste estado por intervalos de tempo superiores a algumas semanas.

Em geral, a produção de crioprotetores pelos anfíbios não ocorre em antecipação ao inverno. Na verdade, o próprio início do processo de congelamento funciona como sinal para a mobilização do glicogênio hepático e sua distribuição para os tecidos, em geral dentro de algumas horas (Storey e Storey, 1986). Ou seja, para ser tolerado, a taxa de congelamento deve ser relativamente lenta, permitindo a produção e distribuição de crioprotectores por todo o corpo antes que qualquer dano possa ocorrer (Storey e Storey, 1988). Embora não haja acúmulo de crioprotetores no meio intracelular em antecipação ao congelamento, a quantidade de glicogênio acumulada no fígado no início da hibernação afeta a sobrevivência dos animais (Jenkins e Swanson, 2005). Finalmente, há um aumento de cerca de seis vezes na taxa de transporte de glicose pelas membranas celulares de anuros coletados no outono em comparação com animais coletados na primavera (King et al., 1995). A tolerância ao congelamento estende-se até o início da primavera, época em que os animais iniciam as atividades reprodutivas. Para *Pseudacris crucifer* e *Lithobates sylvaticus*, os quais reproduzem-se no início da primavera, essa tolerância estendida permite a sobrevivência sob temperaturas altamente variáveis e ocasionalmente abaixo de zero, as quais ocorrem durante o final do inverno e o início da estação reprodutiva na primavera. A tolerância ao congelamento diminui após a emergência da hibernação, especialmente após o início da alimentação (Storey e Storey, 1987). No entanto, a capacidade de tolerar o congelamento é retida mesmo após a emergência, embora limitada pela diminuição das reservas de glicogênio e das taxas de transporte de glicose através da membrana celular. É possível que a tolerância ao congelamento tenha evoluído nos anfíbios de maneira independente por pelo menos três vezes (Wells, 2007) a partir de modificações de respostas fisiológicas pré-existentes associadas à dessecação (Constanzo et al., 1993; Churchill e Storey, 1995).

Efeitos da temperatura

Toda e qualquer função orgânica sofre os efeitos da temperatura e a cobertura completa deste universo de informação está além do objetivo desta revisão. Aqui, nós optamos por abordar algumas funções integrativas selecionadas que julgamos como sendo mais ecologicamente relevantes e possivelmente mais impactantes para a aptidão dos anfíbios. Portanto, abaixo iremos discutir

brevemente os efeitos da temperatura sobre o metabolismo energético, alimentação e digestão, balanço hídrico, parâmetros associados à locomoção, reprodução, crescimento e desenvolvimento.

Possivelmente a variável fisiológica mais integrativa de todas aquelas estudadas com certa regularidade seja a taxa metabólica. A taxa metabólica integra a troca de energia entre os animais e o ambiente físico e, portanto, possui enorme relevância ecológica. Como em outros ectotérmicos, a taxa metabólica dos anfíbios sofre um efeito direto da Tc. Ademais, como em todos os outros organismos, a taxa metabólica dos anfíbios é também afetada pela massa corpórea. A variação entre massa corpórea (M) e taxa metabólica de repouso (TMR) em anfíbios pode ser descrita pela equação alométrica $TMR = aM^b$, onde “a” é o intercepto da regressão alométrica e “b” corresponde ao expoente de massa. Ou seja, o valor de b indica a magnitude de variação da TMR em razão da variação na massa corpórea. Um valor de b igual a 1, por exemplo, corresponde a uma perfeita proporcionalidade entre as variáveis (isometria). No entanto, a taxa metabólica sabidamente varia em relação à massa, inter e intraespecificamente, em valores abaixo da proporcionalidade exata ($b < 1$, geralmente em valores entre 0,66 e 0,75), significando que animais maiores possuem taxa metabólica massa específica proporcionalmente menor do que animais menores. Em anuros e urodelos, a taxa metabólica aumenta com a massa corpórea na razão de 0,8, aproximadamente, parecendo não diferir consideravelmente entre grupos e tampouco com a temperatura (Gatten et al., 1992). Cecílias, porém, aparentemente possuem taxas metabólicas mais baixas do que anuros e urodelos (Smits e Flanagin, 1994; Stiffler e Talbot, 2000). Se por um lado, a variação da temperatura exerce pouca influência na inclinação da variação alométrica das taxas metabólicas dos anfíbios (valor de b), o intercepto desta relação (valor de a) varia consideravelmente em função da temperatura. Em valores médios, um aumento de 10°C da temperatura resulta em uma duplicação da taxa metabólica, ou seja, em média, o valor do Q₁₀ para a taxa metabólica dos anfíbios gira em torno de 2, embora possa existir considerável variação (de 0,5 a 5, geralmente) (Gatten et al., 1992). A magnitude do Q₁₀ não parece diferir significativamente entre diferentes linhagens e intervalos térmicos, pelo menos na faixa compreendida entre 5°C e 30°C (Gatten et al., 1992). Por outro lado, a sensibilidade da taxa metabólica dos anfíbios às variações de temperatura pode sofrer considerável influência devido à aclimação (Fitzpatrick, 1973; Dunlap, 1980;

Feder, 1982) ou à variação sazonal (Pinder et al., 1992; Withers, 1993; Abe, 1995). A base funcional envolvida na determinação de um valor específico do expoente de massa, ou mesmo a viabilidade da existência de uma base qualquer, constitui um dos temas mais controversos da fisiologia e discussões mais profundas e recentes sobre o tema podem ser encontradas em White e Kearney (2013) e Konarzewski e Ksiazek (2013). As alterações metabólicas decorrentes das variações da temperatura são atendidas por ajustes envolvendo a troca e transporte de gases respiratórios (i.e., O_2 e CO_2) pelo sistema cardiorrespiratório. Desse modo, há relatos de que aumentos/reduções na T_c levam a aumento/redução na ventilação pulmonar, na pressão arterial e na frequência cardíaca de algumas espécies de anuros (Pinder et al., 1992), além de alterar diretamente as respostas respiratórias à hipóxia e hipercapnia (Branco et al., 1992).

A alimentação dos anfíbios é afetada de forma significativa pela temperatura. A temperatura é conhecida por afetar: (i) a (taxa de) ingestão de alimento; (ii) o episódio da alimentação em si (detecção sensorial da presa, motivação comportamental e desempenho muscular para captura da presa) e; (iii) a digestão. De maneira geral, a ingestão é positivamente correlacionada com a temperatura, existindo naturalmente um intervalo ótimo pra tal. Contudo, dependendo do grupo/espécie estudado/a, diferentes intervalos de temperatura, época do ano, tipo de alimento e duração do experimento influenciam os resultados tanto de ingestão como das demais etapas do processo alimentar (Wells, 2007). A digestão do alimento é acompanhada por um aumento transitório da taxa metabólica, frequentemente referido como Ação Dinâmica Específica (ver Secor, 2009), o qual é causado pelos custos associados à digestão, absorção e assimilação do alimento. Este aumento metabólico pós-prandial nos anfíbios, assim como em outros organismos ectotérmicos, é fortemente afetado pela temperatura. Em anuros, o aumento da T_c causa maiores incrementos das taxas metabólicas pós-prandiais e a concomitante redução da duração da digestão, porém, sem grandes efeitos sobre os custos energéticos do processo (Freed, 1980; Secor et al., 2007; Secor e Faulkner, 2002, Powell et al., 1999). Portanto, temperaturas mais altas durante a digestão parecem redundar em vantagens de cunho ecológico basicamente pela diminuição do tempo investido nesta atividade. O fato de algumas espécies de anfíbios (salamandras e anuros) exibirem uma preferência por temperaturas mais altas após a alimentação (Lillywhite et al., 1973; Freed, 1980; Feder, 1982; Witters e Sievert,

2001) pode indicar que esta resposta termofílica pós-prandial, de fato, redundava em vantagens adaptativas importantes. Finalmente, esta resposta é também frequentemente encontrada nos répteis (Dorcas et al., 1997; Sievert e Andreadis, 1999; Peterson et al., 1993; Regal 1966; McGinnis e Moore, 1969; Touzeau e Sievert, 1993; ver Capítulo 6).

A taxa de perda evaporativa de água em anfíbios varia em função de diversos fatores, dentre eles (i) a pressão de vapor de água no ambiente, a qual é modificada pela (ii) temperatura, (iii) a umidade relativa, (iv) a ocorrência de movimentos de convecção de massa, i.e., correntes de ar, (v) a resistência imposta à evaporação pelo tegumento, e (vi) a área de superfície corpórea exposta (Hillman et al., 2009). A temperatura afeta a perda de água evaporativa exponencialmente via sua influência também exponencial sobre a variação na pressão do vapor de água. Desta forma, a termorregulação encontra-se intrínseca e intimamente associada à regulação do balanço hídrico em anfíbios. Porém, essa relação entre temperatura e balanço de água começou a ficar mais clara (empiricamente) apenas nas últimas décadas (Pitkin, 1978; Warburg e Degani, 1979; Brown et al., 1986; Segura et al., 1987; Dinno e Nagel, 1988). Embora a perda evaporativa de água possibilite evitar o superaquecimento, a consequência disso para o animal, i.e. a desidratação, causa a perda do desempenho que pode, em última instância, ocasionar sua morte (Angilletta, 2009). De modo geral, animais desidratados tipicamente preferem temperaturas menores do que animais hidratados, o que é válido tanto para anfíbios (Shoemaker et al., 1989; Willians e Wygoda, 1993; Dohm et al., 2001), como para outros vertebrados ectotérmicos, como lagartos (Crowley, 1987) e serpentes (Ladyman e Bradshaw, 2003).

No tocante aos efeitos da temperatura sobre a locomoção (salto, natação, rastejamento, etc.), é extensa a lista dos estudos analisando as causas, consequências e interação de fatores que afetam o desempenho locomotor dos anfíbios. Este parâmetro organismal é relativamente fácil de ser quantificado, possui relação direta com a fisiologia muscular e pode ser diretamente associado com a aptidão podendo, portanto, ser adequadamente contextualizado em um cenário ecológico e evolutivo (e.g., Feder e Burggren, 1992). De fato, ao afetar o desempenho locomotor, a temperatura afeta toda e qualquer atividade dependente da locomoção como, por exemplo, o forrageio, a fuga de predadores, corte/cópula, construção de ninhos, etc. Além disso, o efeito que a temperatura impõe sobre a

locomoção de anfíbios não deriva em uma correlação simples e direta (p.ex., piora ou melhora ou indiferença do desempenho locomotor), uma vez que essa resposta pode variar dependendo da anatomia (estrutura e organização) muscular e a bioquímica envolvida, as quais vão depender da função cardiorrespiratória, estado de saúde/digestivo/reprodutivo/etc. da espécie considerada (ver Rome et al., 1992 e Gatten et al., 1992). Apesar desta miríade de fontes de variação, é possível identificar alguns padrões gerais da influência da temperatura sobre o desempenho locomotor de anfíbios anuros: (i) o desempenho diminui em temperaturas baixas e; (ii) melhora em temperaturas ecologicamente relevantes; (iii) funções de desempenho sofreram adaptações evolutivas em seus ambientes térmicos (ver Figura 3 em Navas et al., 2008).

A variação da temperatura afeta significativamente a reprodução de anfíbios e, certamente, está envolvida na evolução das características reprodutivas deste grupo. A começar pelos ciclos reprodutivos de diversas espécies, os quais são afetados, pelo menos em parte, pela variação da temperatura (John-Alder et al., 1988; Parmesan, 2007). Por exemplo, a época de desova na rã *Rana esculenta* e o tempo de chegada aos corpos d'água pela salamandra *Triturus vulgaris* têm sido antecipados em cerca de 9 a 10 dias pelo aumento de 1°C na temperatura do ar na Grã-Bretanha (Beebe, 1995). Prosseguindo, encontramos que praticamente todas as etapas envolvidas na reprodução dos anfíbios são impactadas pela temperatura. Por exemplo, a variação da temperatura é conhecida por afetar o comportamento de corte (Denoel et al., 2005), vocalização (Gerhardt, 1994 e referências nele contidas; Navas, 1996c), oviposição (Caldwell, 1986), desenvolvimento embrionário (Moore, 1939; Smith-Gill e Berven, 1979) e mesmo provocar a reversão sexual (Dournon et al., 1990; Wallace et al., 1999). Em relação ao desenvolvimento dos embriões, o aumento da temperatura causa, dentro de certos limites, uma aceleração do processo (Moore, 1939; Bradford, 1990). Contudo, embora espécies adaptadas a regiões mais frias possuam taxas de desenvolvimento mais rápidas em temperaturas frias do que espécies de regiões mais quentes, estas últimas possuem taxas de desenvolvimento absolutas mais rápidas em temperaturas habitualmente encontradas durante a estação reprodutiva (Moore, 1939; Bachmann, 1969). Além da temperatura, a filogenia também é importante: ovos de anuros se desenvolvem mais rapidamente do que de salamandras, mesmo que a temperatura e o tamanho dos ovos sejam os mesmos (Bradford, 1990), provavelmente devido à diferenças

nas estratégias de história de vida entre os grupos. Diferenciação (mudança/passagem de um estágio de desenvolvimento para outro) e crescimento (produção de novos tecidos) também são dependentes da temperatura, embora o último seja menos sensível a ela (Wells, 2007). Enquanto o crescimento continua em baixas temperaturas, mesmo que em taxas muito lentas, a diferenciação pode ser inteiramente inibida. Em consequência disso, as larvas que crescem em temperaturas mais frias atingem maior tamanho comparadas às que crescem em temperaturas mais quentes (Smith-Gill e Berven, 1979). A variação da temperatura ambiental na qual as espécies se desenvolvem é geralmente atribuída à variação geográfica e altitudinal, influenciando, assim, na duração do período larval (quando existente) e no tamanho de metamorfose do animal (Morrison e Hero, 2003). Embora a temperatura possa afetar o crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies em diferentes maneiras (Wells, 2007), podemos traçar duas generalizações para esta fase inicial da vida dos anfíbios: (i) a seleção natural parece ter favorecido períodos larvais mais curtos em ambientes onde a temperatura (e o tempo que existe água) limita o tempo disponível para o crescimento e desenvolvimento (Berven e Gill, 1983), além de; (ii) ter favorecido adaptações no crescimento e desenvolvimento às condições ambientais locais (Olsson e Uller, 2002, 2003). Passados os primeiros estágios de vida, juvenis e adultos de anfíbios também seguem suscetíveis, sem surpresa, aos impactos da variação da temperatura. Por exemplo, os padrões de crescimento e maturação sexual podem ser afetados tanto pela variação diária da temperatura, acentuada em regiões de altitude (Tiley, 1980), quanto por variações sazonais do regime térmico (Wells, 2007). Além disso, algumas espécies de anfíbios atingem tamanhos corpóreos adultos maiores em regiões mais frias comparadas às mais quentes (Tiley, 1980), padrão comum entre ectotérmicos (Partridge e French, 1996; Atkinson e Sibly, 1997; Ashton, 2002). Presumivelmente, essa diferença deve estar associada aos efeitos do regime térmico sobre o desenvolvimento (de forma mais acentuada) e crescimento (menos acentuadamente), e retardamento da maturação sexual (Berven, 1982).

Temperatura e recentes declínios populacionais de anfíbios

Muito embora ainda não seja bem entendida a causa principal das extinções recentes de diversas populações de anfíbios ao redor do mundo, muito se tem

discutido acerca dos efeitos de alterações climáticas, como por exemplo o aquecimento global, sobre a fisiologia térmica de animais, incluindo os anfíbios (Stuart et al., 2004; Mendelson et al., 2006; Parmesan, 2006; Pounds et al., 2006). De fato, alterações de regimes térmicos (e hídricos, ver Sherwood e Fu, 2014) locais podem ter diversas consequências negativas para anfíbios. Por exemplo, um aumento na temperatura ambiental poderia ter produzido/favorecido as condições necessárias para a ocorrência/proliferação de agentes patogênicos, como no caso do fungo quitrídeo *Batrachochytrium dendrobatidis* em diversas regiões do planeta (ver Pounds et al., 2006). Contudo, a causa dessas extinções e/ou declínios populacionais tem sido ancorada a uma complexa rede de interações diferentes em diversas partes do mundo (ver Spitzen-Van der Sluijs, et al., 2014). Perda e fragmentação de habitat, mudanças climáticas locais/regionais/globais (e.g., aumento da radiação UV-B, aquecimento/resfriamento do clima), introdução de espécies exóticas, patógenos e poluentes figuram entre os principais agentes apontados como causadores desses desaparecimentos (Pounds, 2001; Navas e Otani, 2007). Dentre tais, a temperatura certamente figura como um dos fatores de importância capital para o entendimento destas ameaças, para a projeção de cenários futuros e para a importante missão de orientar medidas de conservação.

Referências bibliográficas

- Abe, A.S. 1995. Estivation in South American amphibians and reptiles. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 28: 1241-1247.
- Agam N., Berliner P.R. 2006. Dew formation and water-vapor adsorption in semi-arid environments - A review. *Journal of Arid Environments* 65: 572-590.
- Andrade, D.V., Cruz-Neto, A.P., Abe, A.S., Wang, T. 2005. Specific dynamic action in ectothermic vertebrates: a review of the determinants of postprandial metabolic response in fishes, amphibians, and reptiles. *In* M. Starck & T. Wang (Editors), *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates.*, Science Publishers, Inc.: Enfield, NH, p. 305-324.
- Angilletta, M.J., Niewiarowski, P.H., Navas, C.A. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology* 27: 249-268.
- Angilletta, M.J. 2009. *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis.* Oxford University Press.

- Angilletta, M.J., Werner, Y.L. 1998. Australian geckos do not display diel variation in thermoregulatory behavior. *Copeia* 1998: 736-742.
- Ashton, K.G. 2002. Do amphibians follow Bergmann's rule? *Canadian Journal of Zoology* 80: 708-716.
- Atkinson, D., Sibly, R.M. 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 235-239.
- Bachmann, K. 1969. Temperature adaptations of amphibian embryos. *The American Naturalist* 102: 115-130.
- Bagnara, J.T., Frost, S.K., Matsumoto, J. 1978. On the development of pigment patterns in amphibians. *American Zoologist* 18: 301-312.
- Beebe, T.J.C. 1995. Amphibian breeding and climate. *Nature* 374, 219-220.
- Bennet, A.F. 1978. Activity metabolism of the lower vertebrates. *Annual Review of Physiology* 40: 447-469.
- Berman, D. I., Leirikh, A. N. and Mikhailova, E. I. 1984. Winter hibernation of the Siberian salamander *Hynobius keyserlingi*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 1984: 323-327.
- Berven, K.A. 1982. The genetic basis of altitudinal variation in the wood frog *Rana sylvatica*. II. An experimental analysis of larval development. *Oecologia* 52: 360-369.
- Berven, K.A., Gill, D.E. 1983. Interpreting geographic variation in life-history traits. *American Zoologist* 23: 85-97.
- Bicego-Nahas, K.C.; Steiner, A.A.; Carnio, E.C.; Antunes-Rodrigues, J.; Branco, L.G.S. 2000. Antipyretic effect of arginine vasotocin in toads. *American Journal Physiology* 278: R1408- R1414.
- Blaylock, L.A.; Ruibal, R.; Platt-Aloia, K. 1976. Skin structure and wiping behavior of phyllomedusine frogs. *Copeia* 1976(2): 283-295.
- Blouin-Demers, G., Weatherhead, P.J. 2001. Thermal ecology of black rat snakes (*Elaphe obsoleta*) in a thermally challenging environment. *Ecology* 82: 3025-3043.
- Bradford, D.F. 1990. Incubation time and rate of embryonic development in amphibians: The influence of ovum size, temperature, and reproductive mode. *Physiological Zoology* 63: 1157-1180.
- Branco, L. G. S. ; Glass, M. L. ; Hoffmann, A. 1992. Central chemoreceptor drive to breathing in unaesthetized toads. *Respiration Physiology*, 87: 195-204.
- Brattstrom, B.H. 1963. Preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology* 44: 238-255.
- Brattstrom, B.H. 1968. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of

latitude and altitude. *Comparative Biochemical Physiology* 24:93–111.

Brattstrom, B.H. 1970. Amphibia. In *Comparative physiology of thermoregulation*, ed. G.C. Whittow, 135-66. New York: Academic Press.

Brattstrom, B.H., Lawrence, P. 1962. The rate of thermal acclimation in anuran amphibians. *Physiological Zoology* 35: 148-156.

Brown, S.C., Horgan, E.A., Savage, L.M., Brown, P.S. 1986. Changes in body water and plasma constituents during bullfrog development: Effects of temperature and hormones. *Journal of Experimental Zoology* 237:25-34.

Brown, R.P., Roberts, N. 2008. Feeding state and selected body temperatures in the slow-worm (*Anguis fragilis*). *Herpetological Journal* 18: 59-62.

Browne, R.K., Zippel, K. 2007. Reproduction and larval rearing of amphibians. *ILAR Journal* 48: 214-234.

Buttermer, W.A., van der Wielen, M., Dain, S., Christy, M. 1996. Cutaneous properties of the green and golden bell frog *Litoria aurea*. *Australian Zoologist*, 30(2): 134-138.

Caldwell, J.P. 1986. Selection of egg deposition sites: A seasonal shift in the southern leopard frog, *Rana sphenoccephala*. *Copeia* 1986: 249-253.

Carey, C. 1978. Factors affecting body temperature of toads. *Oecologia*, 39:197-219.

Catenazzi, A., Lehr, E., Vredenburg, V.T., 2013. Thermal physiology, disease, and amphibian declines on the eastern slopes of the Andes. *Conservation Biology*, 28(2): 509-517.

Chown, S.L., Jumbam, K.R., Sørensen, J.G., Terblanche, J.S. 2009. Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. *Functional Ecology* 23:133-140.

Chown, S.L., Hoffmann, A.A., Kristensen, T.N. Angilletta Jr., M.J., Stenseth, N.C. and Pertoldi, C. 2010. Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Climate Research* 43: 3-15.

Christian, K.A., Weavers, B. W. 1996. Thermoregulation of monitor lizards in Australia: an evaluation of methods in thermal biology. *Ecological Monographs* 66: 139-157.

Christian, K. A., Nunez, F., Clos, L., Diaz, L. 1988. Thermal relations of some tropical frogs along an altitudinal gradient. *Biotropica* 20: 236-239.

Churchill, T.A., Storey, K. B.1995. Metabolic effects of dehydration on an aquatic frog, *Rana pipiens*. *Journal of Experimental Biology* 198: 147-154.

Claussen, D.L. 1973. The thermal relations of the tailed frog, *Ascaphus truei*, and the

pacific treefrog, *Hyla regilla*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 44: 155-171.

Cohen, M.P., Alford, R.A. 1996. Factors affecting diurnal shelter use by the cane toad, *Bufo marinus*. *Herpetologica* 52: 172-181.

Costanzo, J.P., Lee Jr., R.E., Lortz, P.H. 1993. Physiological responses of freeze-tolerant and -intolerant frogs: Clues to evolution of anuran freeze tolerance. *American Journal of Physiology* 265: R721-R725.

Cowles, R. B., and Bogert, C. M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin American Museum of Natural History* 83: 261-296.

Crowley, S.R. 1987. The effect of desiccation upon the preferred body temperature and activity level of the lizard *Sceloporus undulatus*. *Copeia* 1987(1): 25-32.

Denoel, M., Mathieu, M., Poncil, P. 2005. Effect of water temperature on the courtship behaviour of the Alpine newt. *Triturus alpestris*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58: 121-127.

Dandrifosse, G. 1974. Digestion in reptiles. *In Amphibia and Reptilia*. M. Florkin & B. Scheer (Eds.). Academy Press Inc., New York, NY, vol. 9, pp. 249–276.

Diefenbach C.O. 1975a. Gastric function in *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Reptilia). I. Rate of gastric digestion and gastric motility as a function of temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 51: 259-265.

Diefenbach C.O. 1975b. Gastric function in *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Reptilia). II. Effects of temperature on pH and proteolysis. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 51: 267-274.

Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C., Martin, P.R. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of National Academy Sciences USA* 105: 6668-6672.

Dinno , M.A., Nagel, W. 1988. Temperature dependence of transcellular and intracellular parameters of frog skin. *Progress in Clinical and Biological Research* 258: 103-120.

Dohm, M.R., Mautz, W.J., Looby, P.G., Gellert, K.S., Andrade, J.A. 2001. Effects of ozone on evaporative water loss and thermoregulatory behavior of marine toads (*Bufo marinus*). *Environmental Research* 86: 274-286.

Dorcas, M.E., Peterson, C.R., Flint, M.E.T. 1997. The thermal biology of digestion in rubber boas (*Charina bottae*): physiology, behavior and environmental constraints. *Physiological Zoology* 70: 292-300.

Dournon, C., Houillon, C., Pieau, C. 1990. Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *The International Journal of Developmental Biology* 34(1):81-92.

- Duellman, W. E., Trueb, L. 1986. Biology of amphibians. New York: McGraw-Hill.
- Dunlap, D.G. 1980. Comparative effects of thermal acclimation and season on metabolic compensation to temperature in the hylid frogs, *Pseudacris triseriata* and *Acris crepitans*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 66: 243-249.
- Edgren, R.A. Factors controlling color change in the tree frog, *Hyla versicolor* Wied. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine* 87: 20-23.
- Esteban, M., Sanchiz, B. 2000. Differential growth and longevity in low and high altitude *Rana iberica* (Anura, Ranidae). *Herpetological Journal* 10: 19-26.
- Feder, M.E. 1982. Thermal ecology of neotropical lungless salamanders (Amphibia: Plethodontidae): environmental temperatures and behavioral responses. *Ecology* 63: 1665-1674.
- Feder, M. E., Lynch, J. F. 1982. Effects of latitude, season, elevation, and microhabitat on field body temperatures of neotropical and temperate zone salamanders. *Ecology* 63: 1657-1664.
- Feder, M.E., Lynch, J.F., Shaffer, H.B., Wake, D.B. 1982. Field body temperatures of tropical and temperate zone salamanders. *Smithsonian Herpetological Information Service* 52: 1-23.
- Feder, M., Burggren, W.W. 1992. *Environmental Physiology of the Amphibians*. The University of Chicago Press. Chicago, USA. 646 p.
- Fitzpatrick, L.C. 1973. Influence of seasonal temperatures on the energy budget and metabolic rate of the northern two-lined salamander, *Eurycea bislineata bislineata*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 45: 807-818.
- Freed, A. N. 1980. An adaptive advantage of basking behavior in an anuran amphibian. *Physiological Zoology*: 53:433-444.
- Fromm, P. O. 1956. Heat production of frogs. *Physiological Zoology* 29:234-240.
- Gatten, R.E., Jr., Miller, K., Full, R.J. 1992. Energetics at rest and during locomotion. In *Environmental physiology of the amphibians*, ed. M.E. Feder and W.W. Burggren, 314–77. Chicago: University of Chicago Press.
- Gates, D.M. 1980. *Biophysical Ecology*. New York, Springer-Verlag.
- Geise, W., Linsenmair, K.E. 1986. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. II. Some aspects of the water economy of *Hyperolius viridiflavus nitidulus* under wet and dry season conditions. *Oecologia* 68:542-548.
- Gerhardt, H.C. 1994. Evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 293-324.

- Gibert, P., Huey, R.B. 2001. Chill-coma temperature in *Drosophila*: Effects of developmental temperature, latitude, and phylogeny. *Physiological Biochemistry and Zoology* 74: 429-434.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L. 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293: 2248-2251.
- Gouveia, S.F., Hortal, J., Tejedo, M., Duarte, H., Cassemiro, F.A.S., Navas, C.A., Diniz-Filho, J.A.F. 2013. Climatic niche at physiological and macroecological scales: the thermal tolerance-geographical range interface and niche dimensionality. *Global Ecology and Biogeography*, 23(4): 446-456.
- Gvoždík, L. 2003. Postprandial thermophily in a Danube crested newt, *Triturus dobrogicus*. *Journal of Thermal Biology* 28: 545–550.
- Hammond, L.M., Hofmann, G.E. 2010. Thermal tolerance of *Strongylocentrotus purpuratus* early life history stages: mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Marine Biology* 157: 2677-2687.
- Hazell, S.P., Pedersen, B.P., Worland, R., Blackburn, T.M., Bale, J.S. 2008. A method for the rapid measurement of thermal tolerance traits in studies of small insects. *Physiological Entomology* 33: 389-394.
- Heath, J. E. 1964. Reptilian thermoregulation: evaluation of field studies. *Science* 146: 784–785.
- Heatwole, H., de Austin, S.B., Herrero, R. 1968. Heat tolerances of tadpoles of two species of tropical anurans. *Comparative Biochemistry and Physiology* 27: 807-815.
- Hertz, P. E., R. B. Huey, and R. D. Stevenson. 1993. Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question. *The American Naturalist* 142: 796-818.
- Hillman, S.S., Withers, P.C., Drewes, R.C., Hillyard, S.D. 2009. *Ecological and environmental physiology of amphibians*. Oxford University Press, New York. 469 p.
- Huey, R.B., Crill, W.D., Kingsolver, J.G., Weber, K.E. 1992. A method for rapid measurement of heat or cold resistance of small insects. *Functional Ecology* 6: 489-494.
- Huey, R.B., Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Vitt, L.J., Hertz, P.E., Álvarez Pérez, H.J., Garland Jr, T. 2009. Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proceedings of the Royal Society London B* 276: 1939-1948.
- Huey, R.B., Stevenson, R.D. 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. *Am Zool* 19:357–366.
- Hutchison, V. H., Dowling, H. G. Vinegar, A. 1966. Thermoregulation in a brooding female Indian python, *Python molurus bivittatus*. *Science* 151: 694-696.

- Hutchison, V.H., Hill, L.G. 1976. Thermal selection in the hellbender, *Cryptobranchus alleganiensis*, and the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *Herpetologica* 32: 327-331.
- Hutchison, V.H., Dupré, R.K. 1992. Thermoregulation, 206-249 pp. *In* Environmental Physiology of the Amphibians. Martin E. Feder e Warren W. Burggren (eds.). Chicago: University of Chicago Press. 646 p.
- Iga, T., Bagnara, J.T. 1975. Analysis of color change phenomena in leaf frog, *Agalychnis dacnicolor*. *Journal of Experimental Zoology* 192: 331-341.
- Ireland, P.H. 1976. Reproduction and larval development of the gray-bellied salamander *Eurycea multiplicata griseogaster*. *Herpetologica* 32: 233-238.
- Jenkins, J.L., Swanson, D.L. 2005. Liver glycogen, glucose mobilization and freezing survival in chorus frogs, *Pseudacris triseriata*. *Journal of Thermal Biology* 30: 485-494.
- John-Alder, H.B., Morin, P.J. and Lawler, S. 1988. Thermal physiology, phenology and distribution of tree frogs. *American Naturalist*. 132: 506-520.
- King, P.A., Rosholt, M.N., Storey, K.B. 1995. Seasonal changes in plasma membrane glucose transporters enhance cryoprotectant distribution in the freeze-tolerant wood frog. *Canadian Journal of Zoology* 73: 1-9.
- Klok, C.J., Chown, S.L. 1997. Critical thermal limits, temperature tolerance and water balance of a sub-Antarctic caterpillar, *Pringleophaga marioni* (Lepidoptera: Tineidae). *Journal of Insect Physiology* 43: 685-694.
- Klok, C.J., Chown, S.L. 2001. Critical thermal limits, temperature tolerance and water balance of a sub-Antarctic kelp fly, *Paractora dreuxi* (Diptera, Helcomyzidae). *Journal of Insect Physiology* 47: 95-109.
- Kluger, M.J. 1977. Fever in the frog *Hyla cinerea*. *Journal of Thermal Biology* 2: 79-88.
- Kluger, M.J., Kozak, W., Conn, C.A., Leon, L.R., Soszynski, D. 1998. Role of fever in disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 856: 224-233.
- Kobelt, F., Linsenmair, K.E. 1986. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. I. The skin of *Hyperolius viridiflavus nitidulus* in wet and dry season conditions. *Oecologia* 68: 533-541.
- Kobelt, F., Linsenmair, K.E. 1992. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia: Anura: Hyperoliidae) to its arid environment. VI. The iridophores in the skin as radiation reflectors. *Journal of Comparative Physiology B* 162: 314-26.
- Kohlsdorf, T., Navas, C.A. 2006. Ecological constraints on the evolutionary association between field and preferred temperatures in Tropidurinae lizards. *Evolutionary Ecology* 20: 549-564.

- Konarzewski, M., Ksiazek, A. 2013. Determinants of intra-specific variation in basal metabolic rate. *Journal of Comparative Physiology* 183: 27-41.
- Kuzmin, S.L. 1999. *The amphibians of the former Soviet Union*. Sofia, Bulgaria: Pensoft.
- Ladyman, M., Bradshaw, S.D. 2003. The influence of dehydration on the thermal preferences of the Western tiger snake, *Notechis scutatus*. *Journal of Comparative Physiology B* 173: 239-246.
- Lee, R.E., Denlinger, D.L. 1991. *Insects at Low Temperature*. New York: Chapman and Hall.
- Licht, P. 1964. The temperature dependence of myosin adenosine triphosphate and alkaline phosphatase in lizards. *Comparative Biochemistry and Physiology* 12: 331-341.
- Lighton, J.R.B., Turner, R.J. 2004. Thermolimit respirometry: an objective assessment of critical thermal maxima in two sympatric desert harvester ants, *Pogonomyrmex rugosus* and *P. californicus*. *Journal of Experimental Biology* 207: 1903-1913.
- Lillywhite, H.B. 1970. Behavioral thermoregulation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1970: 158-168.
- Lillywhite, H.B., Licht, P., Chelgren, P. 1973. The role of behavioral thermoregulation in the growth energetics of the toad, *Bufo boreas*. *Ecology* 54: 375-383.
- Lillywhite, H.B., Licht, P. 1975. A comparative study of integumentary mucous secretions in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 51:937-941.
- Logan J. D., Joern A., and Wolessky W. 2002. Location, time, and temperature dependence of digestion in simple animal tracts. *J. Theor. Biol.* 216: 5-18.
- Lutterschmidt, W.I., Hutchison, V.H. 1997a. The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1561-1574.
- Lutterschmidt, W.I., Hutchison, V.H. 1997b. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1553-1560.
- Mahoney, J.J., Hutchison, V.H. 1969. Photoperiod acclimation and 24-hour variations on the critical thermal maxima of a tropical and a temperate frog. *Oecologia* 2: 143-161.
- Marcellini D.L., Peters, A. 1982. Preliminary observations on endogenous heat production after feeding in *Python molurus*. *Journal of Herpetology* 16: 92-5.
- Marunouchi, J., Ueda, H., Ochi, O. 2000. Variation in age and size among breeding populations at different altitudes in the Japanese newts, *Cynops pyrrhogaster*.

Amphibia-Reptilia 21: 381-396.

McColl, G., Hoffmann, A.A., McKechnie, S.W. 1996. Response of two heat shock genes to selection for knockdown heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 143: 1615-1627.

McGinnis, S.M., Moore, R.G. 1969. Thermoregulation in the boa constrictor *Boa constrictor*. *Herpetologica* 25: 38-45.

Mendelson, Jr. III, Lips, K.R., Gagliardo, R.W., Rabb, G.B., Collins, J.P., et al. 2006. Confronting amphibian declines and extinctions. *Science* 313: 48.

Miller, K., Packard, G.C. 1977. An altitudinal cline in critical thermal maxima of chorus frogs (*Pseudacris triseriata*). *American Naturalist* 111: 267-277

Mitchell, K., Hoffmann, A.A. 2010. Thermal ramping rate influences evolutionary potential and species differences for upper thermal limits in *Drosophila*. *Functional Ecology* 24: 694-700.

Moore, J.A. 1939. Temperature and rates of development in the eggs of Amphibia. *Ecology* 20(4): 459-478.

Morrison, C., Hero, J-M. 2003. Altitudinal variation in growth and development rates of tadpoles of *Litoria chloris* and *Litoria pearsoniana* in southeast Queensland, Australia. *Journal of Herpetology* 37: 59-64.

Myhre, K., Cabanac, M., Myhre, G., 1977. Fever and behavioural temperature regulation in the frog *Rana esculenta*. *Acta Physiologica Scandinavica* 101: 219-229.

Navas, C.A. 1996a. Implications of microhabitat selection and patterns of activity on the thermal ecology of high elevation neotropical anurans. *Oecologia* 108: 617-626.

Navas, C.A. 1996b. The effect of temperature on the vocal activity of anurans: a comparison of high and low-elevation species. *Journal of Herpetology* 30(4): 488-497.

Navas, C.A. 1996c. Thermal Dependency of Field Locomotor and Vocal Performance of High-Elevation Anurans in the Tropical Andes. *Journal of Herpetology* 30(4): 478-487.

Navas, C.A. 1997. Thermal extremes at high elevations in the Andes: physiological ecology of frogs. *Journal of Thermal Biology* 22: 467-477.

Navas, C.A., Araújo, C. 2000. The use of agar models to study amphibian thermal ecology. *Journal of Herpetology* 34 (2): 330-334.

Navas, C.A. 2003. Herpetological diversity along Andean elevational gradients: Links with physiological ecology and evolutionary physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 133: 469-485.

Navas, C.A., Otani, L. 2007. Physiology, environmental change, and anuran

conservation. *Phyllomedusa* 6: 83-103.

Navas, C.A., Antoniazzi, M.M., Carvalho, J.E., Suzuki, H., Jared, C. 2007. Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosis* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 147: 647-657.

Navas, C.A., Gomes, F.R., Carvalho, J.E. 2008. Thermal relationships and exercise physiology in anuran amphibians: integration and evolutionary implications. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 151: 344-362.

Nietfeldt, J.W., Jones, S.M., Droge, D.L., Ballinger, R.E. 1980. Rate of thermal acclimation in larval *Ambystoma tigrinum*. *Journal of Herpetology* 14: 209-211.

Nussear, K.E., Simandle, E.T., Tracy, C.R. 2000. Misconceptions about color, infrared radiation, and energy exchange between animals and their environments. *Herpetological Journal* 10: 119-122.

Olsson, M., Uller, T. 2002. Developmental stability and genetic architecture: A comparison within and across thermal regimes in tadpoles. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 625-633.

Olsson, M., Uller, T. 2003. Thermal environment, survival and local adaptation in the common frog, *Rana temporaria*. *Evolutionary Ecology Research* 5: 431-437.

Orr, P.R. 1955. Heat Death. II. Differential response of entire animal (*Rana pipiens*) and several organ systems. *Physiological Zoology* 28(4): 204-302.

Parmesan, C. 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Reviews of Ecology Evolution and Systematic* 37: 637-669.

Parmesan, C. 2007. Influences of species, latitudes and methodologies on estimates of phenological response to global warming. *Global Change Biology* 13:1860–1872.

Partridge, L., French, V. 1996. Thermal evolution of ectotherm body size: Why get big in the cold? *In* *Animals and temperature*, ed. I.A. Johnston & A.F. Bennett, 265–92. New York: Cambridge University Press.

Passmore, N.I., Malherbe, H. 1985. High nocturnal body temperature in the painted reed frog (*Hyperolius marmoratus*). *Herpetologica* 41: 212-215.

Peterson, C.R., Gibson, A.R., Dorcas, M.E. 1993. Snake thermal ecology: The causes and consequences of body-temperature variation. *In* *Snakes: Ecology and Behavior*. R.A. Seigel and J.T. Collins (eds.). McGraw-Hill, New York, NY. pp. 241–314.

Petranka, J.W. 1979. The effects of severe winter weather on *Plethodon dorsalis* and *Plethodon richmondi* populations in central Kentucky. *Journal of Herpetology* 13: 369-371.

- Pinder, A.W., Storey, K.B., Ultsch, G.R. 1992. Estivation and hibernation. *In* Environmental physiology of the amphibians, ed. M. E. Feder and W. W. Burggren, 250–74. Chicago: University of Chicago Press.
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore, J.E. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96: 9-15.
- Pitkin, R.B. 1978. Effects of temperature on nitrogen excretion of the red-spotted newt. *American Zoologist* 18:671.
- Pounds, J.A. 2001. Climate and amphibian decline. *Nature* 410: 639-640.
- Pounds, J.A., Carnaval, A.C., Puschendorf, R., Haddad, C.F.B., Masters, K.L. 2006. Responding to amphibian loss. *Science* 314: 1541-1542.
- Porter, K.R. 1972. *Herpetology*. W.B. Saunders. Co., Philadelphia. 524 pp.
- Pough, F.H. 1980. The advantages of ectothermy for tetrapods. *The American Naturalist* 115: 92-112.
- Pough, F.H. 1983. Amphibians and reptiles as low-energy systems. 141-188 pp., *In* Aspey, W.P., Lustick S.I (eds.). *Behavioral Energetics: The Cost of Survival in Vertebrates*. Ohio State University Press: Columbus.
- Pough, F.H., Magnusson, W.E., Ryan, M.J., Wells, K.D., Taigen, T.L. 1992. Behavioral energetics. pp. 395–436, *In* Feder, M.E., Burggren, W.M. (Eds.), *Environmental Physiology of the Amphibians*. The Univ. Chicago Press, Chicago.
- Pough, F.H., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitzky, A.H., Wells, K.D. 2001. *Herpetology*. Prentice-Hall, NJ: Prentice-Hall Inc, New York. 736 p.
- Powell, M.K., Mansfield-Jones, J., Gatten, R.E. 1999. Specific dynamic effect in the horned frog *Ceratophrys cranwelli*. *Copeia* 1999: 710-717.
- Pyron, R.A. 2011. Divergence Time Estimation Using Fossils as Terminal Taxa and the Origins of Lissamphibia. *Syst. Biol.* 60(4):466–481.
- Ramløv, H. 2000. Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Human Reproduction* 15: 26-46.
- Regal, P.J. 1966. Thermophilic responses following feeding in certain reptiles. *Copeia* 1966: 588-590.
- Rezende, E.L., Santos, M. 2012. Comment on ‘Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures’. *The Journal of Experimental Biology* 215, 702-703.
- Ribeiro, P.L., Camacho, A., Navas, C.A. 2012. Considerations for assessing maximum critical temperatures in small ectothermic animals: insights from leaf-cutting ants. *Plos One* 7(2): e32083.

- Richards-Zawacki, C.L. 2010. Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. *Proceedings of Royal Society B* 277: 519-528.
- Rome L.C., Stevens, E.D., John-Alder, H.B. 1992. The influence of temperature and thermal acclimation on a physiological function. pp. 183-205, *In Environmental physiology of the amphibians*. Feder, M.E. & Burggren W.W. (eds.), University of Chicago Press, Chicago.
- Rowley, J.J.L., Alford, R.A. 2013. Hot bodies protect amphibians against chytrid infection in nature. *Nature* 3: 1515.
- Rudh, A, Qvarnström, A. 2013. Adaptive colouration in amphibians. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24:553-561.
- Schmid, W.D. 1965. High temperature tolerances of *Bufo hemiophrys* and *Bufo cognatus*. *Ecology* 46: 559-560.
- Schmid, W.D. 1982. Survival of frogs at low temperature. *Science* 215: 697-698.
- Schmuck, R., Linsenmair, K.E. 1988. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. III. Aspects of nitrogen metabolism and osmoregulation in the reed frog *Hyperolius viridiflavus taeniatus*, with special reference to the role of iridophores. *Oecologia* 75:354–61.
- Secor S.M., Faulkner, A.C. 2002. Effects of meal size, meal type, body temperature, and body size on the specific dynamic action of the marine toad, *Bufo marinus*. *Physiological Biochemistry and Zoology* 75: 557-571.
- Secor, S.M., Wooten, J.A., Cox C.L., 2007. Effects of meal size, meal type, and body temperature on the specific dynamic action of anurans. *Journal of Comparative Physiology B* 177: 165-182.
- Secor, S.M. 2009. Specific dynamic action, a review of the postprandial metabolic response. *Journal of Comparative Physiology B* 179: 1-56.
- Seibel, R.V. 1970. Variables affecting the critical thermal maximum of the leopard frog, *Rana pipiens* Schreber. *Herpetologica* 26: 208-213.
- Segura, E.T., Varsavsky, A., Petriella, S. 1987. Effects of temperature and general anesthesia on the water gain and the inulin space of the brain of a toad. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 88: 331-334.
- Shcherbak, N.N., Kovalyukh, N.N. 1973. Age of a living amphibian *Hynobius keyserlingi* dug out from ice. *Doklady Akademia Nauk SSSR* 211: 359-360.
- Sherwood, S., Fu, Q. 2014. A drier future. *Science*, 343:737-739.
- Shoemaker, V.H., Baker, M.A., Loveridge, J.P. 1989. Effect of water balance on thermoregulation in waterproof frogs (*Chiromantis* and *Phyllomedusa*). *Physiological Zoology* 62: 133-146.

- Shoemaker, V.H., McClanahan, L.L., Withers, P.C., Hillman, S.S., Drewes, R.C. 1987. Thermoregulatory response to heat in the waterproof frogs *Phyllomedusa* and *Chiromantis*. *Physiological Zoology* 60: 365-372.
- Shoemaker, V. H., Hillman, S.S., Hillyard, S.D. Jackson, D.C. McClanahan, L.L. Withers, P.C., Wygoda, M. 1992. Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. *In* *Environmental physiology of the amphibians*, ed. M.E. Feder and W.W. Burggren, 125–50. Chicago: University of Chicago Press.
- Sievert, L.M., Andreadis, P. 1999. Specific dynamic action and postprandial thermophily in juvenile northern water snakes, *Nerodia sipedon*. *Journal of Thermal Biology* 24: 51-55.
- Silva, G.S.F., Glass, M.L., Branco, L.G.S. 2013. Temperature and respiratory function in ectothermic vertebrate. *Journal of Thermal Biology* 38: 55-63.
- Sinclair, B.J., Klok, C.J., Chown, S.L. 2004. Metabolism of the sub-Antarctic caterpillar *Pringleophaga marioni* during cooling, freezing and thawing. *Journal of Experimental Biology* 207: 1287-1294.
- Skoczylas R. 1970a. Influence of temperature on gastric digestion in the grass snake, *Natrix natrix* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 33: 793-803.
- Skoczylas R. 1970b. Salivary and gastric juice secretion in the grass snake, *Natrix natrix* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 35: 885-903.
- Skoczylas R. 1978. Physiology of the digestive tract. *In*: *Biology of the Reptilia*, vol. 8 Gans, C., Gans, K.A.8 (eds.). Acad. Press, (NY), pp. 589-717.
- Smith, M. 1969. *The British amphibians and reptiles*. Fourth Edition. London: Collins.
- Smith-Gill, S.J., Berven, K.A. 1979. Predicting Amphibian Metamorphosis. *The American Naturalist* 113(4): 563-585.
- Smits, A.W., Flanagin, J.I. 1994. Bimodal respiration in aquatic and terrestrial apodan amphibians. *American Zoologist* 34: 247-263.
- Snyder, G.K., Weathers, W.W. 1975. Temperature adaptations in amphibians. *The American Naturalist* 109: 93-101.
- Spotila, J.R., O'Connor, M.P., Bakken, G.S. 1992. Biophysics of heat and mass transfer. pp. 59-80. *In* *Environmental physiology of the amphibians*, ed. M.E. Feder and W.W. Burggren, Chicago: University of Chicago Press.
- Stevenson R.D., Peterson C.R., Tsuji J.S. 1985. The thermal dependence of locomotion tongue flicking, digestion, and oxygen consumption in the wandering garter snake. *Physiological Zoology* 58: 46-57.

Stiffler, D.F., Talbot, C.R. 2000. Exchanges of oxygen, carbon dioxide, nitrogen and water in the caecilian *Dermophis mexicanus*. *Journal of Comparative Physiology B* 170: 505-509.

Storey, K.B., Storey, J.M. 1986. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze/thaw cycles. *Can. J. Zool.* 64:49–56.

Storey, K.B., Storey, J.M. 1987. Persistence of freeze tolerance in terrestrially hibernating frogs after spring emergence. *Copeia* 1987(3): 720-726.

Storey, K.B., Storey, J.M. 1988. Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews* 68:27-84.

Storey, K.B., Storey, J.M. 1992. Natural freeze tolerance in ectothermic vertebrates. *Annual Review of Physiology* 54: 619-637.

Stevens, M.M., Jackson, S., Bester, S.A., Terblanche, J.S., Chown, S.L. 2010. Oxygen limitation and thermal tolerance in two terrestrial arthropod species. *Journal of Experimental Biology* 213: 2209-2218.

Stuart, L.C. 1951. The distributional implications of temperatura tolerances and hemoglobin values in the toads *Bufo marinus* (Linnaeus) and *Bufo bocourti* Brocchi. *Copeia* 1951: 220-229.

Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786.

Sunday, J.M., Bates, A.E., Kearney, M.R., Colwell, R.K., Dulvy, N.K., Longino, J.T., Huey, R.B. 2014. Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. *PNAS*, doi:10.1073/pnas.1316145111.

Swanson, D.L., Graves, B.M. 1995. Supercooling and freeze intolerance in overwintering juvenile spadefoot toads (*Scaphiopus bombifrons*). *Journal of Herpetology* 29: 280-285.

Tattersall, G.J., Boutilier, R.G. 1997. Balancing hypoxia and hypothermia in cold-submerged frogs. *Journal of Experimental Biology* 200: 1031-1038.

Tattersall, G.J., Boutilier, R.G. 1999. Behavioural oxy-regulation by cold-submerged frogs in heterogeneous oxygen environments. *Canadian Journal of Zoology* 77: 843-850.

Tattersall, G. J., Milsom, W. K., Abe, A. S., Brito, S. P. Andrade, D. V. 2004. The thermogenesis of digestion in rattlesnakes. *Journal of Experimental Biology* 207: 579-585.

Tattersall, G.J., Eterovick, P.C., Andrade, D.V. 2006. Tribute to R.G. Boutilier: Skin colour and body temperature changes in basking *Bokermannohyla alvarengai* (Bokermann, 1956). *Journal of Experimental Biology* 209: 1185-1196.

Tattersall, G.J., Ultsch, G.R. 2008. Physiological Ecology of Aquatic Overwintering in Ranid Frogs. *Biological Reviews* 83: 119-140.

Tejedo, M., Duarte, H. Gutiérrez-Pesquera, L.M. Beltrán, J. F., Katzenberger, M., Marangoni, F., Navas, C.A. Nicieza, A.G., Relyea, R.A., Rezende, E.L., Richter-Boix, A., Santos, M., Simon, M., Solé, M. 2012. El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 23: 1-26.

Temple, G.K., Johnston, I.A. 1998. Testing hypotheses concerning the phenotypic plasticity of escape performance in fish of the family Cottidae. *Journal of Experimental Biology* 201: 317-331.

Terblanche, J.S., Deere, J.A., Clusella-Trullas S., Janion, C., Chown, S.L. 2007. Critical thermal limits depend on methodological context. *Proceedings of the Royal Society London B* 274: 2935-2942.

Terblanche, J.S., Hoffmann, A.A., Mitchell, K.A., Rako, L., le Roux, P.C., Chown, S.L. 2011. Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *Journal of Experimental Biology* 214: 3713-3725.

Tiley, S.G. Life histories and comparative demography of two salamander populations. *Copeia* 1980: 806-821.

Touzeau, T., Sievert, L.M. 1993. Postprandial thermophily in rough green snakes (*Opheodrys aestivus*). *Copeia* 1993: 1174-1176.

Tracy, C.R., Christian, K.A., Tracy, R. 2010. Not just small, wet, and cold: effects of body size and skin resistance on thermoregulation and arboreality of frogs. *Ecology*: 91(5): 1477–1484.

Tracy, C.R., Laurence N., Christian, K.A. 2011. Condensation onto the skin as a means for water gain by tree frogs in tropical Australia. *The American Naturalist* 178: 553-558.

Tracy, C.R., Tixier, T., Noene, C.L., Christian, K.A. 2014. Field hydration state varies among tropical frog species with different habitat use. *Physiological and Biochemical Zoology* 87(2): 197-202.

Spitzen-Van Der Sulijis, A., Martel, A., Hallmann, C. A., Bosman, W., Garner, T. W. J., Van Rooij, P., Jooris, R., Haesebrouck, F., Pasmans, F. 2014. Environmental Determinants of Recent Endemism of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infections in Amphibian Assemblages in the Absence of Disease Outbreaks. *Conservation Biology*. doi: 10.1111/cobi.12281

Vitt, L. J., Caldwell, J.P. 2009. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Third Edition. Burlington, Massachusetts, USA: Academic Press.

Wallace, H., Badawy, G.M.I., Wallace, B.M.N. 1999. Amphibian sex determination

and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 901-909.

Warburg, M.R., Degani, G. 1979. Evaporative water loss and uptake in juvenile and adult *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia: Urodela). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 62: 1071-1075.

Wells, K.D., Taigen, T.L. 1986. The effect of social interactions on calling energetics in the gray treefrog (*Hyla versicolor*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 19: 9-18.

Wells, K.D. 2007. *The Ecology and Behavior of Amphibians*: NHBS - Kentwood D Wells, University of Chicago, IL: University of Chicago Press. 1400 p.

White, C. R., Phillips, N. F., Seymour, R.S. 2006. The scaling and temperature dependence of vertebrate metabolism. *Biology Letters* 2: 125-127.

White, C.R., Kearney, M.R. 2013. Determinants of inter-specific variation in basal metabolic rate. *Journal of Comparative Physiology B* 183: 1-26.

Willians, A.A., Wygoda, M.L. 1993. Dehydration stimulates behavioral hypothermia in the Gulf Coast Toad, *Bufo valliceps*. *Journal of Thermal Biology* 18: 223-227.

Wilson, R.S., Franklin, C.E. 2000. Inability of adult *Limnodynastes peronii* (Amphibia: Anura) to thermally acclimate locomotor performance. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 127: 21-28.

Withers, P., Louw, G. Nicholson, S. 1982. Water loss, oxygen consumption and colour change in waterproof' reed frogs (*Hyperolius*). *South African Journal of Science* 78: 30-32.

Withers, P.C. 1993. Metabolic depression during aestivation in the Australian frogs *Neobatrachus* and *Cyclorana*. *Australian Journal of Zoology* 41: 467-473.

Witters, L.R., Sievert, L. 2001. Feeding causes thermophily in the Woodhouse's toad (*Bufo woodhousii*). *Journal of Thermal Biology* 26, 205–208.

Wood, S.C., Malvin, G.M. 1991. Physiological significance of behavioural hypothermia in hypoxic toads (*Bufo marinus*). *Journal of Experimental Biology* 159: 203-215.

Woodhams, D. C., Alford, R. A., Marantelli, G. 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 65-67.

Wygoda, M.L. 1989. A comparative study of heating rates in arboreal and nonarboreal frogs. *Journal of Herpetology* 23: 141-145.

Wygoda, M.L., Kersten, C.A. 2013. Effects of water vapor density on cutaneous resistance to evaporative water loss and body temperature in green tree frogs (*Hyla cinerea*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 86(5): 559-566.

Yang, J., Sun, Y.Y., An, H., Ji, X. 2008. Northern grass lizards (*Takydromus septentrionalis*) from different populations do not differ in thermal preference and thermal tolerance when acclimated under identical thermal conditions. *Journal of Comparative Physiology* 178: 343-349.

CAPÍTULO II

CLIMBING THE ATLANTIC FOREST MOUNTAINS: DO PHYSIOLOGICAL TRAITS OF AMPHIBIANS VARY ALONG ELEVATIONAL GRADIENTS ?

Running Title: Physiological responses to elevational gradients

Rafael P. Bovo^{1*}, Carlos A. Navas², Denis V. Andrade¹

¹*Departamento de Zoologia, c. p. 199, Universidade Estadual Paulista, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil;* ²*Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, travessa 14, 05508-090 São Paulo, Brasil*

**Corresponding author: Phone. 55-19-3526-4292; Fax. 55-19-3526-4300; e-mail address: rpbovo@gmail.com (R.P. Bovo)*

KEYWORDS: Altitude, anurans, ecophysiology, water balance, evaporative water loss, resistance to evaporative water loss, water uptake, thermal tolerances, critical temperatures.

ABSTRACT

Altitudinal gradients are among the most powerful 'natural experiments' for testing the responses of organisms to geophysical factors, such as temperature and water availability. The investigation of physiological changes along elevational gradients may also yield clues on potential organismic future responses in consideration to a scenario of man driven changes in environment and/or climate. Since temperature and humidity are known to change considerably along elevational gradients and are also known to importantly impact the natural history of amphibians, herein we proposed to investigate how physiological traits related to thermal tolerance and water balance in five anuran species vary in function of elevational gradients. The species selected were known to occur at the entire altitudinal range of two mountain ranges of the Brazilian Atlantic Forest, "Serra do Mar" and "Serra da Mantiqueira", and represent diverse phylogenetic affiliation and natural history. Despite the lower magnitude of the altitudinal gradient of these mountain slopes, in comparison to the Andes for example, we still expected to find differences in physiological parameters examined since tropical mountains are also regarded to impose significant physiological challenges. Agreeing to confirmed pattern of temperature declines with altitude increases, we found significant differences in some important physiological traits linked to water balance and thermal tolerance in most of the species herein investigated. Remarkably, critical minimum temperatures, CT_{Min}, and evaporative water loss, EWL, were found to be affected by altitude in a very consistent pattern, whereas other traits tended to be more conservative (skin resistance to water efflux, Rt, water uptake, WU, critical maximum temperatures, CT_{Max}). We also found that larger species exhibit lower CT_{Min}, EWL, WU, CT_{Min}, and higher CT_{Max}, Rt. In addition, indexes associated to thermal tolerances, such as warming tolerance and thermal fundamental niche, indicated that populations living in highlands might be less vulnerable to heat stress compared to their lowland counterparts.

INTRODUCTION

Altitudinal gradients are among the most powerful 'natural experiments' for testing the responses of organisms to geophysical factors, such as temperature and water availability (Korner, 2007; Malhi et al., 2010). The investigation of physiological changes along elevational gradients may also yield clues on potential organismic future responses in consideration to a scenario of man driven changes in environment and/or climate (Buckley, 2013; Buckley et al., 2013; Navas et al., 2013). Notwithstanding that, there is a striking lack of information on how physiological traits vary along altitudinal gradients. This is particularly true for organisms inhabiting the eastern mountains of the South America, which present older age and lower reliefs in comparison to the Andes (Navas 1996, 1997, 2010, 2013). In the specific case of the mountain ranges of the Brazilian Atlantic Forest, the lack of information about changes in physiological traits in function of altitude is especially unfortunate, as the forest covering these mountain ranges present very complex topographical compartmentalization, with sub-areas that vary greatly between one another (Ab'Saber, 2005). These mountain ranges are considered to be the richest world hotspot for amphibian diversity (Gaston and Spicer, 2004; Mittermeier et al., 2005).

Temperature and humidity are known to change considerably along elevational gradients and are also known to importantly impact the natural history of amphibians (Duellman and Trueb, 1996; Wells, 2007, Hillman et al., 2009). Ordinarily, highland environments undergo major daily temperature fluctuations with intense solar radiation during the day and rapid cooling at night (see Navas 1997, 2003, 2006). For the amphibians, as ectotherms, the altitude-related changes in temperature may impose important constraints on thermoregulation (Navas, 1996; 2003). Indeed, mean body temperature (T_b) of tropical montane amphibians decreases linearly with elevation, while intrapopulational variation in T_b increases exponentially with altitude (Snyder and Weathers, 1975; Navas et al, 2013). In terms of thermal tolerance, altitude is inversely related to Minimal Critical Temperature (CTMin) in tropical amphibians, but not in temperate ones (Brattstrom, 1968). On the other hand, the Maximal Critical Temperature (CTMax) seems not to be affected by altitude (Brattstrom, 1968). Finally, we can pinpoint a few other indexes derived from thermal tolerance, such as warming tolerance (WT, Duarte et al., 2012) and thermal fundamental niche (TFN, Tejedo et al., 2012), which have been used to explore differences between amphibian populations/communities (Tejedo et. al., 2012;

Duarte et al., 2012; Simon et al., 2015; Turriago et al., 2015). However, to our knowledge, none of them has ever been applied in a study focused on elevational responses.

Altitude can also affect water availability and the dehydration potential of the environment. As altitude increase, there is a general trend for the environment to become comparatively drier (Wells, 2007, but see Korner, 2007, reporting a non-rule pattern of precipitation tied to altitudinal changes). This may represent an additional drawback for the amphibians thriving in such habitats. Amphibian skin has a limited capacity for water retention, which renders them particularly vulnerable to transepidermal evaporative water loss (EWL; Shoemaker et al., 1992, Spotila et al., 1992, Lillywhite, 2006). Thus, species (or populations) at highlands would, theoretically, be exposed to conditions that are potentially more challenging in terms of water loss through evaporation. Accordingly, on an evolutionary framework, one could anticipate that they might present modifications toward a reduction of EWL compared to those found at lowland. Finally, for the same reasons just pointed, one could expect that species/populations found at high altitude, would exhibit a more rapid rehydration rates than their low altitude counterparts (see Bentley et. al., 1958; Main and Bentley, 1964; Titon and Gomes, unpubl. data).

Herein, we investigated how physiological traits related to thermal tolerance (CTMin, CTMax, warming tolerance, WT, and thermal fundamental niche, TFN) and water balance (EWL, Rt, and WU) in five anuran species vary in function of elevational gradients. The species selected are known to occur at the entire altitudinal range of two mountain ranges of the Brazilian Atlantic Forest, “Serra do Mar” and “Serra da Mantiqueira”, and represent diverse phylogenetic affiliation and natural history. Despite the lower magnitude of the altitudinal gradient of these mountain slopes, in comparison to the Andes for example, we still expected to find differences (as following described) in physiological parameters examined since tropical mountains are also regarded to impose significant physiological challenges (Janzen, 1967). Thus, following our previous arguments, we predicted lower EWL, WU, and CTMin, but higher CTMax for the anuran populations found in higher elevations. Furthermore, we expected that thermal indexes (Warming Tolerance [WT *sensu* Duarte et al, 2012], and Thermal Fundamental Niche, [TFN *sensu* Tejedo et al, 2012]) might indicate that populations inhabiting highlands are less susceptible to heat stress than their lowland counterparts.

MATERIAL AND METHODS

Study sites

Several factors influence climate dynamics, such as latitude, wind, air masses, humidity, rainfall, maritime and continental dimensions, ocean temperatures, and so forth (Korner, 2007). Despite this diversity, altitude is known to be a major component that affects climate characteristics on a very important and consistent way (Korner and Ohsawa, 2005). Here, we recognize the term altitude as the vertical distance, to be measured in meters, between a location on the Earth and the sea level. Since variable history (age) and isolation of mountain biota may affect the mechanisms of physiological and morphological adaptation (Korner, 1989, 1991), we separated the two mountains ranges treated in this study for all the analysis performed.

We carried out our study during the anuran breeding seasons extending from September to February, which encompass the Spring and Summer season of the southern hemisphere, in the years 2011 - 2014. We collected anurans in two mountains ranges at the Brazilian Atlantic Forest: Serra do Mar (SMar) and Serra da Mantiqueira (SMtq) (Figure 1), which share mesic characteristics of tropical and subtropical humid forests. We selected four localities at SMar, and two at SMtq, trying to explore the altitudinal range as much as possible (see Figure 2). Study sites were the following: at SMar, Picinguaba (sea level: -23.364525, -44.826944), Santa Virgínia (820 m: - 23.336200, -45.145917), Cunha (1022 m: -23.235556, -45.021944), Bocaina (1500 m: -22.720017, -44.627133); at SMtq, Taubaté (550 m: -22.947417, -45.745850), Morro dos Marins (1600 m: -22.508533, -45.149167) (Fig. 1). Localities were classified as lowland or highland accordingly to Oliveira-Filho and Fontes (2000).

Study animals

We selected five species from 3 families (Hylidae, Bufonidae, Leptodactylidae) that occur along the entire elevational gradient in both mountain ranges at the Atlantic Forest in Brazil (see *Study sites*). All of our focal species breed in aquatic habitat but occupy from arboreal stratum (*Dendropsophus minutus*, *Hypsiboas faber*, Hylidae), to terrestrial stratum (*Rhinella icterica*, Bufonidae), to the margins of streams and other bodies of water (*Leptodactylus latrans*, *Physalaemus cuvieri*, Leptodactylidae) (Haddad et al., 2013).

After being collected, we housed the animals under natural thermal/humidity regimes (daily temperature range of 22°C–27°C, and air humidity of 45-65%) and photoperiod (about 12L:12D) at the Laboratório de Fisiologia Animal Comparada, at São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil (-22.397331, -47.547799), under license for capture and transport of “Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis” (IBAMA, process numbers 29703-1 and 22028-1), and Secretaria do Meio Ambiente – Instituto Florestal (process number 26018 - 013.054/2011). All experimental procedures were approved by the Ethical Committee in Animal Use (CEUA) affiliated to UNESP, Rio Claro, Biosciences Institute (protocol number 0820).

Phylogenetic control

Given that we worked with a limited number of species (five), a phylogenetic informed analysis would add limited robustness to our interpretations (Blomberg et al., 2003; Revell, 2010). Furthermore, since our main goals were to investigate patterns of interpopulational changes in the selected parameters, the possibility of a confounding effect of phylogenetic influence in our data interpretations were minimal (although we are completely aware of potential limitations of not considering historical factors in our analysis comparisons).

Data collection

Experiments began within 3-5 days after animal capture to minimize any possible acclimation on the parameters of interest. We measured each individual only once for each physiological trait, always in the following sequence: rates of water loss (EWL) and water uptake (WU) within 3-5 days after capture, and CTMin and CTMax within, respectively, 4-6 and 6-8 days after capture. During their period in captivity, we did not feed the animals but water was provided *ad libitum*.

Experiments were performed with adult males and non-gravid females, and we found no significant differences between sexes (t-test, $p > 0.05$ in all cases for CTMin, CTMax, WT, TFN, EWL, Rt, and WU). We did not find significant differences in any physiological traits measured among years (2011-2014) (Durbin-Watson tests for residual independence, $p > 0.05$ in all cases).

Critical temperatures

Critical temperatures often result in the loss of motor response (Cowles and Bogert, 1944) and this event has been largely used in establishing the limits of the thermal tolerance in amphibians (Brattstrom, 1963; 1968; Seibel, 1970; Claussen, 1973; Miller & Packard, 1977; Christian et al., 1988). Prior to critical thermal experiments, we held animals in individual thin polycarbonate containers (five and nine cm of diameter for, respectively, small and large body sizes) covered with nylon net (to ensure rapid thermal equilibrium of the recipient containing the frog with the chamber temperature) placed inside a climate-controlled chamber (EL101/2RS model – Eletrolab) at 25°C for 1 h. To avoid the dehydration of the animals during these tests, we placed a piece of moist paper on the floor of the containers.

Then, we programmed the software Sitrad (version 4.12, Full Gauge Controls) to produce a constant cooling/heating ramp at a rate of 0.1°C/min. We chose these cooling/heating rates in favor to more acute changes (Lutterschmidt and Hutchison, 1997) due to two main reasons: (i) faster rates of temperature change difficult the clear identification of the critical temperatures on the basis of the loss of the righting reflex (see below), as we noticed in a preliminary series of experiments, and; (ii) slower changes in temperature (as the one we chose) are thought to be more ecologically relevant in the measurement of thermal tolerance than more acute trials (Terblanche et al., 2007; Rezende et al., 2011; Terblanche et al, 2011). Both critical temperatures (CTMin and CTMax) were determined by the loss of the righting response of the animals, as did Brattstrom (1968) and Navas et al. (2007) (but see Lutterschmidt and Hutchison, 1997). At this point, we used digital thermometers of quick response (°C; ETI, EcoTemp Model) with an external probe to measure cloacal Tb of larger species (*H. faber*, *R. icterica*, and *L. latrans*), and a T- type thermocouple connected to a TC-1000 meter (Sable Systems) to measure it on the small ones (*D. minutus*, and *P. cuvieri*). We always used surgical gloves to reduce heat transfer from the experimenter hand to the amphibians and temperature readings were taken as quickly as possible after the critical endpoint being established, usually within 5-10 seconds. All animals that died or did not recover within 10 minutes after being subjected to the critical temperatures tests were excluded from the analyses.

Thermal indexes

Warming tolerance ($WT = CT_{max} - T_{max}$, Duarte et al., 2012) is the

difference between the critical thermal maximum (CTMax) of a given organism and the maximum temperature recorded for the environment where it is found (Tmax). This metric indicates the average amount of environmental warming an ectothermic organism can tolerate, thus populations with higher WT should be less impacted by peak temperatures. Originally, Deutsch et al. (2008) described WT as the difference between CTMax and the annual mean temperature of the environment, and not Tmax as did Duarte et al. (2012). We followed this latter approach.

Thermal fundamental niche (TNF, Tejedo et al., 2012) of an organism is the difference between CTMax and CTMin. Populations with larger TFN are expected to be less vulnerable to heat stress due to changes in environmental temperature (Tejedo et al., 2012).

Water balance measurements

Prior to evaporative water loss (EWL) measurements, we held animals in individual PVC containers (four and eight cm of diameter for, respectively, small and large specimens) with 0.5 cm of water, placed inside a climate-controlled incubator (122FC model - Eletrolab) at 25°C for 1 h to ensure that they were fully hydrated at the beginning of the experiment. After this period, each frog was carefully blotted with paper tissue, its urinary bladder was emptied by gently pressing the abdomen, and body mass was recorded (± 0.0001 g). We then placed each individual frog in a circular PVC chamber (8 cm of diameter) and returned it to the climate-controlled incubator. Animal containing chamber was then connected to an automated open flow system through which a pump combined to a mass flow meter (SS-3 Sub-sampler, Sable Systems) delivered a stable airflow at 21.66 cm³/s, with relative humidity controlled at 30% by a RH/Dewpoint Controller (DG-4, Sable Systems). This flow provided 99% of air turnover for the experimental chamber, every 3.5 min (see Lasiewski et al., 1966). The excurrent air from the chamber was continuously monitored by a water vapor analyzer (RH-300 RH/Dewpoint Analyzer, Sable Systems). All equipment were maintained inside the climate-controlled incubator at the experimental temperature of 25°C. Individual frogs were visually inspected during measurements for their posture (important for accurate surface area estimation) and changes in behavior. No abnormal behaviors were observed for any individual before, during, or after measurements. To check the integrity of the system, we always run an empty chamber before and after the experiments.

Changes in relative humidity were interfaced to a computer by an analog/digital unit (UI2 – Sable Systems) and recorded/analyzed using the Expedata software (Sable Systems). The amount of water lost, per animal, per unit of time, was calculated from the increment in water content between the airflow upstream (controlled at 30% RH) and downstream of the animal chamber (measured using the water vapor analyzer). Typically, measurements lasted for 30 minutes (small specimens) or 1 hour (large ones) per individual and for quantitative estimates we selected a period of steady-state readings lasting for at least 10 minutes, typically during the last half of the measurement period. For each animal, the total EWL was then corrected for unit area of exposed skin surface and expressed as $\mu\text{gH}_2\text{O}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. We estimated the exposed surface area of individual amphibians on the basis of their body mass (McClanahan & Baldwin 1969, Young et al. 2005). We also calculated water lost per body mass ($\text{mgH}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) instead of by surface area. In all cases, EWL through the respiratory system was assumed to be negligible (Spotila & Berman 1976, Bentley & Yorrio 1979, Wygoda 1984) and not considered in our estimates.

For each individual frog that had its EWL rate measured, we also estimated the total resistance to water exchange (R_t), which accounts for ambient relative humidity and temperature conditions, as well as surface area, but not for the thickness of the evaporative barrier (Shoemaker et al., 1992; Hillman et al., 2009). Total resistance is the sum of skin and boundary layer resistances, and is expressed in terms of a mass transfer coefficient, i.e., as centimeters of water movement per second ($\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$, see Young et al. 2005)

Immediately after the EWL tests, in which animals usually lost between 2% (large specimens) and 5% (small ones) of their initial body masses, each individual was placed in a Petri dish containing water to a depth of 0.5 cm (small body size) or a circular PVC chamber (identical for EWL measurements) with 1 cm of water (large animals), both sufficient to cover ventral abdominal region (Cree 1988). After that, frogs were carefully blotted with paper tissue and weighed (± 0.0001 g) six consecutive times at 2 min intervals. We calculated water uptake (WU) from the linear regression between body mass increments against time. Then, using the estimated surface area in contact with the water (same equations as above), we calculated the rate of WU per unit of area and expressed it as $\mu\text{gH}_2\text{O}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, and also WU per unit of animal mass ($\text{mgH}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

Environmental data

We collected environmental data placing dataloggers TibBit (Onset, Hobbo®) in open, forested and water bodies in the study sites for the duration of the animal collection expeditions (i.e., 2-4 days). However, we found them to be unreliable due to their limited spatial-temporal series and to the limited thermal variation detected for environments. Thus, as did Buckley et al (2013), we concluded that more complete databases (see below) would be more appropriate for our analysis on climate data.

We downloaded representative temperature and precipitation data for the past fifty years (~1950-2000) from the Worldclim database (www.worldclim.org), for all the localities used for animal collection. Also, we downloaded data for actual and potential evapotranspiration from Willmott & Matsuura (2001). To improve variability of climate data, we created 5-km buffers around each of our six data collection sites in ArcGIS software 10.2.2 (Free Trial), and then we extracted values from pixels in each region.

Data analyses

We performed general linear models in all comparisons. We compared temperature (annual mean, minimum of coldest month, maximum of warmest month, mean diurnal thermal range, and temperature annual range) and precipitation (annual precipitation, precipitation of wettest month, and precipitation of driest month) along elevation quotas (categorical) using one-way analysis of variance (ANOVA).

We did \log_{10} transform our data to perform comparative tests. If data did not meet parametric assumptions, we performed non-parametric tests.

We included body mass as a covariate in ANCOVA tests comparing thermal tolerances (CTMin, CTMax, WT, and TFN) among altitudinal quotas. Whenever body mass was not found to be a significant covariate, we subsequently analyzed the data by t-test or ANOVA (physiological trait as dependent variable, and altitudinal quotas and body mass as independent variables). We compared water balance traits (EWL, Rt, and WU) among altitudinal quotas using ANOVA, since these parameters were corrected for body mass (i.e., units included it).

We used Student's LSD and LS Means Difference Tukey HSD for, respectively, post hoc pairwise and multiple comparisons tests. All tests were performed in R 3.1.0 (R Core Team, 2014). Differences were considered to be significant when p was < 0.05 .

RESULTS

Climate profiles along altitudinal gradients

Mean, minimum and maximum environmental temperatures decreases as elevational gradient increases ($p < 0.001$ in all cases; Figure 3A), confirming highlands at the Atlantic Forest are typically cooler than the lowlands. Also, mean diurnal range and mean annual range for temperatures increased with elevation ($p < 0.05$; Fig. 3C). Precipitation patterns differed between the two mountain ranges. At Serra do Mar (SMar), highlands showed significant lower annual mean precipitation and lower precipitation of the driest month compared to lowlands, whereas precipitation of the wettest month did not change along altitude. At Serra da Mantiqueira (SMtq), highlands showed significantly higher annual mean precipitation and higher precipitation of the wettest month, whereas precipitation of the driest month was lower at the highest altitude ($p < 0.05$ in all cases, Fig. 3B).

Thermal associations

We found that critical thermal minimum (CTMin) decreased significantly with elevational gradient in both mountain ranges ($p < 0.05$ in all cases), except for *H. faber* at SMtq ($F_{1,12} = 4.15$, $p = 0.055$; Fig. 4).

At SMar, critical thermal maximum (CTMax) did not change for *D. minutus*, *L. latrans*, and *P. cuvieri*, whereas *R. icterica* showed lower CTMax at higher elevations ($F_{2,28} = 5.56$, $p < 0.001$, post-hoc test, $Q = 2.47$, $p < 0.05$), and *H. faber* showed higher CTMax at 820m ($F_{2,28} = 5.05$, $p < 0.05$, post-hoc test, $Q = 2.47$, $p < 0.05$) (Fig. 4). At SMtq, CTMax did not change with elevation for *H. faber* and *R. icterica*, whereas *P. cuvieri* showed significant lower CTMax at the highest elevation ($F_{2,10} = 10.07$, $p < 0.05$, Fig. 4), although body mass have influenced CTMax since body mass was lower in the highest elevation. In general, CTMax did not change along altitudinal gradients in most cases.

At SMar, warming tolerance (WT) increased significantly with elevation for four species (*D. minutus*, *H. faber*, *R. icterica*, *L. latrans*; $p < 0.05$ in all cases), except *P. cuvieri* (Fig. 5). At SMtq, WT increased significantly with altitude for *H. faber* and *R. icterica* ($p < 0.05$), but remained unchanged in *P. cuvieri* (Fig. 5). Except for one species (*P. cuvieri*), WT was significantly higher for highland populations.

At SMar, thermal fundamental niche (TFN) increased with altitude for *D.*

minutus, *H. faber*, *L. latrans* ($p < 0.05$ in all cases; Fig. 6), but remained unchanged in *R. icterica* and *P. cuvieri*. At SMtq, TFN increased with altitude for *H. faber* ($p < 0.05$ in all cases), but remained unchanged for *R. icterica* and *P. cuvieri* (Fig. 6). Interspecifically, larger species (*H. faber*, *R. icterica*, and *L. latrans*) showed wider thermal range than smaller species ($F_{4,192} = 181.13$, $p < 0.0001^*$, post-hoc test, $Q = 2.75$, $p < 0.05$; Fig. 6).

Relationship between thermal tolerance and thermal environment

Relationship between thermal tolerances (CTMin and CTMax) and thermal environment (environmental minimum and maximum temperatures, TMin and Tmax, respectively; and also daily and annual thermal range [DTR and ATR, respectively]) are presented in the Table 1. CTMin was highly related to Tmin in all species. CTMin was also highly correlated to DTR and ATR, except in *H. faber*. CTMax was highly correlated to Tmax, DTR, and ATR only in *R. icterica*, but not in the other four species.

Evaporative Water Loss (EWL), Resistance to EWL (Rt), and Water Uptake (WU)

At SMar, *H. faber* and *R. icterica* showed lower EWL at higher altitudes ($p < 0.05$ in both species, and also in both EWL units), whereas *D. minutus* showed higher EWL at 820m of elevation compared to the low elevation at 35m (post-hoc test, $Q = 2.67$, $p < 0.05$ only in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ but not in $\mu\text{gH}_2\text{O}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Fig. 7). At SMtq, *R. icterica* showed lower EWL at highlands (post-hoc test, $Q = 2.47$, $p < 0.05$, Fig. 7). In both mountain ranges, more aquatic species (*L. latrans* and *P. cuvieri*) did not show differences in EWL ($p > 0.05$ in all cases, Fig., 7). Overall, we observed patterns of lower EWL at higher elevations, except for one species (*D. minutus*).

Considering resistance to evaporative water loss (Rt), at SMar, *R. icterica* showed higher Rt at higher elevations ($F_{2,27} = 4.78$, $p < 0.05$, post-hoc test, $Q = 2.47$, $p < 0.05$; Fig. 8). At SMtq, we found no differences in Rt between low and high elevations ($p < 0.05$, Fig. 8).

In general, water Uptake (WU) did not change along altitudinal gradients, except at SMar for *L. latrans* and *P. cuvieri*, with higher WU at higher altitudes ($p > 0.05$ in both cases, Fig. 9).

Relationship between anuran water balance and evapotranspiration

Relationship between water balance traits (EWL, Rt, and WU) and environmental evapotranspiration (potential mean evapotranspiration, PET, actual mean evapotranspiration, AET, maximum PET and AET from the wettest month, and minimum PET and AET from the driest month) are presented in Table 2 and Table 3. Mean PET was more highly correlated to water balance traits of our focal amphibians.

DISCUSSION

General findings

The general trends usually observed for the changes in bioclimatic parameters as a function of changes in altitude (see Korner 2007) were partially confirmed for the mountain ranges herein studied. Indeed, we found that (i) temperature (Tmin Tmean, and Tmax) decreased, and (ii) daily and (iii) annual thermal range increased, with the increase in altitude. On the other hand, we found no clear-cut pattern for changes in rain precipitation with the altitude. Thus, even at the relatively moderate altitudinal range studied, there are recognizable changes in bioclimatic parameters that are potentially relevant for the physiology and ecology of anuran amphibians. Agreeing to this view, we found significant differences in some important physiological traits linked to water balance and thermal tolerance in most of the species herein investigated. Remarkably, CTMin and EWL were found to be affected by altitude in a very consistent pattern, whereas other traits tended to be more conservative (Rt, WU, CTmax). We also found that larger species (*H. faber*, *R. icterica*, and *L. latrans*) exhibit lower CTMin, EWL, WU, CTMin, and higher CTMax, Rt. In addition, indexes associated to thermal tolerances, such as WT and TFN, indicated that populations living in highlands might be less vulnerable to heat stress compared to their lowland counterparts.

Thermal tolerance

The influence of altitude on the thermal tolerance of amphibians has received much less attention than the influence of changes in latitude (Sunday et al., 2011; Araujo et al., 2013). Amphibians generally exhibit a strong adaptive response to cope

with environmental changes in relation to temperature and hydric challenges (Wells, 2007) and are assumed to have their evolutionary history strongly influenced by these factors. However, the influence of temperature or hydric characteristics of the environment on the responses of the amphibians are often difficult, if not impossible, to dissociate because these factors mutually influence each other. Herein, we tested the thermal tolerance of all animals in a fully hydrated state, which adds an important standardization that allow us to explore our data in a comparative way. However, in an ecological framework, such procedure might be misleading since high environmental temperatures are likely to be experienced by the anurans in combination with some level of hydric deficit under natural conditions. Finally, the effects of temperature and water availability on the responses of anurans can be further complicated by the interaction with intrinsic organismal differences related to, for example, differences in body size (herein confirmed), sex (no evidence found), phenotypic plasticity and/or adaptive specializations (an interpretation herein pursued).

CTmax and CTMin in anurans average 37.5°C and 2.8°C, respectively, with no clear influence of body size (see Brattstrom, 1968; Araujo et al., 2013; Sunday et al., 2011). Also, the lowest CTMin and the highest CTMin reported for anurans are, respectively, -4°C for *Anaxyrus (Bufo) cognatus* from Mexico, and *Anaxyrus (Bufo) exsul* from USA (Brattstrom, 1968) and 44.2°C for juveniles of *Rhinella granulosa* from Brazil (Navas et al., 2007), again, with no influence of body size. Herein, we found that both, CTmax and CTMin, of our five focal species fell within the range commonly reported for anuran amphibians. However, differently from other studies (Brattstrom, 1968), we found that larger species (*H. faber*, *R. icterica* and *L. latrans*) exhibited wider range of tolerance (~35.5°C) than smaller ones (~28°C; *D. minutus* and *P. cuvieri*) (Fig. 6). Although we found a marked body size effects on thermal limits and its variability (larger species with lower CTmin, higher CTmax, and also wider thermal range), this pattern may be not clear in other studies simply because studies measuring both CTMin and CTMax are scarce. On the other hand, mechanisms underlying thermal tolerance towards to boundaries/limits seem to take into account other factors, such as phylogeny or local characteristics of the environment (Navas et al., 2013; Araujo et al., 2013). In fact, some studies debate the confusing temperature-size effects (Angilletta et al, 2004), thus thermal limits seem more complex than just body size based.

Low-elevation species or populations generally tolerate slightly higher temperatures for CTMax than do high-elevation counterparts (Brattstrom 1968; Delson and Whitford 1973; Miller and Packard 1977; Hoppe 1978; Christian et al. 1988). However, such response may differ between macroclimatic regions. Indeed, amphibians occurring in altitude regions from temperate areas show a decrease in CTMax (Miller and Packard, 1977; Hoppe 1978; Howard et al., 1983; Brattstrom, 1968 provides an example and an apparent exception), whereas some tropical species fail to show this negative relation between CTMax and altitude (Heatwole et al., 1965; Christian et al., 1988). Thus, our results seem to agree with this latter general pattern, since CTMax was not affected by altitude in any of the species tested, excepted in *R. icterica*. In this latter one, CTMax decreased with altitude in accordance to previous findings (Brattstrom 1968; Delson and Whitford 1973; Miller and Packard 1977; Hoppe 1978; Christian et al. 1988). The tolerance to minimal temperatures, on the other hand, indicated a very consistent trend for CTMin to decrease as altitude increases (but see Christian et. al., 1988). This observation seems to corroborate the view that CTMin might be a more labile trait than CTMax, allowing for more readily adaptive changes (Araujo et al., 2013). Perhaps, higher temperatures (i.e., CTMax) impose mechanistic ceilings that are more rigid and, therefore, more conservative (Sunday et al., 2011; Araujo et al., 2013).

Anurans living at high altitudes often experience temperature changes of several degrees on a daily basis, with changes of more than 10°C sometimes occurring within a few minutes (Carey 1978; Navas 1997, 2003, 2006). Thus, species or populations living at high altitudes are expected to have wider thermal tolerances breadth than those at lowlands, i.e., adaptations toward to eurithermy (Brattstrom, 1963; 1968). This is consistent with our findings, since TFN values found for the species herein studied, were equivalent to other anuran species living at high-altitudes (Brattstrom, 1968). Furthermore, we also found that TNF was significant higher in highland populations compared to lowland counterparts, indicating that whenever the variation in environmental temperature increases (such as towards to high-altitudes), so does the range of temperature tolerance (see also Snyder and Weathers, 1975). This finding seems to corroborate the idea that thermal tolerance, in different groups of ectotherms, is related to the magnitude of temperature variation they normally experience in nature (Janzen, 1967; Addo-Bediako et al., 2000; Ghalambor et al., 2006).

In summary, our results indicate that anuran populations living along the relatively moderate altitudinal range of the Brazilian Atlantic forest exhibit consistent intraspecific changes in thermal tolerance. In general, populations living at higher altitudes seem to broaden their range of thermal tolerance (Hutchison and Dupré), but if this is mostly achieved by adaptive or plasticity change of CT_{Min} remains to be tested.

Water balance

High altitude environments are usually assumed to present a decrease in air humidity (Wells, 2007), although rain precipitation may not vary in a consistent way with altitude (see Korner, 2007). This effect, in combination with changes in other environmental variables, is thought to result in the increase of the potential for evaporative water loss as altitude increase (Bradford, 1984, Wells, 2007). As the majority of the species herein tested exhibited a trend for EWL to decrease as altitude increased (except for one species, *D. minutus*; despite no statistical difference in *L. latrans* and *P. cuvieri*, there is a clear trend of decreased EWL with altitude increase), we suspect that the intraspecific pattern of EWL variation might reflect local adaptation to changes in environmental conditions associated to altitude. However, such an interpretation should be considered with the utmost care, since we fail to identify any consistent change in environmental humidity levels and rain precipitation related to altitude for the mountain ranges examined.

Water loss and, consequently skin resistance, in anurans is known to be affected by habit and habitat use, particularly by the degree of terrestriality (e.g., Wygoda, 1984; Young et al., 2005; Hillman et al., 2009). For instance, individuals belonging to the Bufonidae family, whose members are predominantly terrestrial, have generally low resistance to water loss by evaporation (Wygoda, 1984, Young, 2005). On the other hand, species that depends on strategies inherently riskier to keep water balance (e.g., species with arboreal habits) usually have adaptations to increase the resistance to desiccation, thus reducing EWL (Wygoda, 1984; Lillywhite, 2006). However, for the species examined, we fail to identify any clear correlation between habit and/or habitat use and EWL rates or R_t , indicating that other factors might be at play. Perhaps, the fact that all our focal species share the same macro-habitat (Haddad et al., 2013), even though differing in habit and microhabitat occupancy, may confound the pattern mentioned. Finally, one factor previously

known to affect EWL rates and R_t importantly in anurans is body mass (Spight, 1968; Claussen, 1969; Wygoda, 1984; McNab, 2002; Wells, 2007) and our results corroborated this finding.

Similarly to what happen with studies focusing on EWL in anurans, WU studies have focused majoritarilly on aspects related to differences in habit and habitat uses (Jorgensen, 1997; Wells, 2007) rather than on altitudinal differences. Anurans are able to absorb water quickly through the ventral surface, by the pelvic patch (McClanahan and Baldwin, 1969; Drewes et al., 1977). In general, rates of WU are greater in terrestrial species, which are more susceptible to dehydration, than in aquatic species (Mullen and Alvarado, 1976; Shoemaker and Nagy, 1977, but see exceptions in Main and Bentley, 1964). In this sense, high rates of WU might be especially important in environments where water availability is low and/or ephemeral (Wells, 2007). In regard to altitude, comparisons of Puerto Rican *Eleutherodactylus* from low-altitude (dry) and high-altitude (wet) sites showed no differences significant difference in rehydration rates, suggesting that local populations have not adapted physiologically to different moisture regimes (Van Berkum et al., 1982). Similarly, we did not find differences in WU along the altitudinal gradient of both mountain ranges examined, indicating the absence of local adaptation. However, since we did not find any significant difference in the moisture regimes along the elevational gradient of our study areas, this conclusion lacks support. Similarly, to what we found for EWL, WU was influenced by body mass and, therefore, agreed with the positive allometric pattern of change commonly found for anurans (Mcnab, 2002; Viborg and Rosenkilde, 2004; Viborg and Hillyard, 2005; Viborg et al., 2006).

Concluding remarks

On the track of the emerging field of the Conservation Physiology (Wikelski and Cooke, 2006; Cooke et al., 2013), we are confident that the effects of environmental parameters examined along an ecological gradient (latitudinal, altitudinal, etc.) on physiological capabilities bear the potential to yield valuable data to understand and predict potential consequences and responses of animals to scenarios of man caused changes in habitat and climate.

REFERENCES

- Ab'Saber, A.N. (2005) Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas. Ateliê Editorial, São Paulo.
- Addo-Bediako, A. S., Chown, S. L. & Gaston, K. J. (2000) Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proc. Roy Soc. B*, 267,739-745.
- Angilletta, M.J., Steury, T.D. & Sears, M.W. (2004) Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integr. Comp. Biol.* 44, 498–509.
- Angilletta, M.J. (2009) Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. Oxford University Press.
- Araujo, M.B., Ferri-Yañez, F., et al. (2013) Heat freezes niche evolution. *Ecol. Lett.*, 16, 1206-1219.
- Bentley, P.J.; Lee, A.K. & Main, A.R. (1958) Comparison of dehydration and hydration of two genera of frogs (*Heleioporus* and *Neobatrachus*) that lives in area of varying aridity. *J. Exp. Biol.*, 35, 677-684.
- Bentley, P.J. & Yorio, T. (1979) Evaporative water loss in anuran Amphibia: A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A,1005–1009.
- Blomberg, S.P., Garland T., & Ives, A.R. (2003) Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57, 717-745.
- Bradford, D.E. (1984) Temperature modulation in a high-elevation amphibian, *Rana muscosa*. *Copeia*, 1984, 966-976.
- Brattstrom, B.H. (1963) A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology* 44: 238-255.
- Brattstrom, B.H. (1968) Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24, 93-111.
- Buckley, L.B., Miller, E.F., Kingsolver, J.G. (2013) Ectotherm thermal stress and specialization across altitude and latitude. *Integr. Comp. Biol.*, 53, 571-81.
- Buckley, L.B, Tewksbury, J.J. & Deustch, C.A. (2013) Can terrestrial ectotherms escape the heat of climate change by moving? *Proceedings of the Royal Society B* 280 (1765): 20131149.

- Carey, C. (1978) Factors affecting body temperature of toads. *Oecologia* 35, 197-219.
- Christian, K.A., Nunez, F., Clos, L., & Diaz, L. (1988) Thermal relations of some tropical frogs along an altitudinal gradient. *Biotropica*, 236-239.
- Claussen, D. L. (1969) Studies on water loss and rehydration in anurans. *Physiol. Zool.*, 42,1-14.
- Claussen, D. L. (1973) The thermal relations of the tailed-frog, *Ascaphus truei* and the Pacific treefrog, *Hyla regilla*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44A, 137-153.
- Cooke, S.J.; Sack, L.; et al., (2013) What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conserv. Physiol.*, 1, 1-23.
- Cree A (1988) Water balance responses of the hylid frog *Litoria aurea*. *J. Exp. Zool.* 247,119-125.
- Davies, M. & Withers, P.C. (1993) Morphology and physiology of the Anura. pp. 15–27. In *Fauna of Australia Vol. 2A. Amphibia and Reptilia*. C.J. Glasby, G.J.B. Ross, and P.J. Beesley (eds.). Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia.
- Delson, J., & Whitford, W.G. (1973) Critical thermal maxima in several life history stages in desert and montane populations of *Ambystoma tigrinum*. *Herpetologica*, 29, 352-355.
- Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C. & Martin, P.R. (2008) Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *PNAS*, 105, 6668–6672.
- Drewes, R. C., Hillman, S. S. Putnam, R. W. & Sokol, O. M. (1977) Water, nitrogen and ion balance in the African treefrog *Chiromantis petersi* Boulenger (Anura: Rhacophoridae), with comments on the structure of the integument. *J. Comp. Physiol.*, 116, 257-267.
- Duarte H., Tejado M., Katzenberger M., Marangoni F., Baldo D., et al. (2012) Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Glob. Chang. Biol.*, 18, 412-421.
- Duellman, W.E., & Trueb, L. (1986) *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York.
- Fay D.S. and Gerow K. (2013) *A biologist's guide to statistical thinking and analysis*, WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook,

doi/10.1895/wormbook.1.159.1, <http://www.wormbook.org>.

Gaston, K.J. & Spicer, J.I. (2004) Biodiversity: an introduction. 2nd edition. Blackwell Publishing, Oxford.

Ghalambor, C.; Huey, R.B.; Martin, P.R.; Tewksbury, J.J. & Wang, G; (2006) Are mountain passes higher in the tropics? Janzen's hypothesis revisited. *Integr. Comp. Biol.*, 46,5-17.

Heatwole, H, Mercado, N. & Ortiz, E. (1965) Comparison of critical thermal of two species of Puerto Rican frogs of the genus *Eleutherodactylus*. *Physiol. Zool.*, 38, 1-8.

Heatwole, H., Deaustin, S.B., Herrero, R. (1968) Heat Tolerances of Tadpoles of 2 Species of Tropical Anurans. *Comp Biochem Physiol* 27: 807–815.

Huey, R.B. & Stevenson, R.D. (1979) Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A discussion of approaches. *Am. Zool.*, 19, 357-366.

Haddad, C.F.B.; Toledo, L.F., et al. (2013) Guide to the Amphibians of the Atlantic Forest: Diversity and Biology, 1st ed. Anolis Books, São Paulo.

Hijmans, R.J.; Cameron, S.E.; Parra, J.L.; Jones, P.G. & Jarvis, A. (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Clim.*, 25, 1965-1978.

Hillman, S.S.; Withers, P.C.; Drewes, R.C. & Hillyard, S.D. (2009) Ecological and environmental physiology of amphibians. Oxford University Press.

Hoppe, D. M. (1978) Thermal tolerance in tadpoles of the chorus frog, *Pseudacris triseriata*. *Herpetologica*, 34, 318-321.

Howard, J.H., Wallace, R.L. & Stauffer, J.R. (1983) Critical thermal maxima in populations of *Ambystoma macrodactylum* from different elevations. *J. Herpetol.*, 17, 400–402.

Hutchison, V.H., & Dupré, R.K. (1992) Thermoregulation. pp.206-249. *In* Environmental physiology of the amphibians, M. E. Feder and W. W. Burggren (eds.), Chicago: University of Chicago Press.

Janzen, D.H. (1967). Why mountain passes are higher in the tropics? *Am. Nat.* 101 (919), 233-249.

Jorgensen, C.B. (1997). 200 years of amphibian water economy: From Robert Townson to the present. *Biol. Rev.* 72, 153-237.

- Korner, C. et al. (1989) Functional morphology of mountain plants. *Flora*, 182, 353–383.
- Korner, C. et al. (1991) Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends. *Oecologia*, 88, 30-40.
- Korner, C. & Ohsawa, M. (2005) Mountain Systems. *In Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends (Vol. 1)* (Hassa, R. et al., eds), in pp. 681–716, Island Press.
- Korner, L. (2007) The use of altitude in ecological studies. *Trends in Ecology and Evolution*. 22, 569-574.
- Lasiewski, R.C.; Acosta, A.L. & Bernstei, M.H. (1966) Evaporative water loss in birds. I. Characteristics of open flow method of determination and their relation to estimates of thermoregulatory ability. *Comp. Biochem. Physiol.*, 19, 445-457.
- Lillywhite, H.B. (2006) Water relations of tetrapod integument. *J. Exp. Biol.*, 209, 202-226.
- Lutterschmidt, W.I., & Hutchison, V.H. (1997) The critical thermal maximum: history and critique. *Can. J. Zool.*, 75, 1561-1574.
- Main, A. R. & Bentley, P.J. (1964) Water relations of Australian burrowing frogs and tree frogs. *Ecology*, 45, 379-82.
- Malhi Y, et al. (2010) Introduction: Elevation gradients in the tropics: laboratories for ecosystem ecology and global change research. *Glob. Change Biol.*, 16(12), 3171-3175.
- Mcclanahan, L.L., & Baldwin, R. (1969) Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 28, 381-389.
- McNab, B.K. (2002) *The Physiological Ecology of Vertebrates. A View from Energetics*. Cornell University Press/Comstock, Ithaca, New York.
- Miller, K., & Packard, G.C. (1977) An altitudinal cline in critical thermal maxima of chorus frogs (*Pseudacris triseriata*). *Am. Nat.*, 111, 267-277.
- Mittermeier, R.A. & Fonseca, G.A.B., et al. (2005) A Brief History of Biodiversity Conservation in Brazil. *Conserv. Biol*, 19, 601-607.
- Mullen, T. L., & R. H. Alvarado. (1976) Osmotic and ionic regulation in amphibians.

Physiol. Zool., 49,11-23.

Navas, C.A. (1996) Implications of microhabitat selection and patterns of activity on the thermal ecology of high elevation Neotropical anurans. *Oecologia*, 108, 617-26.

Navas, C.A. (1997) Thermal extremes at high elevations in the Andes: physiological ecology of frogs. *J. Therm. Biol.*, 22, 467-477.

Navas, C.A. (2003) Herpetological diversity along Andean elevational gradients: links with physiological ecology and evolutionary physiology. *Comp. Biochem. Physiol.*, 133(3), 469-485.

Navas, C.A. (2006) Patterns of distribution of anurans in high Andean tropical elevations: Insights from integrating biogeography and evolutionary physiology. *Integr. Comp. Biol.*, 46, 82-91.

Navas, C.A.; Antoniazzi, M.M.; Carvalho, J.E.; Suzuki, H. & Jared, C. (2007) Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosis* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. *Comp. Biochem. Physiol.*, A147, 647-657.

Navas, C.A. Ubeda, C.A., Logares, R. & Jara, F.G. (2010) Thermal Tolerances in Tadpoles of Three Species of Patagonian Anurans. *South Am. J. Herp.*, 5(2), 89-96.

Navas, C.A., Carvajalino-Fernandez, J.M., et al, (2013) The body temperature of active amphibians along a tropical elevation gradient: patterns of mean and variance and inference from environmental data. *Func. Ecol.*, 27, 1145-1154.

Oliveira Filho, A.T. & Fontes, M.A.L. (2000) Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica*, 32, 793-810.

R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>

Revell, L. J. (2010) Phylogenetic signal and linear regression on species data. *Methods in Ecology and Evolution* 1: 319-329.

Rezende, E. L., Tejedo, M. and Santos, M. (2011) Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications. *Funct. Ecol.*, 25, 111-121.

Seibel, R.V. (1970) Variables affecting the critical thermal maximum of the leopard frog, *Rana pipiens* Schreber. *Herpetologica*, 26, 208-213.

Shoemaker, V.H. & McClanahan, L.L. (1975) Evaporative water loss, nitrogen excretion and osmoregulation in phyllomedusine frogs. *J. Comp. Physiol.*, 100, 331-345.

Shoemaker, V.H., & Nagy, K.A. (1977) Osmoregulation in amphibians and reptiles. *Ann. Rev. Physiol.*, 39, 449-471.

Shoemaker, V.H.; Hillman, S.S.; Hillyard, S.D.; Jackson, D.C.; McClanahan, L.L.; Withers, P. & Wygoda, M. (1992) Exchange of water, ions and respiratory gases in terrestrial amphibians. p. 125-150. *Environmental Physiology of the Amphibians*. M. Feder & W. Burggren (eds.). Chicago: University of Chicago Press.

Simon, M.N.; Ribeiro, P.L.; Navas, C.A. (2015) Upper thermal tolerance plasticity in tropical amphibian species from contrasting habitats: Implications for warming impact prediction. *J. Therm. Biol.*, 48, 36-44.

Snyder, G.K., & Weathers, W.W. (1975) Temperature adaptations in amphibians. *Am. Nat.*, 109:93-101.

Spight, T.M. (1968) The water economy of salamanders: Evaporative water loss. *Physiol. Zool.*, 41, 195-203.

Spotila, J.R. & Berman, E.N. (1976) Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 55, 407-411.

Spotila, J.R., O'Connor, M.P. & Bakken, G.S. (1992) Biophysics of heat and mass transfer. pp: 59–80 *In Environmental physiology of the amphibians*, M. E. Feder & W. W. Burggren (eds.). Chicago: University of Chicago Press.

Sunday, J.M., Bates, A.E. & Dulvy, N.K. (2011). Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proc. Biol. Sci.*, 278, 1823-1830.

Tejedo, M.; Duarte, H.; et al. (2012) El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios. *Bol. Asoc. Herpetol. España*, 23, 1-26.

Terblanche, J.S.; Deere, J.A.; et al. (2007) Critical thermal limits depend on methodological context. *Proc. Roy. Soc.* 274(1628): 2935-2942.

Terblanche J.S.; Hoffmann A.A.; Mitchell K.A.; Rako L.; Le Roux P.C. & Chown S.L. (2011) Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *J. Exp. Biol.*, 214, 3713-3725.

Turriago, J.L.; Parra, C.A. & Bernal, M.H. (2015) Upper thermal tolerance in anuran embryos and tadpoles at constant and variable peak temperatures. *Can. J. Zool.*, 93, 267-272.

Van Berkum, F., Pough, F.H., Stewart, M.M. & Brussard, B.F. (1982) Altitudinal and interspecific differences in the rehydration abilities of Puerto Rican frogs (*Eleutherodactylus*). *Physiol. Zool.*, 55, 130-136.

Viborg A.L., & Rosenkilde, P. (2004) Water Potential in the skin blood perfusion in the ventral pelvic patch of toads. *Physiol Biochem Zool*, 77(1), 39-49.

Viborg A.L., & Hillyard S.D. (2005) Cutaneous blood flow and water absorption by dehydrated toads. *Physiol. Biochem. Zool.*, 78, 394-404.

Viborg AL, Wang T., & Hillyard S.D. (2006) Cardiovascular and behavioural changes during water absorption in toads, *Bufo alvarius* and *Bufo marinus*. *J. Exp. Biol.* 209, 834-844.

Wells, K.D. (2007) *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Chicago University Press.

Willmott, C.J. & Matsuura, K. (2001) Terrestrial water budget data archive: monthly time series (1950–1999). University of Delaware, Newark, DE. Available at: http://climate.geog.udel.edu/~climate/html_pages/README.wb_ts2.html

Wikelski, M. & Cooke, S.J. (2006) Conservation physiology. *Trends Ecol. Evol.*, 21, 38-46.

Withers, P.C., Hillmans, S.S., Drewes, R.C., & Soko, O.M. (1982) Water loss and nitrogen excretion in sharp-nosed reed frogs (*Hyperolius nasutus*: Anura, Hyperoliidae). *J. Exp. Biol.*, 97, 335-343.

Wygoda, M.L. (1984) Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. *Physiol. Zool.* 57, 329-337.

Young, J.E.; Christian, K.A.; Donnellan, S.; Tracy, C.R. & Parry, D. (2005) Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. *Physiol. Biochem. Zool.*, 78, 847-856.

TABLE LEGENDS

Table 1. Regressions between thermal tolerances (CTMin and CTMax) and thermal environment (minimum environmental temperature, TMin, and maximum environmental temperatures, Tmax; daily and annual thermal range, DTR and ATR, respectively). *Dmin*: *Dendropsophus minutus*, *Hfab*: *Hypsiboas faber*, *Rict*: *Rhinella icterica*, *Llat*: *Leptodactylus latrans*, *Pcuv*: *Physalaemus cuvieri*. Body masses (range) are shown below the species name acronyms.

Table 2. Regressions between water balance traits (evaporative water loss, EWL; skin resistance, Rt; and water uptake, WU) and mean and maximum actual and potential environmental evapotranspiration (annual mean: *AET mean* and *PET mean*; annual maximum: *AET max*, *PET max*). *Dmin*: *Dendropsophus minutus*, *Hfab*: *Hypsiboas faber*, *Rict*: *Rhinella icterica*, *Llat*: *Leptodactylus latrans*, *Pcuv*: *Physalaemus cuvieri*.

Table 3. Regressions between water balance traits (evaporative water loss, EWL; skin resistance, Rt; and water uptake, WU), and actual (AET) and potential (PET) environmental evapotranspiration, minimum values of the driest month (AET min driest month and PET min driest month), and maximum values of the wettest month (AET max wettest month and PET max wettest month). *Dmin*: *Dendropsophus minutus*, *Hfab*: *Hypsiboas faber*, *Rict*: *Rhinella icterica*, *Llat*: *Leptodactylus latrans*, *Pcuv*: *Physalaemus cuvieri*.

Table 1.

Species body mass range (g)	Statistical results	CTMin x Tmin	CTMin x DTR	CTMin x ATR	CTMax x Tmax	CTMax x DTR	CTMax x ATR
<i>Dmin</i> 0.4 - 0.8	R square	0.181622	0.19	0.18	0.009	0.02	0.02
	<i>P</i> value	0.0028*	0.001*	0.002*	0.48	0.2	0.22
	Slope	0.23	-0.98	-0.92	0.05	-0.27	-0.26
	<i>n</i>	47	47	47	55	55	55
<i>Hfab</i> 41.6 - 90	R square	0.16	0.02	0.03	0.0006	0.01	0.008
	<i>P</i> value	0.004*	0.29	0.2	0.87	0.38	0.54
	Slope	0.09	-0.013	-0.15	-0.006	-0.09	-0.06
	<i>n</i>	46	46	46	45	45	45
<i>Rict</i> 9.23 - 373.23	R square	0.26	0.09	0.11	0.12	0.14	0.13
	<i>P</i> value	<.0001*	0.02*	0.01*	0.01*	0.005*	0.006*
	Slope	0.29	-0.46	-0.5	0.16	-0.35	-0.34
	<i>n</i>	53	53	53	53	53	53
<i>Llat</i> 16.03 - 246.34	R square	0.64	0.5	0.5	0.02	0.03	0.03
	<i>P</i> value	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.38	0.3	0.3
	Slope	0.25	-0.77	-0.75	0.03	-0.11	-0.11
	<i>n</i>	31	31	31	31	31	31
<i>Pcuv</i> 0.97 - 2.72	R square	0.26	0.2	0.2	0.04	0.02	0.03
	<i>P</i> value	0.0013*	0.006*	0.005*	0.29	0.47	0.33
	Slope	0.76	-1.09	-1.11	0.41	-0.29	-0.39
	<i>n</i>	36	36	36	26	26	26

Table 2.

Species	Statistical results	EWL x AET mean	WU x AET mean	Rt x AET mean	EWL x AET max	WU x AET max	Rt x AET max
Dmin	R square	0.04	0.025	0.09	0.02	0.1	0.05
	P value	0.13	0.25	0.02*	0.26	0.01*	0.1
	Slope	-0.01	-0.44	0.06	-0.03	-4.59	0.24
	n	54	54	53	54	54	53
Hfab	R square	0.007	0.008	0.03	0.001	0.01	0.02
	P value	0.56	0.55	0.22	0.83	0.48	0.37
	Slope	0.001	0.35	0.02	0.002	-1.35	0.06
	n	45	42	41	45	42	41
Rict	R square	0.006	0.01	0.0005	0.07	0.02	0.02
	P value	0.57	0.39	0.86	0.04*	0.3	0.3
	Slope	-0.002	0.3	-0.003	-0.02	0.74	0.03
	n	52	51	52	52	51	52
Llat	R square	0.35	0.09	0.17	0.29	0.04	0.19
	P value	0.0002*	0.1	0.01*	0.0008*	0.29	0.008*
	Slope	0.01	-1.09	-0.03	0.07	-3.92	-0.2
	n	33	33	33	33	33	33
Pcuv	R square	0.0002	0.0001	0.001	0.01	0.0001	0.02
	P value	0.92	0.94	0.82	0.51	0.95	0.42
	Slope	0.0006	-0.02	0.002	-0.01	-0.06	0.02
	n	35	29	35	35	29	35

Species	Statistical results	EWL x PET mean	WU x PET mean	Rt x PET mean	EWL x PET max	WU x PET max	Rt x PET max
Dmin	R square	0.003	0.03	0.005	0.006	0.009	0.06
	P value	0.69	0.16	0.6	0.56	0.48	0.06
	Slope	-0.001	0.22	-0.006	0.001	0.09	-0.018
	n	54	54	53	54	54	53
Hfab	R square	0.09	0.007	0.001	0.08	0.01	0.004
	P value	0.03*	0.59	0.81	0.04*	0.39	0.66
	Slope	-0.004	-0.2	-0.003	-0.002	-0.23	-0.004
	n	45	42	41	45	42	41
Rict	R square	0.27	0.001	0.2	0.11	0.004	0.12
	P value	<0.0001*	0.75	0.0008*	0.01*	0.65	0.01*
	Slope	-0.007	0.04	0.02	-0.005	-0.08	0.02
	n	52	51	52	52	51	52
Llat	R square	0.24	0.02	0.19	0.37	0.15	0.14
	P value	0.001*	0.43	0.008*	<0.001*	0.03*	0.02*
	Slope	-0.009	0.41	0.02	-0.006	0.57	0.01
	n	33	33	33	33	33	33
Pcuv	R square	0.09	0.09	0.0001	0.02	0.08	0.01
	P value	0.08	0.08	0.94	0.37	0.09	0.46
	Slope	-0.005	0.33	-0.0004	-0.003	0.32	-0.004
	n	35	29	35	35	29	35

Table 3.

Species	Statistical results	EWL x AET min	WU x AET min	Rt x AET min	EWL x AET max	WU x AET max	Rt x AET max
Dmin	R square	0.04	0.04	0.11	0.05	0.003	0.03
	<i>P</i> value	0.12	0.13	0.01*	0.04*	0.66	0.21
	Slope	-0.1	-5.58	0.69	-0.07	1.07	0.23
	n	54	54	53	54	54	53
Hfab	R square	0.02	0.01	0.02	0.05	0.004	0.03
	<i>P</i> value	0.25	0.44	0.33	0.12	0.68	0.27
	Slope	0.03	4.61	0.21	0.04	2.08	0.2
	n	45	42	41	45	42	41
Rict	R square	0.0005	0.0006	4.10E+05	0.21	0.003	0.14
	<i>P</i> value	0.87	0.86	0.96	0.0005*	0.69	0.006*
	Slope	-0.008	0.65	-0.009	-0.07	0.68	0.24
	n	52	51	52	52	51	52
Llat	R square	0.36	0.11	0.16	0.32	0.23	0.06
	<i>P</i> value	0.0001*	0.04*	0.01*	0.0004*	0.007*	0.14
	Slope	0.13	-11.42	-0.32	0.28	-34.47	-0.43
	n	33	33	33	33	33	33
Pcuv	R square	0.007	0.01	0.004	0.09	0.14	0.0008
	<i>P</i> value	0.64	0.51	0.71	0.08	0.02*	0.87
	Slope	0.03	-2.72	0.05	-0.1	7.47	-0.01
	n	35	29	35	35	29	35

Species	Statistical results	EWL x PET min	WU x PET min	Rt x PET min	EWL x PET min	WU x PET min	Rt x PET min
Dmin	R square	0.006	0.03	0.002	0.01	0.04	1.30E-05
	<i>P</i> value	0.56	0.15	0.69	0.43	0.13	0.98
	Slope	0.05	7.58	-0.15	-0.02	2.26	0.002
	n	54	54	53	54	54	53
Hfab	R square	0.11	0.006	9.60E-05	0.07	0.004	1.83E-05
	<i>P</i> value	0.02*	0.62	0.95	0.06	0.66	0.97
	Slope	-0.14	-5.84	0.02	-0.03	-1.36	0.002
	n	45	42	41	45	42	41
Rict	R square	0.29	0.005	0.19	0.3	0.007	0.19
	<i>P</i> value	<0.0001*	0.61	0.0009*	<0.0001*	0.54	0.001*
	Slope	-0.23	2.24	0.73	-0.05	0.68	0.18
	n	52	51	52	52	51	52
Llat	R square	0.25	0.02	0.19	0.13	0.0004	0.16
	<i>P</i> value	0.0019*	0.44	0.008*	0.02*	0.91	0.01*
	Slope	-0.34	14.9	1.03	-0.07	0.64	0.3
	n	33	33	33	33	33	33
Pcuv	R square	0.07	0.11	0.0004	0.07	0.09	0.003
	<i>P</i> value	0.1	0.04*	0.9	0.11	0.08	0.85
	Slope	0.068	11.64	-0.02	0.051	2.73	0.01
	n	35	29	35	35	29	35

FIGURES

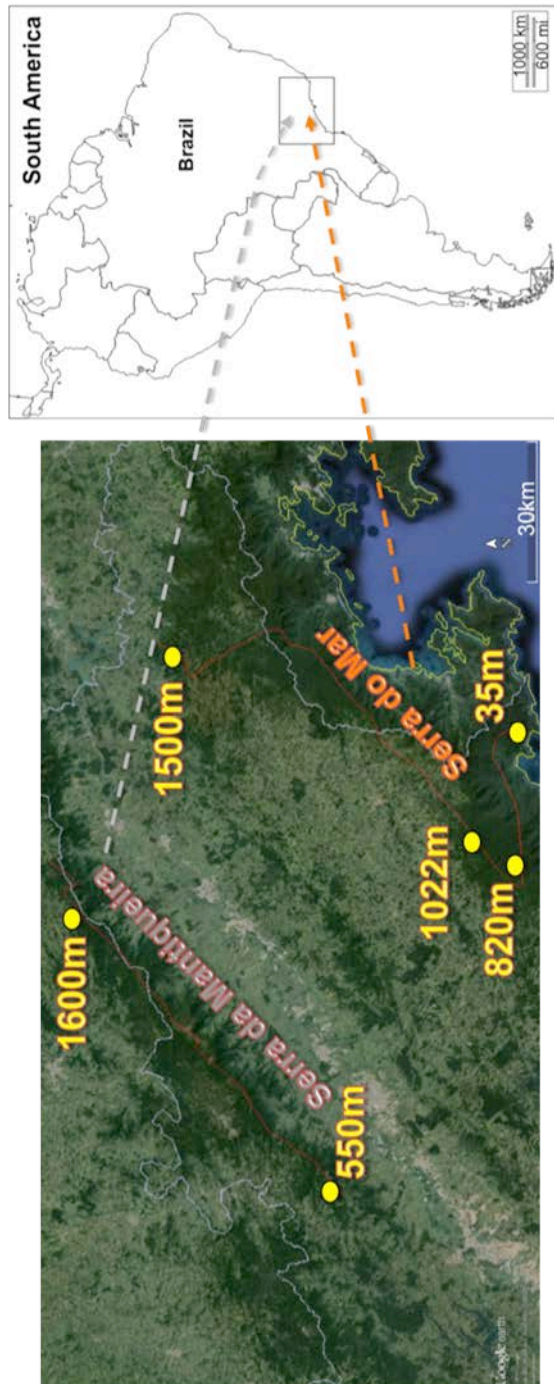


Fig. 1. Map of our study sites. Both mountain ranges, Serra do Mar and Serra da Mantiqueira, are located in the Atlantic Forest domains. Red lines denote the elevational gradient along each mountain range.

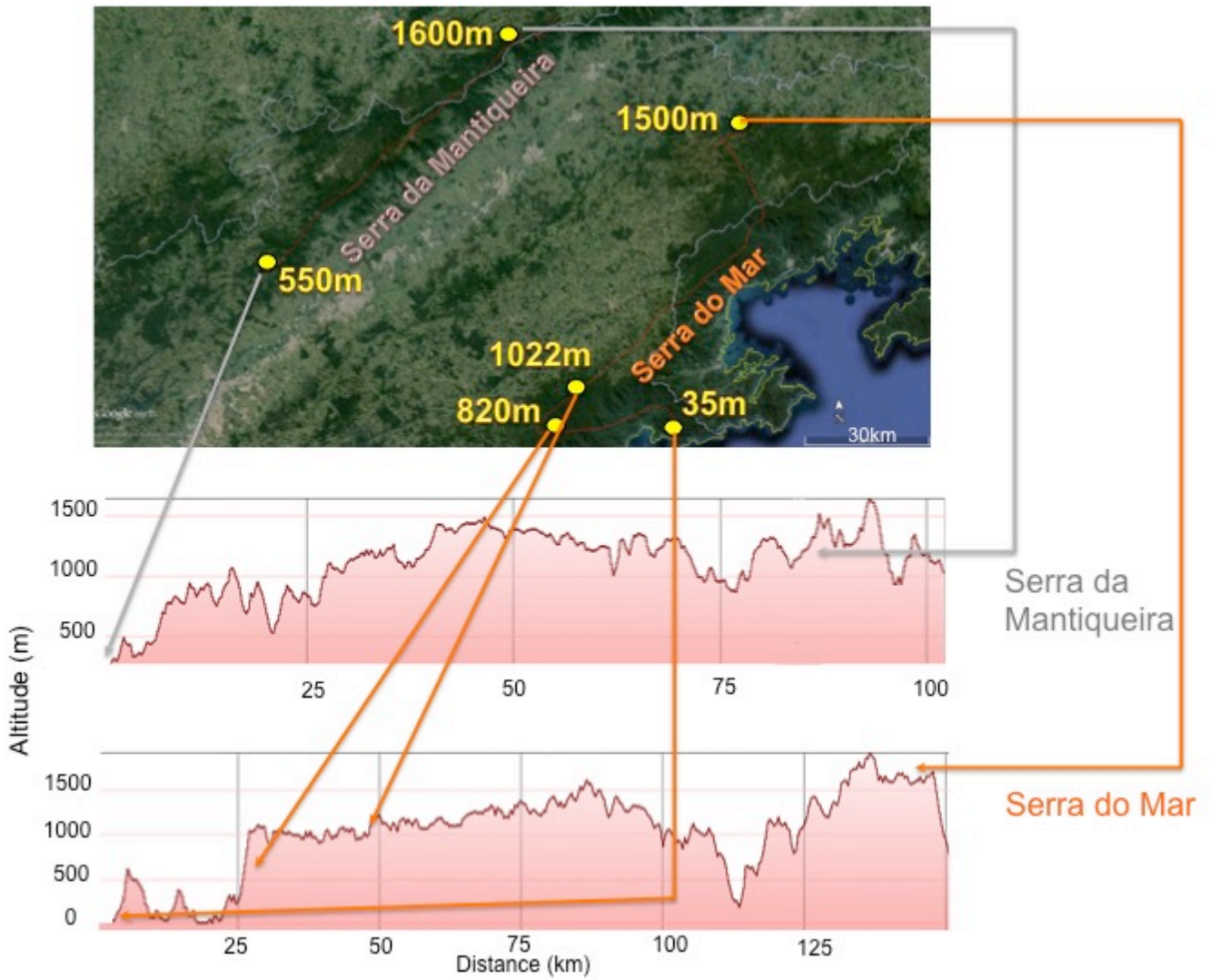


Fig. 2. Altitudinal profiles of our study sites showing we covered significantly the entire elevational gradient for data collection.

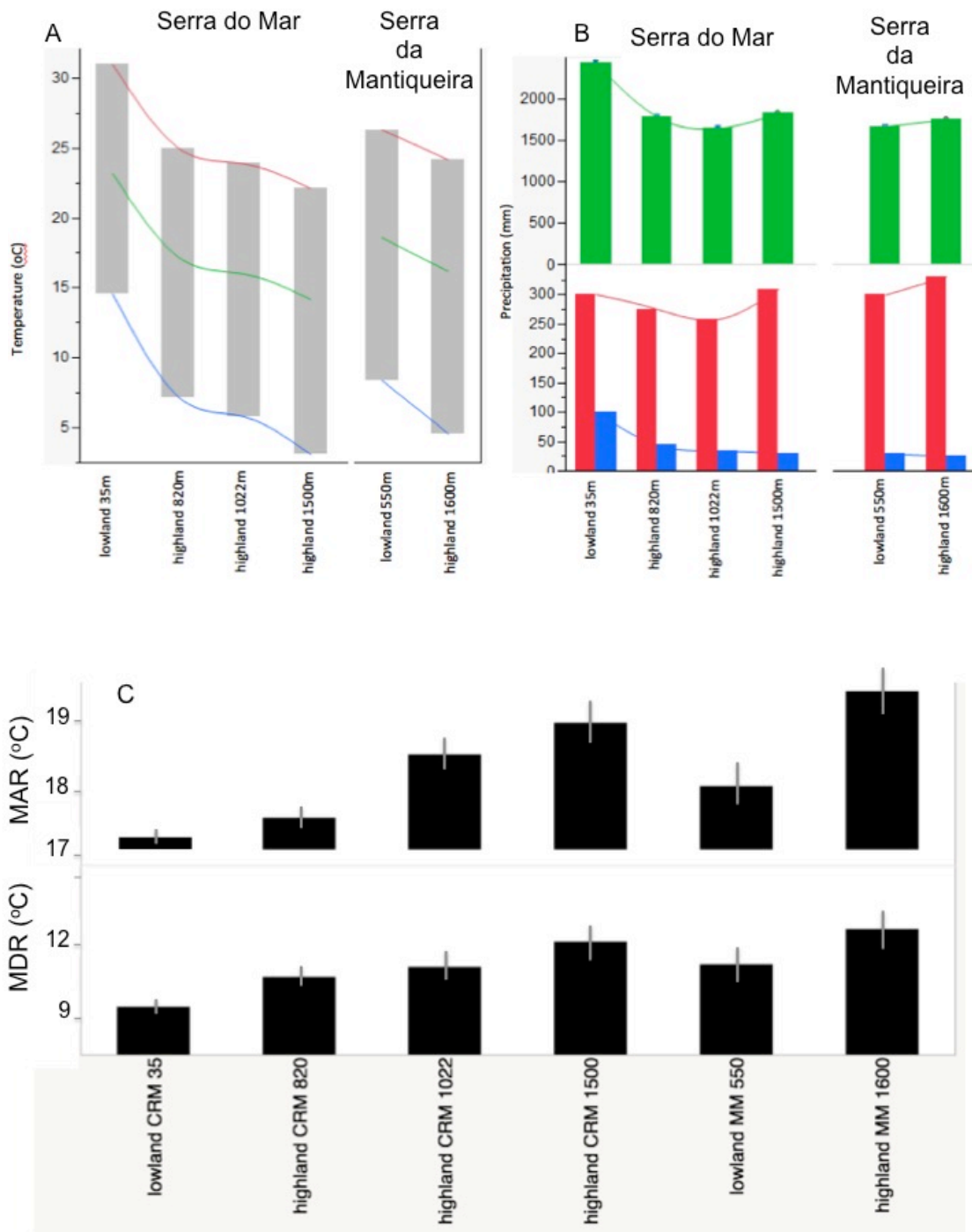


Fig. 3. (A) Minimum temperature of the coldest month (blue line), annual mean temperatures (green line), and maximum temperatures of the warmest month (red line). (B) Annual precipitation (green bars), precipitation of the wettest month (red bars), and precipitation of the driest month (blue bars). (C) Mean diurnal ranges (MDR), and mean annual ranges (MAR) of temperatures of each study site; vertical gray lines crossing the boxes denote standard deviation. See the text for differences in temperature and precipitation among study sites.

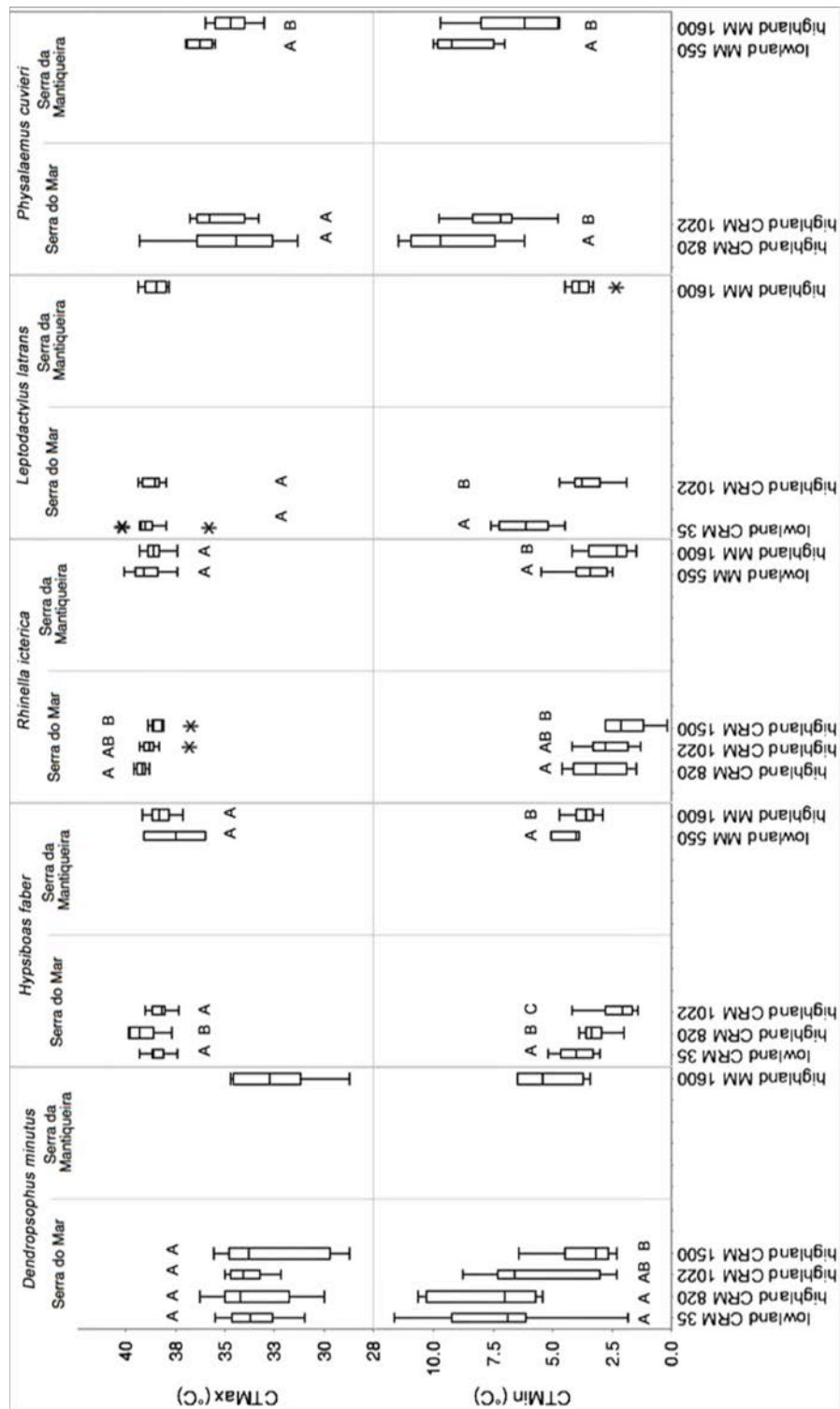


Fig. 4. Critical thermal maximum (CTMax, box plots above) and minimum (CTMin, box plots below) of five anurans along two elevational gradients in the Brazilian Atlantic Forest. Different letters denote significant differences. Asterisks denote outliers. Horizontal lines inside the bars represent means and lines out the boxes denote standard deviation.

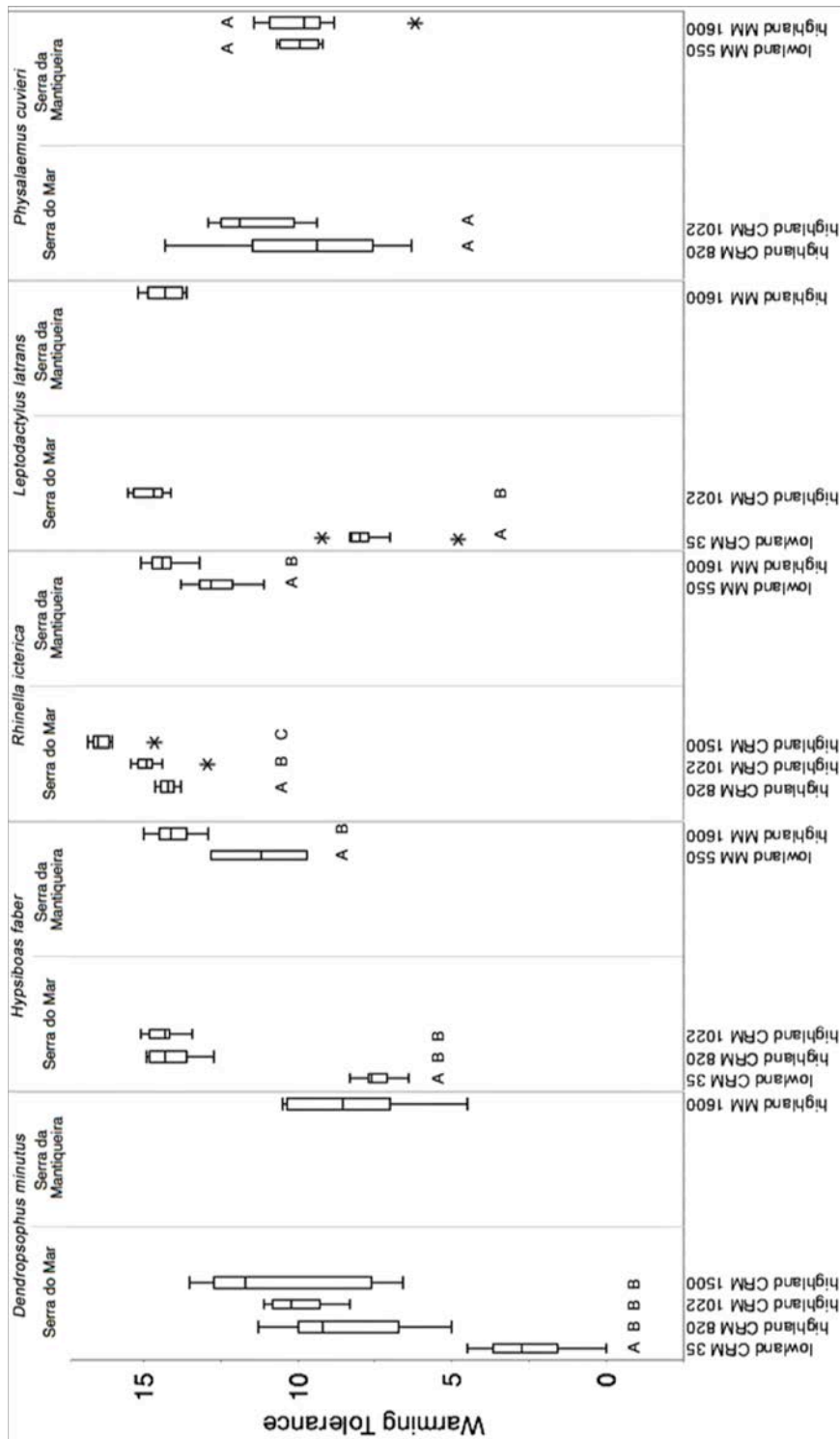


Fig. 5. Warming tolerance index (CTMax – Tmax) calculated for five anuran species along two altitudinal gradients in the Brazilian Atlantic Forest. Different letters denote significant differences. Asterisks denote outliers. Horizontal lines inside the bars represent means and lines out the boxes denote standard deviation.

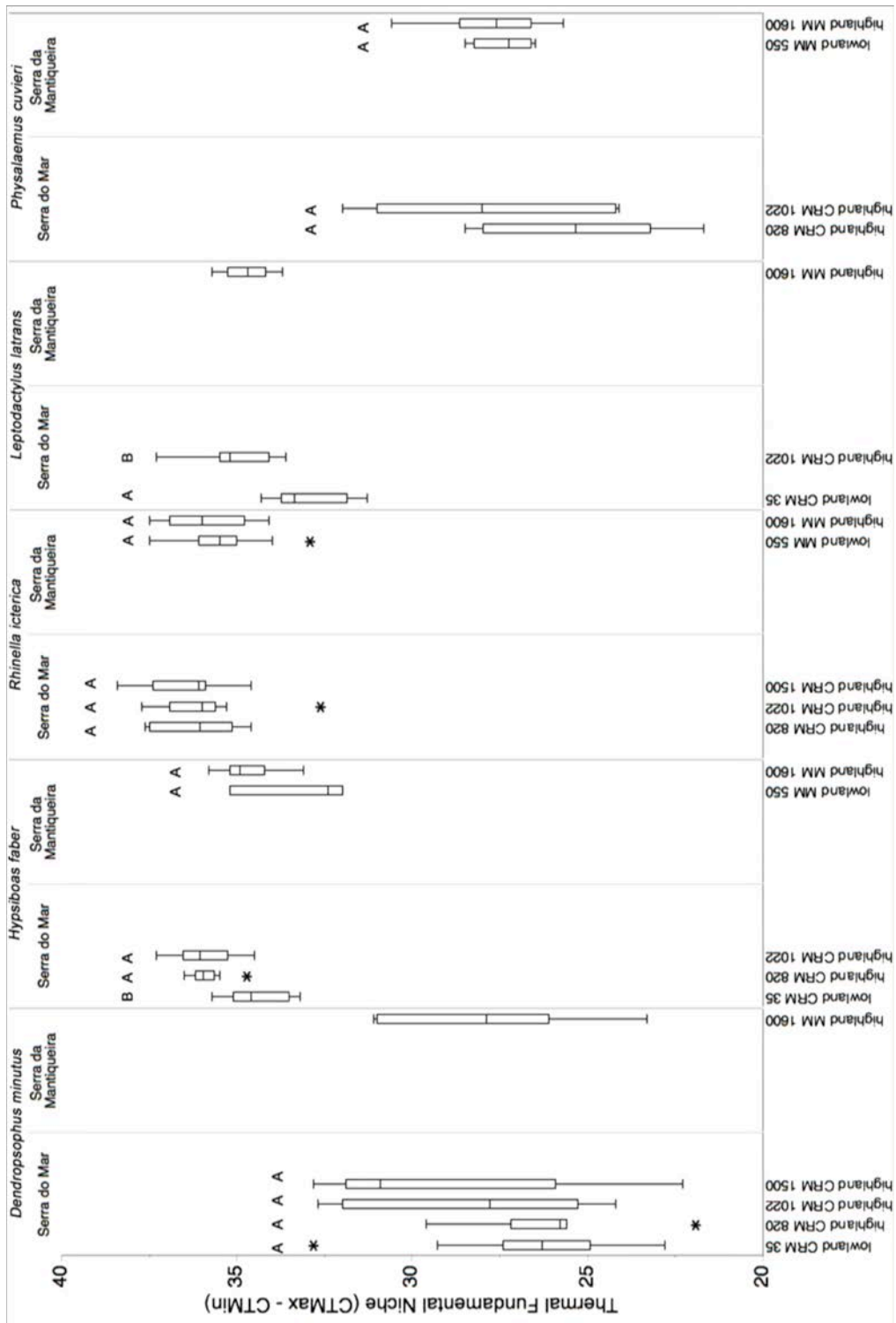


Fig. 6. Thermal Fundamental Niche (TFN, CTMax – CTMin) calculated for five anuran species along two elevational gradients in the Brazilian Atlantic Forest. Different letters denote significant differences. Asterisks denote outliers. Horizontal lines inside the bars represent means and lines out the boxes denote standard deviation.

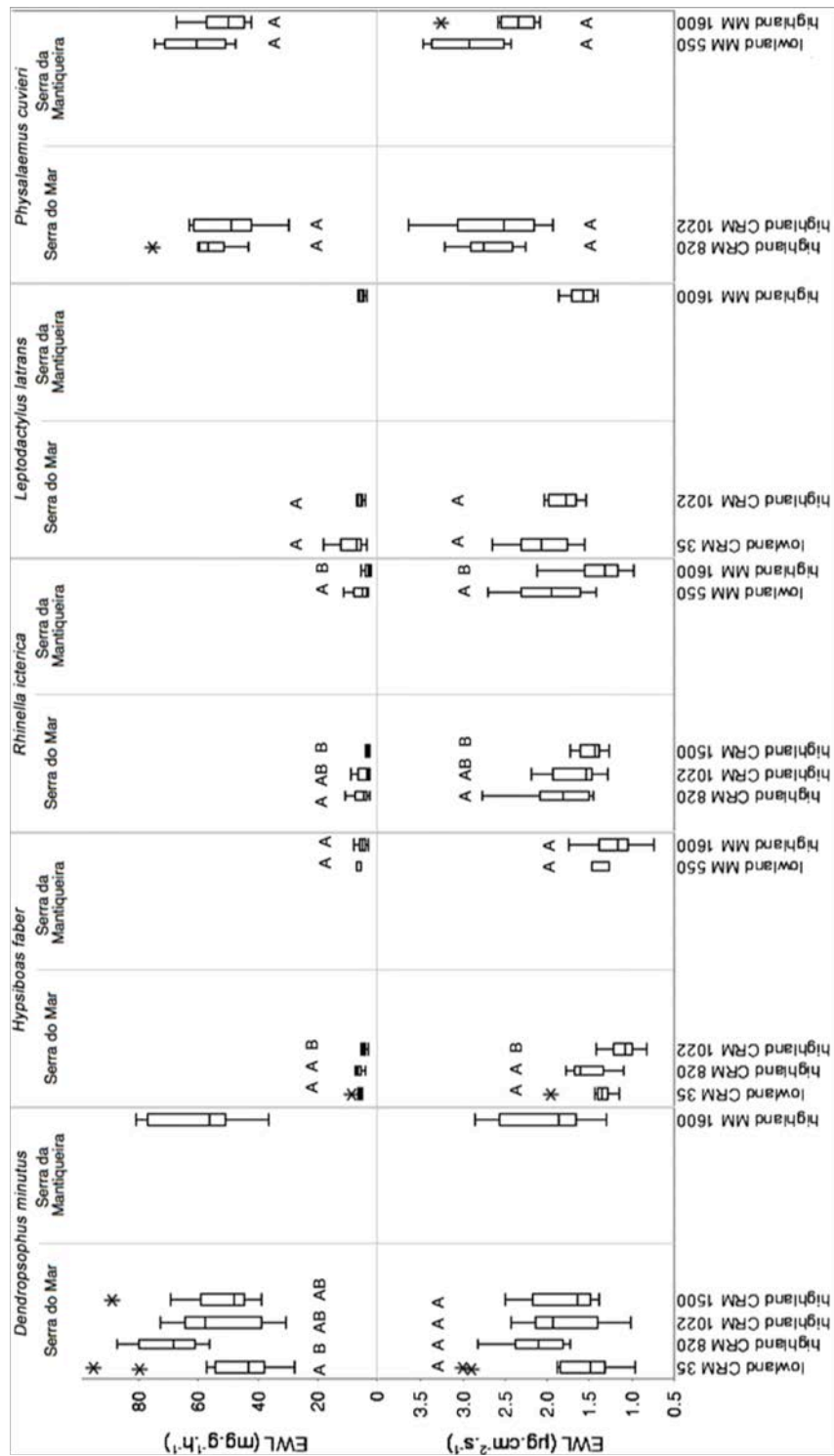


Fig. 7. Evaporative water loss (EWL) expressed per unit of individual mass ($\text{mgH}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, box plots above) and per surface area ($\mu\text{gH}_2\text{O}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, box plots below) of five anuran species along two elevational gradients in the Brazilian Atlantic Forest. Different letters denote significant differences. Asterisks denote outliers. Horizontal lines inside the bars represent means and lines out the boxes denote standard deviation.

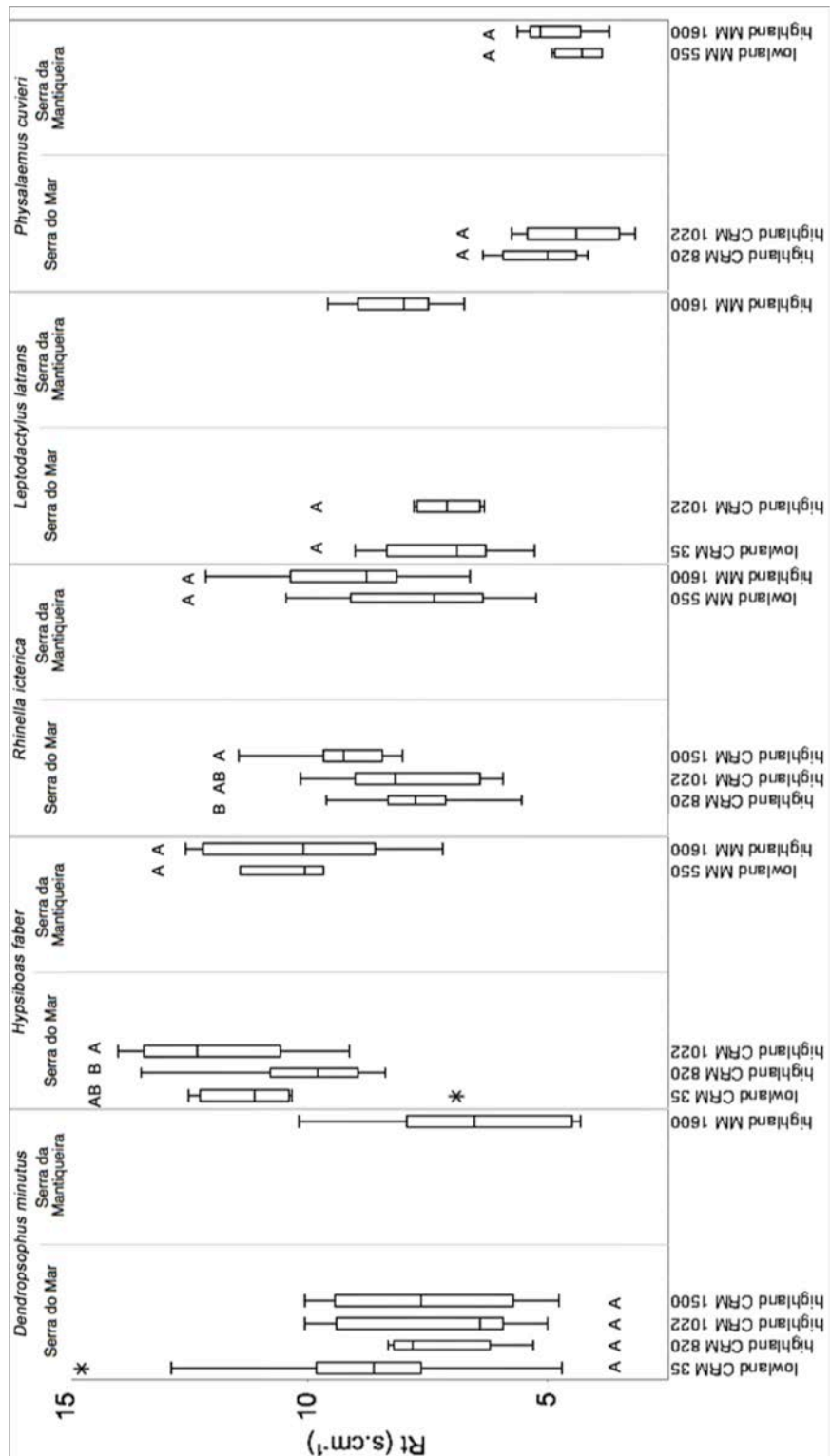


Fig. 8. Total resistance to water efflux through tegument (R_t , $s.cm^{-1}$) in five anuran species along two elevational gradients in the Brazilian Atlantic Forest. Different letters denote significant differences. Asterisks denote outliers. Horizontal lines inside the bars represent means and lines out the boxes denote standard deviation.

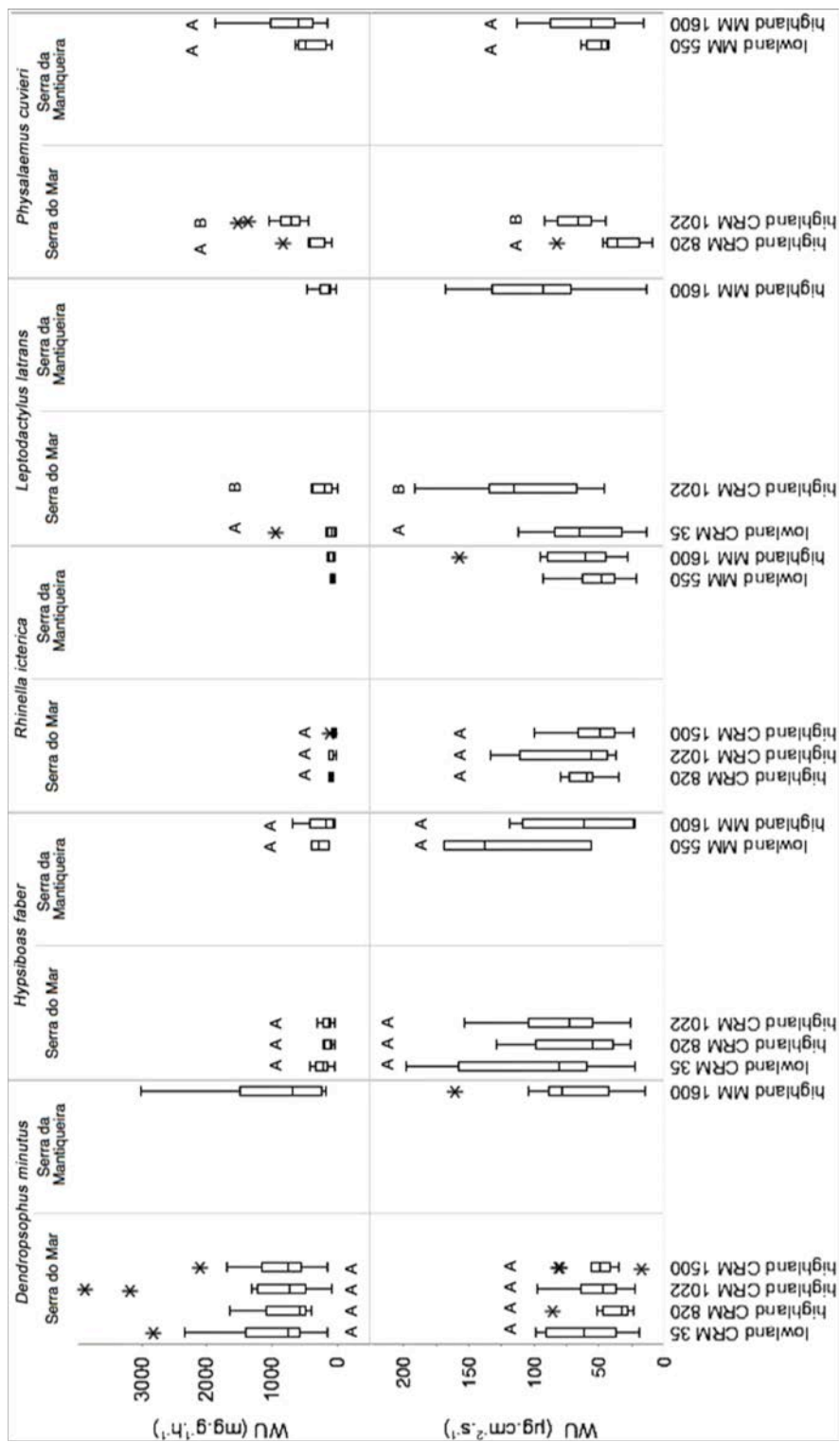


Fig. 9. Water uptake (WU) expressed per unit of individual mass ($\text{mgH}_2\text{O}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, black box plots above) and per surface area ($\mu\text{gH}_2\text{O}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, gray box plots below) of five anuran species along two elevational gradients in the Brazilian Atlantic Forest. Different letters denote significant differences. Asterisks denote outliers. Horizontal lines inside the bars represent means and lines out the boxes denote standard deviation.

CAPÍTULO III

RESPONSES OF BRAZILIAN AMPHIBIANS TO AN ENZOOTIC INFECTION OF THE FROG KILLING FUNGUS

Running Title: Host responses to an enzootic chytrid infection

Rafael P. Bovo^{1*}, Denis V. Andrade^{1*}, Luís Felipe Toledo², Ana V. Longo³, David Rodriguez⁴, Célio F.B. Haddad¹, Kelly R. Zamudio³, C. Guilherme Becker³

¹*Departamento de Zoologia, c. p. 199, Universidade Estadual Paulista, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil;* ²*Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros (LaHNAB), Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato, 255, 13083-862, Campinas, SP, Brasil;* ³*Department of Ecology and Evolutionary Biology, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA;* ⁴*Department of Biology, Texas State University, San Marcos, TX 78666, USA.*

**Corresponding author: Phone. 55-19-3526-4292; Fax. 55-19-3526-4300; e-mail address: rpbovo@gmail.com (R.P. Bovo)*

KEYWORDS: *Batrachochytrium dendrobatidis*, Chytridiomycosis, Amphibian declines, Fitness, Evaporative water loss, Water uptake, Amphibian skin, Mortality

ABSTRACT: Pathophysiological effects of clinical chytridiomycosis in amphibians include disorders in cutaneous osmoregulatory functions and disruption of the ability to rehydrate, which can lead to decreased host fitness or mortality. Less attention has been given to physiological responses of hosts where enzootic infections of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) do not cause apparent population declines in the wild. Here, we experimentally tested whether a pandemic enzootic strain of *Bd* causes significant mortality and alters water balance (evaporative water loss - EWL, skin resistance - Rs, and water uptake - WU) in three Brazilian amphibian species. Infections by the enzootic *Bd* caused no significant mortality, and we found a reduction of EWL in only one host species, likely due to an increase in Rs. Our general results on host water balance at the organismic level corroborate the idea that host species in Brazil's Atlantic Forest, which have been exposed to *Bd* for a long period, have developed resistance to the pathogen. However, not all species respond equally, and one taxon we tested showed sublethal physiological changes in response to infection. Our findings underscore the need for further assessment of host physiological responses to *Bd* infection, even in cases of acinical chytridiomycosis and long-term enzootic infections in natural populations.

INTRODUCTION

The fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) causes clinical chytridiomycosis, and has led to amphibian population declines and extinctions in several parts of the globe (i.e., Central America, Tropical Andes, Eastern Australia; Berger et al. 1998). Acinical chytridiomycosis, however, is common where *Bd* is enzootic, such as Brazil's Atlantic Forest (AF), where multiple *Bd* strains have infected hosts at low prevalences since at least the late 1800s (Rodriguez et al. 2014). Perhaps because no records of population declines in AF amphibians have been attributed to *Bd* (Becker & Zamudio 2011), very little is known about *Bd* epidemiology in Brazilian frogs. Because the AF harbors ~10% of all described amphibian species (Haddad et al. 2013, IUCN et al. 2014, Toledo et al. 2014), experimentally testing the effect of *Bd* on mortality and physiological responses of local host species is critical for estimating the effects of this pathogen on diverse amphibian communities in the wild.

Infected but aclinical hosts (i.e., those not showing pathological changes in the superficial epidermis and/or not developing lethargy, loss of righting reflex, skin sloughing [Voyles et al. 2011]) seem not to suffer impairment in physiological responses such as rehydration capacity or metabolic rates (Carver et al. 2010). Clinical infections of *Bd*, however, cause thickening and increased resistance of amphibian skin (due to hyperkeratosis and hyperplasia), impair host ability to absorb and regulate body fluids, often leading to electrolyte imbalance and cardiac arrest in infected amphibians (Voyles et al. 2011). Material exchange occurring through the skin is critically important in maintaining amphibian homeostasis via the regulation of water transport and exchange of electrolytes and respiratory gases (Hillman et al. 2009, Voyles et al. 2011). Therefore, we assume that impairment of cutaneous function, such as that caused by *Bd*, negatively impacts individual fitness and ultimately survival. These negative effects may be particularly relevant when considering water balance, a physiological process intimately associated with amphibian life history, habitat use, and evolutionary ecology (Wells 2007, Hillman et al. 2009). Laboratory studies have shown impairments of normal skin functions in *Bd*-infected amphibians, such as electrolyte depletion, osmotic imbalance (Voyles et al. 2011), and disruption in rehydration ability (Carver et al. 2010). However, the magnitude of these effects across hosts depends on a complex array of factors, including differences in *Bd* strains (Gahl et al. 2012), previous exposure of the host (Murphy et al. 2011), host life history (Gervasi et al. 2013), and host susceptibility (Searle et al. 2011).

In this study, we experimentally tested whether infection by an enzootic strain of *Bd* causes (i) significant mortality and (ii) alters water balance in three AF amphibian species. Specifically, we tested for the effects of *Bd* infections on three physiological parameters key to host water balance: (1) evaporative water loss - EWL, (2) skin resistance - R_s , and (3) water uptake - WU.

MATERIAL AND METHODS

Study species

We captured adult amphibians of three species in October 2012 at Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Santa Virginia, Município de São Luiz do Paraitinga, state of São Paulo (-23.35° S, -45.16° W). *Dendropsophus minutus* (MIN) has aquatic

larvae, breeds in aquatic habitats, and occupies the emergent vegetation at the edge of water bodies. *Ischnocnema parva* (PAR) and *Brachycephalus pitanga* (PIT) deposit eggs on land, undergo direct development, and are active on the forest leaf-litter.

Experimental design

We added three conspecific amphibians to rectangular experimental units measuring 40 x 29 x 13.5 cm. Each experimental unit consisted of a plastic terrarium with terrestrial habitat covering one end of the container (i.e., autoclaved moist sphagnum) and aquatic habitat covering the other end of the container (i.e., 250 ml of *Bd* inoculum). We replicated *Bd*-infected treatment four times and the control treatment twice for each of the three species, totaling 18 experimental units.

We initially treated animals with Itraconazole 0.01% for 7 days to ensure study organisms were *Bd*-negative prior to the beginning of the experiment (Pessier & Mendelson 2010). We cultured an enzootic *Bd* strain isolated from Minas Gerais, Brazil (CLFT 023; Schloegel et al. 2012) on tryptone agar Petri plates at ~19°C for 7 days. We harvested *Bd* by flooding plates with distilled water and waiting for ~3 h for zoospore release. The strain used in experiments belongs to the Global Panzootic Lineage (GPL), a highly virulent strain causing amphibian declines and extinctions in several regions of the globe (Rosenblum et al. 2013). We then pooled inoculum from plates, quantified zoospores with a hemocytometer, and added 10⁶ zoospores to dechlorinated water in each experimental unit. This guaranteed comparable infection regimes across replicates. We added amphibians to the terrestrial habitat of each experimental unit and kept temperatures at 19.74°C ± 0.55 SD on a 12 h day-night light cycle.

We monitored amphibians daily and fed them pinhead crickets *ad libitum*. We swabbed all individuals after 18 days of infection, a period encompassing several replication cycles of the pathogen (Longcore et al. 1999) and sufficient time to reach peak infection loads in captive amphibians (Savage & Zamudio 2011). We swabbed the single individual that died during the experiment and removed it from the experimental unit; water balance parameters were not measured for this individual. We tested samples for *Bd* in duplicate using Taqman qPCR (Lambertini et al. 2013) with CLFT 023 standards of 0.1, 1, 10, 100, and 1000 zoospore genomic equivalents (GE) to determine the infection intensity of *Bd* in each sample.

Post-infection measurements of host water balance

Prior to measuring evaporative water loss, we held animals in individual PVC containers (four cm of diameter) with 0.5 cm of water, in a climate-controlled chamber (122FC model - Eletrolab) at 20°C for 1 h to ensure that they were fully hydrated at the beginning of the experiment. Immediately after this period, each frog was carefully blotted in paper tissue, its urinary bladder was emptied by gently pressing the abdomen, and body mass was recorded (± 0.0001 g). We placed each individual frog in a circular PVC chamber (8 cm of diameter) connected to an automated open flow system that measures evaporative water loss (EWL). A pump combined to a mass flow meter (SS-3 Subsampller, Sable Systems) provided stable airflow current of 21.66 cm³/s, with relative humidity controlled at 30% by a RH/Dewpoint Controller (DG-4, Sable Systems). Air flow was directed in to the experimental chamber and relative humidity of excurrent air was continuously monitored by a water vapor analyzer (RH-300 RH/Dewpoint Analyzer, Sable Systems). All equipment was maintained inside the climate-controlled chamber at the experimental temperature of 20°C.

Individual frogs were visually monitored during measurements for characterization of their posture (important for accurate surface area estimation) and changes in behavior. No abnormal behaviors were observed for any individual before, during, or after measurements. Infected individuals did not exhibit clinical signs of disease (e.g., lethargy, dilated pupils, inappetence, cutaneous erythema, irregular skin sloughing, abnormal posture as hind legs abducted, and/or loss of righting reflex) and thus, were categorized as aclinical/asymptomatic.

Changes in relative humidity were interfaced to a computer by an analog/digital unit (UI2 – Sable Systems) and recorded/analyzed using the Expedata software (Sable Systems). The amount of water lost, per animal, per unit of time, was calculated from the increment in water content between the airflow upstream (controlled at 30% RH) and downstream in the animal chamber (measured using the water vapor analyzer). Typically, measurements lasted for 30 minutes per individual and for quantitative estimates we selected a period of steady-state readings lasting for at least 10 minutes, typically during the last half of the measurement period. For each animal, the total EWL was then corrected for unit area of exposed skin surface and expressed as $\mu\text{gH}_2\text{O}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. We estimated the exposed surface area of

individual amphibians on the basis of their body mass (McClanahan & Baldwin 1969, Young et al. 2005). Evaporative water loss through the respiratory system was assumed to be negligible (Spotila & Berman 1976, Bentley & Yorio 1979, Wygoda 1984) and not considered in our estimates.

For each individual frog that had its EWL rate measured, we also measured a similar-sized 3% agar replica to determine boundary layer resistance, which allowed us to calculate skin resistance (R_s , expressed as $s.cm^{-1}$) (see Young et al. 2005). Immediately after the EWL tests, each individual was placed in a Petri dish with water to a depth of 0.5 cm, sufficient to cover ventral abdominal region (Cree 1988). Frogs were carefully blotted with paper tissue and weighed (± 0.0001 g) six consecutive times at 2 min intervals. We calculated water uptake (WU) from the linear regression between body mass increments against time. Then, using the estimated surface area in contact with the water (same equations as above) we calculated the rate of WU per unit of area and expressed it as $\mu gH_2O.cm^{-2}.s^{-1}$. WU was not determined for PIT due to their diminutive body size, which precluded accurate measurements.

Statistical Analyses

We compared host physiological responses (EWL, R_s , and WU) between *Bd* infection treatments (*Bd*-infected and *Bd*-uninfected) using General Linear Models (GLM) with standard least squares. We included in the model treatment crossed with species, and the main effect of body mass. We performed GLMs to test the effect of *Bd* infection loads on each water balance parameter (EWL, R_s , and WU), independently for each species. We \log_{10} transformed *Bd* infection load data for this analysis. We did not include prevalence data in the analyses because all amphibians in the infection treatment tested positive for *Bd*.

RESULTS

Bd-infected hosts had no significant increase in mortality; only one individual frog died during the course of the experiment (PIT; *Bd*-infected).

We found altered organismal water balance in only one of three species as a result of *Bd* infection; the hylid *D. minutus* (MIN) showed decreased evaporative water loss (EWL) and increased skin resistance (R_s) (Table 1, Fig. 1). Water uptake

(WU) did not differ significantly between *Bd*-infected and uninfected individuals in any of the species tested (Table 1, Fig. 1).

Bd infection loads did not differ among species ($H = 2.68$, $d.f. = 2$, $P = 0.26$), and we found no significant relationship between water balance measures and *Bd* infection loads, except in Rs for PAR (Table 2; **EWL**, MIN: $r^2=0.0001$, $P=0.97$; PAR: $r^2=0.24$, $P=0.14$; PIT: $r^2=0.18$, $P=0.28$; **Rs**, MIN: $r^2=0.005$, $P=0.81$; PAR: $r^2=0.48$, $P=0.02$; PIT: $r^2=0.07$, $P=0.52$; **WU**, MIN: $r^2=0.06$, $P=0.48$; PAR: $r^2=0.001$, $P=0.92$).

DISCUSSION

The global panzootic *Bd* strain CLFT023, endemic to the Atlantic Forest (Rodriguez et al. 2014), did not cause significant mortality or changes in the host water balance parameters we measured (EWL, Rs, and WU). The one exception was one species (*D. minutus*, MIN) that showed shifts in two closely related parameters (EWL and Rs). Additionally, we found very low *Bd* infection loads at the end of the experiment, even with the relatively high infection treatment of 10^6 zoospores on the first day of the experiment. Low infection intensities are typical of enzootic infections, where hosts have potentially evolved resistance or tolerance to the pathogen (Briggs et al. 2005, Woodhams et al. 2011, Rodriguez et al. 2014). Combined, our findings support the presumed long-term enzootic state of *Bd* in Brazil's AF and may explain the lack of reports of *Bd*-induced amphibian population declines in that megadiverse region (Becker et al. 2007, Becker & Zamudio 2011, Gründler et al. 2012, Haddad et al. 2013).

Despite the many non-lethal effects of *Bd* on local hosts we report here, it is important to not generalize our findings because we did find significant changes in water balance in one of our study species. Specifically, infected MIN showed lower EWL, an outcome caused by thickening of the dorsal skin (indicated by Rs) due to hyperkeratosis and hyperplasia, as in clinical chytridiomycosis (Voyles et al. 2011). We would expect differences in water balance of *Bd* infected frogs to occur primarily in WU because this measure is more associated to ventral skin – the body region usually responsible for most frog species rehydrate (Duellman & Trueb 1986, Wells 2007) – which is more intensely infected by *Bd* (Berger et al. 1998, Pessier et al. 1999, Berger et al. 2005a). Instead, we found significant changes only in EWL and Rs, which were both processes that occurred predominantly through to dorsal skin

(see Methods section). Although none of our study species showed significant changes in WU as a result of infection (including MIN), we did find a trend of lower WU in all infected species we measured. Therefore, the three physiological parameters we measured changed in the direction expected in cases of clinical chytridiomycosis and thus may contribute to sublethal effects in an enzootic host-pathogen system.

Aquatic amphibians are more likely to be infected than terrestrial species due to greater exposure to *Bd* (Longcore et al. 2007, Rowley 2007, Bancroft et al. 2011), and we might expect that they show larger physiological responses to infection. In fact, our study species MIN – the most aquatic of our focal species – was the only one that showed changes in water balance parameters as a result of infection. However, the other two terrestrial host species (PAR, PIT) showed comparable infection loads with no significant changes in physiological responses. This indicates that host-pathogen dynamics can be very species-specific (Berger et al 2005b, Rowley 2006, Fisher et al., 2009, Gervasi et al. 2013) and not just related to host habitat use, differential exposures to the pathogen (Carey et al. 2006, Murphy et al. 2011, Brem et al. 2013), and acquired resistance (Becker et al. 2012, Ellison et al. 2014, McMahon et al. 2014). In our study we used a single virulent *Bd* strain, hence further studies focusing on how host physiological responses vary among *Bd* strains (Rosenblum et al. 2013) and multiple host species will be essential to unravel host-pathogen dynamics that trigger the development of clinical chytridiomycosis (Berger et al. 1998). The fact that a *Bd* GPL strain isolated from Brazil did not cause significant mortality in three local host species definitely bodes well for amphibian conservation in this region. Nonetheless, sub-lethal physiological changes, as observed in one of our focal species, might reflect decreased fitness and lead to silent shifts in population numbers and community structure in the wild.

Acknowledgements

We thank Nadya Pupin, Décio T. Corrêa-Filho, and Carolina Lambertini for assistance during experimental infections. Our work was funded by grants from the National Science Foundation (DDIG 1209382 to CGB; DEB-0542848 to KRZ); Atkinson Center for a Sustainable Future, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Fulbright (Grant 2157-08), and Department of Ecology

and Evolutionary Biology at Cornell University (to CGB); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP procs. 2010/20061-6 to RPB, 2010/05473-6 and 2013/04190-9 to DVA, 2008/50928-1 and 2013/57401-7 to CFBH, 2011/51694-7 to LFT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (to DVA, LFT, and CFBH). Research permits were provided by Instituto Chico Mendes da Conservação da Biodiversidade – Brazil (Permits 29964-3; 17242-3), Instituto Florestal do Estado de São Paulo (Permit 260108 – 010.479/2012), Universidade Estadual Paulista – UNESP – Comissão de Ética no Uso de Animal (Permit 7180), U.S. Fish & Wildlife Services (Permit 2013MI1337329), and the Cornell University Institutional Animal Care and Use Committee (2010-0069).

LITERATURE CITED

- Bancroft B, Han B, Searle C, Biga L, and others (2011). Species-level correlates of susceptibility to the pathogenic amphibian fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in the United States. *Biodiv Conserv* 20:1911–1920
- Brem FM, Parris MJ, Padgett-Flohr GE (2013) Re-Isolating *Batrachochytrium dendrobatidis* from an amphibian host increases pathogenicity in a subsequent exposure. *PLoS ONE* 8:e61260
- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Batista RF, Prado PI (2007) Habitat split and the global decline of amphibians. *Science* 318:1775–1777
- Becker CG, Zamudio KZ (2011) Tropical amphibians experience higher disease risk in natural habitats. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9893-9898
- Becker CG, Rodriguez D, Longo AV, Talaba AL, Zamudio KR (2012) Disease risk in temperate amphibian populations is higher at closed-canopy sites. *PLoS ONE* 7:e48205
- Bentley PJ, Yorio T (1979) Evaporative water loss in anuran amphibia: a comparative study. *Comp Biochem Physiol* 62A:1005–1009
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE and others (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9031–9036
- Berger L, Speare R, Skerratt LF (2005a) Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Dis Aquat Org* 68:65–70

- Berger L, Marantelli G, Skerratt LF, Speare R (2005b) Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Dis Aquat Org* 68:47–50
- Briggs CJ, Vredenburg VT, Knapp RA, Rachowicz LJ (2005) Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology* 86:3149–3159
- Carey C, Bruzgul JE, Livo LJ, Walling ML and others (2006) Experimental exposures of boreal toads (*Bufo boreas*) to a pathogenic chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth* 3:5–21
- Carver S, Bell BD, Waldman B (2010) Does chytridiomycosis disrupt amphibian skin function? *Copeia* 2010 (3):487–495
- Cree A (1988) Water balance responses of the hylid frog *Litoria aurea*. *J Exp Zool* 247:119–125.
- Duellman WE, Trueb L (1994) *Biology of Amphibians*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
- Ellison AR, Savage AE, DiRenzo GV, Langhammer P, Lips KR, Zamudio KR (2014) Fighting a losing battle: vigorous immune response countered by pathogen suppression of host defenses in a chytridiomycosis-susceptible frog. *G3(Bethesda)* 4: 1275–1289
- Fisher MC, Garner TW, Walker SF (2009) Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annu Rev Microbiol* 63:291–310
- Gahl MK, Longcore JE, Houlahan JE (2012) Varying responses of northeastern North American amphibians to the chytrid pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* *Conserv Biol* 26:135–141.
- Gervasi SS, Gondhalekar C, Olson DH, Blaustein AR (2013) Host Identity Matters in the Amphibian-*Batrachochytrium dendrobatidis* System: Fine-Scale Patterns of Variation in Responses to a Multi-Host Pathogen. *PLoS ONE* 8:e54490
- Gründler MC, Toledo LF, Parra-Olea G, Haddad CFB, and others (2012) Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Dis Aquat Organ* 97:173–184
- Haddad CFB, Toledo LF, Prado CPA, Loebmann D and others (2013) *Guide to the Amphibians of the Atlantic Forest: Diversity and Biology*. São Paulo, Anolis Books

- Hillman SS, Withers PC, Drewes RC, Hillyard SD (2009) Ecological and environmental physiology of amphibians. Oxford University Press
- IUCN (2014) The International Union for Conservation of Nature, Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <<http://www.iucnredlist.org>> (accessed on 15 Jan 2015)
- Lambertini C, Rodriguez D, Brito FB, Leite DS, Toledo LF (2013) Diagnóstico do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. Herpetologia Brasileira 2(1):12–17
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia 91:219–227
- Longcore JR, Longcore JE, Pessier AP, Halteman WA (2007). Chytridiomycosis widespread in anurans of northeastern United States. J Wild Manag 71:435–444
- Longo AV, Burrowes PA, Joglar RL (2010) Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. Dis Aquat Organ 92:253–260
- McClanahan L, Baldwin R (1969) Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. Comp Biochem Physiol 28:381–389
- McMahon TA, Sears BF, Venesky MD, Bessier SM and others (2014) Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. Nature 511(7508):224–227
- Murphy P, St-Hilaire S, Corn P (2011) Temperature, hydric environment, and prior pathogen exposure alter the experimental severity of chytridiomycosis in boreal toads. Dis Aquat Organ 95:31–42
- Pessier AP, Nichols DK, Longcore JE, Fuller MS (1999) Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). J Vet Diagn Invest 11:194–199
- Pessier AP, Mendelson JR eds. (2010) A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN.
- Rodriguez D, Becker CG, Pupin N, Haddad CFB, Zamudio KR (2014) Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. Mol Ecol 23:774–787
- Rosenblum EB, James TY, Zamudio KR, Poorten TJ and others (2013) Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing

- data. Proc Natl Acad Sci USA 110:9385–9390
- Rowley JJJ (2007) Why does chytridiomycosis drive some frog populations to extinction and not others? The effects of interspecific variation in host behavior. PhD dissertation, School of Marine and Tropical Biology, James Cook University, Townsville, Queensland, Australia
- Savage AE, Zamudio KR (2011) MHC genotypes associate with resistance to a frog-killing fungus. Proc Natl Acad Sci USA 108:16705–16710
- Schloegel LM, Toledo LF, Longcore JE, Greenspan SE and others (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. Mol Ecol 21:5162–5177
- Searle CL, Gervasi SS, Hua J, Hammond JI, Relyea RA, Olson DH, Blaustein AR (2011). Differential Host Susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an Emerging Amphibian Pathogen. Conserv Biol 25:965–974
- Spotila JR, Berman EN (1976) Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. Comp Biochem Physiol 55A:407–411
- Toledo LF, Becker CG, Haddad CFB, Zamudio KR (2014) Rarity as an indicator of endangerment in neotropical frogs. Biol Conserv 179:54–62
- Voyles J, Rosenblum EB, Berger L (2011) Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. Microbes and Infection 13(1):25–32
- Wells KD (2007) The Ecology and Behavior of Amphibians. Chicago University Press
- Woodhams DC, Bosch J, Briggs CJ, Cashins S and others (2011) Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. Front Zool 8:1–24
- Wygoda M (1984) Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. Physiol Zool 57:329–337
- Young JE, Christian KA, Donnellan S, Tracy CR, Parry D (2005) Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. Physiol Biochem Zool 78:847–856.

Table 1. Effects of *Bd* infection on water balance in three Brazilian anuran species from the Atlantic forest. Significant effects are highlighted in bold.

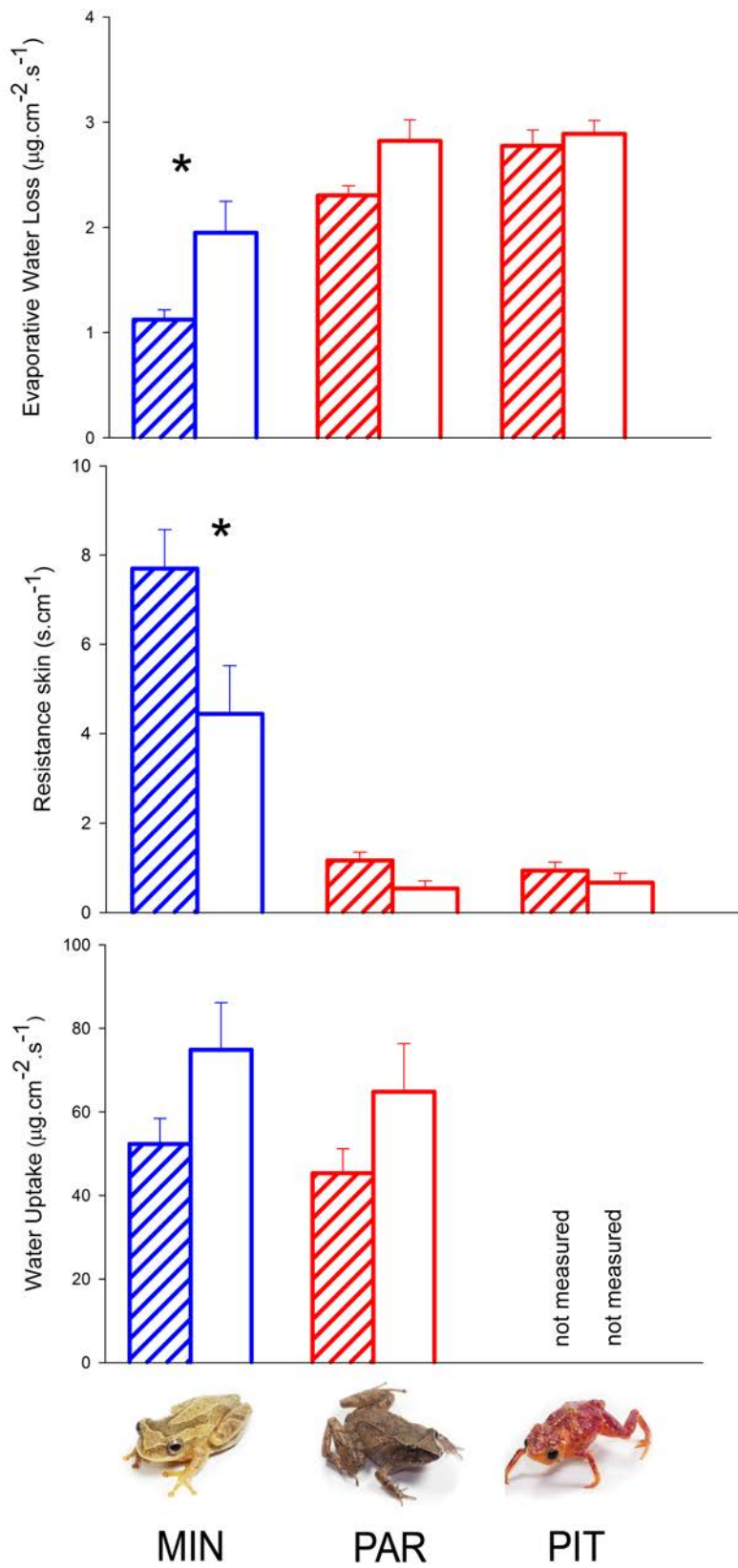
Variable	F or t Ratio	P
EWL (Evaporative Water Loss, $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		
treatment	14.73	<0.001*
species	9.34	<0.001*
species*treatment	2.68	0.079
body mass	2.08	0.155
Rs (Resistance skin, $\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)		
treatment	7.76	<0.01*
species	17.22	<0.0001*
species*treatment	4.05	<0.05*
body mass	0.03	0.853
WU (Water Uptake, $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)		
treatment	-2.24	<0.05*
species	-0.05	0.956
species*treatment	-0.43	0.668
body mass	1.18	0.246

Table 2: Summary of body mass, infection loads, and number of experimental individuals for all study species. Mean \pm s.e.m.

Species	<i>Dendropsophus minutus</i> (MIN)	<i>Ischnocnema parva</i> (PAR)	<i>Brachycephalus pitanga</i> (PIT)
N Total	19	17	15
N <i>Bd</i> Infected	12	10	8
N Control	7	7	7
Body mass (g)	0.51 \pm 0.01	0.32 \pm 0.03	0.2 \pm 0.01
Infection loads (Log)	0.85 \pm 0.18	1.17 \pm 0.23	0.67 \pm 0.21

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Water balance parameters measured in our three focal host species; *Bd*-infected animals (dashed bars) and uninfected controls (empty bars). Graphs show mean \pm s.e.m. of evaporative water loss (EWL, $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; A), skin resistance (Rs, $\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$; B), and rates of water uptake (WU, $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; C). Asterisks denote significant differences. Species acronyms are: *D. minutus* = MIN, *I. parva* = PAR, *B. pitanga* = PIT. Blue denotes more aquatic species and red denotes more terrestrial ones.



CAPÍTULO IV

IS THE DIURNAL ACTIVITY OF DISPERSING JUVENILE BURROWING FROGS CORRELATED WITH CHANGES IN PHYSIOLOGICAL TRAITS ?

*Running Title: Physiological traits of *Dermatonotus muelleri**

Rafael P. Bovo^{1*}, Rodrigo S.B. Gavira¹, Denis V. Andrade¹

¹*Departamento de Zoologia, c. p. 199, Universidade Estadual Paulista, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.*

**Corresponding author: Phone. 55-19-3526-4292; Fax. 55-19-3526-4300; e-mail address: rpbovo@gmail.com (R.P. Bovo)*

KEYWORDS: water balance, evaporative water loss, resistance to evaporative water loss, water uptake, thermal tolerances, critical temperatures, metabolism, dispersal activity.

ABSTRACT

Frogs have typically high rates of evaporative water loss, and many species must deal with particular challenges from an ecophysiological perspective. In addition, behavioral adaptations, such as nocturnal activity pattern and microhabitat selection, also play an important role to allow species survival in defiant circumstances. However, adjustments by behavioral means are only possible when environmental heterogeneity is sufficient or seasonal phenology is permissive, otherwise organisms would rely on physiological basis or would perish. The Mueller's Narrow-mouthed frog, *Dermatonotus muelleri* (microhylidae), is a Neotropical nocturnal burrowing frog, endemic to seasonally dry region where seasonal variations in climate may subject anuran species to hot and/or dehydrating conditions. This species exhibits massive dispersions, walking long distances even during daytime. Therefore, in order to investigate whether recently metamorphosed juveniles of *D. muelleri* possess some physiological traits that might be associated to the challenges imposed by such a dispersal event, we measure water balance (evaporative water loss, EWL; resistance to water efflux, R_s ; and water uptake, WU), thermal tolerance (critical thermal minimum, CTMin; and maximum, CTMax), and resting metabolism in recently metamorphosed juveniles of *D. muelleri* collected during a daylight massive dispersion event. In general, our focal species exhibited high rates of evaporative water loss ($8.8 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), and low skin resistance ($1.8 \text{ s}\cdot\text{cm}^{-1}$). Likewise, water uptake rates ($53.5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) were not high as reported for arid-dwelling species, as well as were not both CTMin and CTMax (respectively, 10.6°C and 37.2°C). Resting metabolic rate ($0.29 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) was congruent to the values for similar-sized anurans. Therefore, explanation of juvenile *D. muelleri* capacity to disperse in considerable safe thermal, hydric and energetic ranges seems beyond the scope of physiological traits we measured.

INTRODUCTION

To cope with terrestrial occupancy and its consequent desiccation risk, amphibians evolved a wide variety of behavioral, morphological, and physiological adaptations, which vary in relative importance among lineages and particular life styles but, in general, permit them to exploit hot environments and dehydrating conditions (Lillywhite, 1971; Shoemaker et al., 1992; Navas et al., 2007). In terrestrial microhabitat, on or under the ground, species must deal with several particular challenges of ecophysiological order, which poses a number of questions. For example, the Mueller's Narrow-mouthed frog, *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885), is a Neotropical microhylid endemic to a seasonally dry region of the southeastern Brazil, under the "Cerrado" biome (Duellman, 1999). Climate variations presenting in type of environment may subject anuran species to hot and/or dehydrating conditions (e.g., heat, wind), in addition to unpredictable rainy periods (Rossa-Feres & Jim, 2001). This frog has a miniaturized body size and burrowing habits, emerging only during the wet season (i.e., September-October to February) for reproduction and feeding (Vizotto, 1967; Cei, 1980; Lavilla et al., 1995; Duellman, 1999; Nomura, 2003; Nomura et al., 2009). Yet, even during the breeding season, they remain underground for most of the time, emerging from the soil only at nighttime (Nomura et al., 2009). Surprisingly, however, recently metamorphosed *D. muelleri* may engage in massive dispersal events (Nomura, 2003), walking considerable distances along the course of a few days, even during daytime, (Hillman et al., 2009).

Field and laboratory studies have established the prevalent role of behavior to accommodate the main challenges faced by the amphibians in terrestrial environments, in particular, those associated to water economy and heat avoidance (Lillywhite, 1970; Wells, 2007). On the other hand, some studies suggested that a plastic thermal physiology has been more important than behavioral adjustments, in terms of saving water and thermoregulation (Navas, 2003; Navas et al., 2007). Therefore, considering the particular biology of *D. muelleri* commented above, we investigated a number of selected physiological variables in dispersing *D. muelleri* to verify whether these variables may reflect aspects of the species natural history, particularly in regard to migration/dispersal and fossoriality. To this aim, we measured evaporative water loss, skin resistance for dehydration and water uptake from free water, heat tolerance (critical thermal minimum and maximum), and resting

metabolism in juveniles of *D. muelleri*. We expected one or more physiological parameters might help juveniles to cope with adverse conditions for amphibian activity during daytime (when frogs were migrating).

MATERIAL AND METHODS

In February 2013, we collected 27 juvenile individuals of *Dermatonotus muelleri* (IBAMA permission number 22028-1) from a ranch on the banks of the Tietê River, located at the municipality of Barbosa, São Paulo State, southeastern Brazil (21.25048°S, 49.92132°W; 371 m a.s.l.). We took advantage of collecting juveniles (since there were no adults) in a massive dispersal, during the daytime. They were found mostly near and around man-made facilities, which are 15 m away from a small forest fragment (ca. 434.1 km²) and about 750 m from the temporary pond where breeding occurred (Fig. 1). Furthermore, just before the collecting specimens, we randomly measured surface body temperatures (T_b) of isolated and aggregated frogs in the field, using a psychrometer with Infrared thermometer (DT-8896, CEM). Subsequently, frogs were brought to laboratory at Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, and kept in plastic boxes (~ 7000 cm³), under natural light/dark cycles and temperature (23 ± 2°C), with both humid and dry substrates, wood shelters, and water *at libitum*. All frogs were individually weighed and had their size measured (Snout-vent length, SVL).

We randomly separated the frogs in 3 different groups. Each of these groups was used only and exclusively to the measurement of just one set of the experiments described below (i.e., water balance, thermal tolerance, or metabolism). All frogs were measured after at least two days of being captured to avoid a possible effect of meal digestion (e.g., Witters & Sievert, 2001; Secor, 2005) on the physiological parameters of interest. In regard to whether our results are compatible for anurans, we compiled several literature data and disposed them in Table 1. Unless otherwise noted, the data were presented as means ± standard deviation.

Water balance

Evaporative water loss and skin resistance to water efflux

Prior to evaporative water loss measurements, individual frogs were placed in individual circular PVC containers (~ 500 ml) filled to a depth of 5 mm with tap water,

and left inside an acclimated climatic chamber BOD (EL101/2RS model, Eletrolab) with controlled temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) and relative humidity ($51 \pm 5\%$) for one hour, to ensure that they were fully hydrated. Each frog was then carefully blotted in paper tissue, its urinary bladder emptied by gently pressing the abdomen, and body mass recorded ($\pm 0.01\text{ g}$). This body mass was considered the standard mass (i.e., hydration level of 100%). Immediately after, frogs were transferred to a hermetically closed circular PVC chamber ($\sim 1000\text{ ml}$) and returned to the climatic chamber, which were kept at the same temperature for the duration of the measurements.

Whole animal evaporative water loss (EWL, expressed as $\text{mgH}_2\text{O}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) estimates were obtained by using a system containing a water vapor analyzer (RH-300, Sable Systems) connected to a relative humidity controller (DG-4, Sable Systems). The RH controller allowed an airflow with a relative humidity set at 30%, which was produced by a mass-flow controller (SS4 Sub-Sampler, Sable Systems). The air influx was $1300\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, which provided 99% air turnover within the test container every 3.5 min (see Lasiewski et al., 1966). All these apparatus were connected to an Interface (UI-2, Sable Systems), in which data were sampled and collected every second, using an acquisition software (ExpeData software, Sable Systems).

Frog surface area was estimated by the equations derived by McClanahan & Baldwin (1969) assuming that during the experiments the frogs rested with only two-thirds of their total surface area exposed to air (Withers et al., 1984). Frogs were visually inspected during EWL measurements and, indeed, all of them kept their ventral surface pressed flat onto the bottom of the chamber. We did not differentiate between cutaneous and respiratory EWL rates, however, as the latter is commonly negligible for anurans (see Spotila & Berman, 1976; Bentley & Yorio, 1979; Wygoda, 1984), we equate measured EWL rates entirely as cutaneous. Moreover, for each individual measurement, we used a same-sized 3% agar replica of the frog, whose EWL rates were measured under the same conditions just described. The agar model measurements allow us to determine the boundary layer resistance to water loss, which allowed us to calculate skin resistance (R_s) on the basis of the difference between total resistance (R_t) and boundary layer resistance (R_b) (see Spotila & Berman, 1976; Wygoda, 1984, for details). Skin resistance was expressed in $\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Water uptake

Rehydration rates were determined immediately after the EWL trials at the same experimental temperature. For this purpose, each frog was subsequently dehydrated, being weighed every 5 min, until nearly 80% of the standard body mass (i.e., frogs lost 20% of their own body mass in water). Then, the dehydrated frogs were maintained in individual Petri dishes filled with water to a depth of 5 mm. Frogs were carefully blotted with paper tissue and weighed every 2 min, for 6 consecutive times. Rates of water uptake (WU) were calculated from the regression of the body mass gain against time and expressed as $\text{mgH}_2\text{O}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

Thermal tolerance

Thermal critical minimum and maximum tests were carried out in a climatic chamber BOD (EL101/2RS model, Eletrolab) provided with a controllable ramping system able to produce a constant cooling/heating ramp at the rate of $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ (see also Terblanche et al., 2007; Rezende et al., 2011; Terblanche et al., 2011; but see Lutterschmidt & Hutchison, 1997). In both cases, cooling or heating, experiments always started at 20°C with animals fully hydrated. At the beginning of the experiments, they were individually placed into circular plastic containers (~ 500 ml) covered with a piece of plastic mesh to ensure rapid thermal equilibrium. To avoid dehydration effects during tests, we lined the chamber with moist towel paper. Critical temperatures were determined by the loss of the righting response of the animals (see Navas et al., 2007).

Metabolic rates

Resting metabolic rates (RMR, expressed in $\text{ml O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) were obtained by measuring oxygen consumption rates ($\dot{V}\text{O}_2$) in an intermittently closed respirometry system. For that, frogs were weighed and placed individually in sealed respirometric PVC chambers (~ 10 mL) and then transferred to a climatic chamber BOD (EL101/2RS model, Eletrolab) set at $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

$\dot{V}\text{O}_2$ was measured using a computer-automated closed respirometry setup (TR-RM8, Sable Systems). This system was programmed to ventilate six respirometers (PVC chambers, ~ 5 ml) with fresh air (open phase; $50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) for 120 min, while measuring the rate of oxygen depletion in one other chamber for 20

min (closed phase), in which the ventilation was interrupted and the air was recirculated through an oxygen analyzer (PA-1B, Sable Systems). The output from the gas analyzer was collected on a data acquisition system (DATACAN V, Sable Systems), and $\dot{V}O_2$ rates were calculated from the slopes of the difference in the O_2 concentration between open and close phases.

In order to avoid frogs' dehydration, a piece of humidified cotton was placed inside each chamber during the RMR experiments. Animals remained on the respirometry system for 24 hours.

RESULTS

A summary of the data collected for *Dermatonotus muelleri* is included in Table 1. In regard to whether our results are unusual for anurans, it is worth to compare them with those measured for other anuran species.

The thermal tolerance range ($CT_{max} - CT_{min}$ *sensu* Tejedo et al., 2012) was 26.58°C. Surface body temperatures (T_b) of isolated and aggregated *D. muelleri* individuals in the field had no significant differences between them ($21 \pm 1^\circ\text{C}$).

DISCUSSION

In general, our results do not support the hypothesis that aspects of the natural history (i.e., diurnal dispersion) of juvenile *D. muelleri* are led by exceptional physiological features, at least when looking to physiological parameters measured. Juveniles showed no evidences of having mechanisms to retarding water loss. Instead, they exhibited both high rates of EWL and low skin resistance that fell about midway in the pattern described in the literature for fossorial frogs (e.g., Thorson & Svihla, 1943; Thorson, 1955; Withers, 1998; Cartledge et al., 2006) and for many non-arboreal anurans (Wygoda, 1984; Buttemer, 1990; Lillywhite, 2006; Cartledge et al., 2006; Wells, 2007; Hillman et al., 2009; Table 1). Likewise, water uptake was not exceptionally high as reported by several authors who have detected higher rates of rehydration in terrestrial or arid-dwelling species (Bentley et al., 1958; Warburg, 1971; Christensen, 1974; van Berkun et al., 1982; Young et al., 2005). Evidences from literature and empirical data do not indicate that water-conserving

postures (not observed and really hindered by the body shape), morphological adaptations (e.g., modifications in skin to enhance WU) and/or use of secretions as proteins/lipids (Lillywhite, 2006; Tempone et al., 2007) for example, have been used by *D. muelleri* to minimize EWL.

Similarly, juveniles *D. muelleri* did not exhibit exceptional thermal tolerances, with critical minimum and maximum and thermal range ($CT_{max} - CT_{min}$) falling within the limits reported for the majority of tropical anuran species (Brattstrom, 1968; 1970; Duelman & Trueb, 1996; Wells, 2007; Hillman et al., 2009). On the contrary, the relatively narrow thermal range for juvenile *D. muelleri* is thought to be potentially life threatening under conditions faced during migration.

As is well known, *D. muelleri* has a fossorial habit (Nomura et al., 2009), emerging from the substrate only during the wet and hot season (i.e., October to March). After aestivation, *D. muelleri* presents a migratory behavior (of up to 7 km away from its home pond) with massive number of individuals emerging from the burrows and travelling to the reproduction and feeding areas (Nomura, 2003; Nomura et al., 2009). Also, recently metamorphosed individuals are known to engage in a collective dispersal from the pond where they developed. Such migratory movements are thought to be very energy demanding (Pough & Taigen, 1990; Walton, 1993) and, therefore, one could expect *D. muelleri* to have a higher RMR than predicted by body mass. However, the metabolic rate of *D. muelleri* was almost entirely explained by their body mass (see Gatten et al. 1992; Fig. 2). Thus, our results seem to agree with the observation that burrowing frogs tend to have a metabolic rate similar to other non-fossorial anurans (see Withers, 1993).

Massive dispersions are not uncommon for some frog species, but particulars details related to them are still intriguing, because these animals present a permeable skin, highly susceptible to water loss, which may increase the risk of desiccation during a terrestrial dispersion (Child et al., 2008; see also Russel et al., 2005 and references therein). Although other factors (e.g., decreased temperatures, resource availability, and barometric pressure) are associated, precipitations have been claimed as the key factor that triggers such translocations (Russel et al., 2005), and also would supposedly ensure survival of migrant frogs during dispersions (Sinsch, 1988). We are not opposed to this, but we believe there are others than abiotic factors that would allow frogs continue performing dispersions along some few days continuously, including diurnal time. Within this context, we also observed a

single heavy rain in the first day when migration started, and then, there were only infrequent sparse periods of light rain over six days of *D. muelleri* dispersion, with domain of cloudy and windy weather, which indeed might affect water balance and thermoregulation of such small frogs (see Köhler et al., 2011).

In summary, we failed to identify any particular physiological factors for *D. muelleri* to withstand challenging environmental situations, for instance, dry and hot environmental conditions. Consequently, *D. muelleri* is likely to rely on behavioral responses to bear adverse conditions, a usually tactic played by anurans with similar natural history traits (e.g., fossorial frogs). For example, they could prevent activity (e.g., Hillman et al., 2009) and/or bury themselves (e.g., McClanahan et al., 1994; Loveridge, 1976) during less favorable periods of the day. However, at least in part, our field observations do not agree with these possibilities. Instead of perform a predicted more pronounced nocturnal activity, juveniles *D. muelleri* did not cease dispersion, but they truly continued moving even during daytime, as markedly witnessed by us. Such response was not astonishing, since the typical response by several frogs when facing severe conditions (e.g., dehydration) on a daily basis, is increase the activity to seek out for more favorable locations, even if it compromises their locomotory capacity, becoming physiologically incapacitated by reaching its debilitating critical activity point (Moore & Gatten, 1989; Putnam & Hillman, 1977; Titon et al., 2009). In the case of the burrowing behavior for the fossorial *D. muelleri*, we indeed registered a large number of individuals trying to bury into the ground but without success. In fact, it was already expected due to the lack of enough shelters underground for a great part of the thousands of moving individuals in transient terrains, which perhaps led them to aggregate. Hence, they seemed shift its usual strategy (i.e., to bury), firstly moving as soon as they could during daytime, and then seeking refuges in less exposed sites (e.g., getting inside and surrounding man-made facilities, the only alternative shelter in our study area) instead of open areas along their migration pathway. Furthermore, as discussed above, *D. muelleri* presents a shift in its tactic for food search (Nomura et al., 2011) analogous to herein (shifting from unsuccessful burying into the soil to seeking out refuges). Concluding, our study indicates that juvenile *D. muelleri* is a typical fossorial anuran that generally lacks morphological and physiological adaptations regarding to face challenging environmental conditions as they may encounter during large-distance migrations or even ordinarily in its semi-arid habitat. Together with the significant importance of

rain for frog migrations, behavioral plasticity may be a partial explanation of juvenile *D. muelleri* capacity to perform and continue dispersions in considerable safe thermal, hydric and energetic ranges, attenuating possible extreme conditions from its semi-arid habitat.

Acknowledgements

We thank to Celso L.M. Gavira for field and handling assistance. Financial support was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (FUNDUNESP).

REFERENCES

Amey, A.P. & Grigg, G.C. 1995. Lipid-reduced evaporative water loss in two arboreal hylid frogs. *Comp. Biochem. Physiol.* A111: 283–291.

Bentley, P.J.; Lee, A.K. & Main, A.R. 1958. Comparison of dehydration and hydration of two genera of frogs (*Heleioporus* and *Neobatrachus*) that lives in area of varying aridity. *J. Exp. Biol.* 35: 677–684.

Bentley, P.J. & Yorio, T. 1976. The passive permeability of the skin of anuran Amphibia: A comparison of frogs (*Rana pipiens*) and toads (*Bufo marinus*). *J. Physiol.* 261: 603–615.

Brattstrom, B.H. 1968. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comp. Biochem. Physiol.* 24: 93–111.

Brattstrom, B.H. 1970. Amphibia. *In: Comparative physiology of thermoregulation*, ed. Whittow, G.C. 135–166. New York: Academic Press.

Bucher, T.L.; Ryan, M.J. & Bartholomew, G.A. 1982. Oxygen consumption during resting, calling, and nest building in the frog *Physalaemus pustulosus*. *Physiol. Zool.* 55: 10–22.

Buttemer, W.A. 1990. Effect of temperature on evaporative water loss of the Australian tree frogs *Litoria caerulea* and *Litoria chloris*. *Physiol. Zool.* 63: 1043–1057.

Cartledge, V.A.; Withers, P.C.; Thompson, G.G. & McMaster, K.A. 2006. Water relations of the burrowing sandhill frog, *Arenophryne rotunda* (Myobatrachidae). J. Comp. Physiol. 176B: 295–302.

Child T; Phillips, B.L.; Shine, R. 2008. Abiotic and biotic influences on the dispersal behavior of metamorph cane toads (*Bufo marinus*) in tropical Australia. J. Exp. Zool. 309A: 215–224.

Cei, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. Firenze, Tipografia Il Sedicesimo, 609p.

Christensen, C.U. 1974. Adaptations in the water economy of some anuran Amphibia. Comp. Biochem. Physiol. A47: 1035–1049.

Christian, K. & Parry, D. 1997. Reduced rates of water loss and chemical properties of skin secretions of the frogs *Litoria caerulea* and *Cyclorana australis*. Aust. J. Zool. 45: 13–20.

Davison, J. 1955. Body weight, cell surface, and metabolic rate in anuran Amphibia. Biol. Bull. 109: 407–419.

Drewes, R.C.; Hillman, S.S.; Putnam, R.W. & Sokol, O.M. 1977. Water, nitrogen and ion balance in the African treefrog *Chiromantis petersi* Boulenger (Anura: Rhacophoridae), with comments on the structure of the integument. J. Comp. Physiol. 116: 257–267.

Duellman, W.E. 1999. Distribution Patterns of Amphibians in South America, p. 255–329. In: Duellman, W.E. (Ed). Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective. Baltimore. The Johns Hopkins University Press.

Dunlap, D.G. 1971. Acutely measured metabolic rate-temperature curves in the cricket frog, *Acris crepitans*. Comp. Biochem. Physiol. A38: 1–16

Dunlap, D.G. 1972 Latitudinal effects on metabolic rates in the cricket frog, *Acris crepitans*: acutely measured rates in summer frogs. Biol. Bulletin.143: 332–343.

Dunlap D.G. 1980. Comparative effects of thermal acclimation and season on metabolic compensation to temperature in the hylid frogs *Pseudacris triseriata* and *Acris crepitans*. Comp. Biochem. Physiol. A 243–250.

Gatten, R.E.; Miller, K.J. & Full, R.J.1992. Energetics at rest and during locomotion. In: Environmental Physiology of the Amphibians. Eds: Feder, M.E. & Burggren, W.W. The University of Chicago Press, Chicago, pp 314–377.

Hillman, S.S.; Withers, P.C.; Drewes, R.C. & Hillyard, S.D. 2009. Ecological and

environmental physiology of amphibians. Oxford University Press, USA.

Köhler, A.; Sadowska, J.; Olszewska, J.; Trzeciak, P. Berger-Tal, O. & Tracy, C.R. 2011. Staying warm or moist? Operative temperature and thermal preferences of common frogs (*Rana temporaria*), and effects on locomotion. *Herpetol. J.* 21(1): 17–26.

Lasiewski, R.C.; Acosta, A.L. & Bernstei, M.H. 1966. Evaporative water loss in birds. I. Characteristics of open flow method of determination and their relation to estimates of thermoregulatory ability. *Comp. Biochem. Physiol.* 19: 445–457.

Lavilla, E.O.; Cruz, F.B. & Scrocchi, G.J. 1995. Amphibiens et reptiles de la station biologique “Los Colorados” dans la province de Salta, Argentine. *Revue Française d’Aquareologie.* 22 (1-2): 51–58.

Lillywhite, H. B. 1970. Behavioral thermoregulation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Copeia* 1970: 158–168.

Lillywhite, H.B. 1971. Temperature selection by the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comp. Biochem. Physiol.* 40A: 213–227.

Lillywhite, H.B. 2006. Water relations of tetrapod integument. *J. Exp. Biol.* 209: 202–226.

Loveridge, J.P. 1970. Observations on nitrogenous excretion and water relations of *Chiromantis xerampelina* (Amphibia, Anura). *Arnoldia.* 5: 1–6.

Loveridge, J.P. 1976. Strategies of water conservation in southern African frogs. *Zool. Afr.* 11: 319–33.

Lutterschmidt, W.I. & Hutchison, V.H. 1997. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Can. J. Zool.* 75(10): 1553–1560.

MacNally, R. C. (1981). An analysis of factors affecting metabolic rates of two species of *Ranidella* (Anura). *Comp. Biochem. Physiol.* A69: 731–737.

McClanahan, L.L. & Baldwin, R. 1969. Rate of water uptake through the integument of the desert toad *Bufo punctatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 28: 381–89.

McClanahan, L. L., R. Ruibal, and V. H. Shoemaker. 1994. Frogs and toads in deserts. *Scientific American* 270: 82–88.

Moore, F.R. & Gatten, R.E. 1989. Locomotor performance of hydrated, dehydrated,

and osmotically stressed anuran amphibians. *Herpetologica* 45: 101–110.

Navas, C.A. 2003. Herpetological diversity along Andean elevational gradients: Links with physiological ecology and evolutionary physiology. *Comp. Biochem. Physiol.* 133A: 469–485.

Navas, C.A.; Antoniazzi, M.M.; Carvalho, J.E.; Suzuki, H. & Jared, C. 2007. Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosus* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. *Comp. Biochem. Physiol.* A147: 647–657.

Nomura, F. 2003. Ecologia reprodutiva e comportamento de forrageio e escavação de *Dermatonotus muelleri* (Boettger, 1885) (Anura, Microhylidae). Master thesis, UNESP, São José do Rio Preto.

Nomura F.; Rossa-Feres D.C. & Langeani, F. 2009. Burrowing behavior of *Dermatonotus muelleri* (Anura, Microhylidae) with reference to the origin of the burrowing behavior of Anura. *J. Ethol.* 27: 195–201.

Nomura, F. & Rossa-Feres, D.C. 2011. The frog *Dermatonotus muelleri* (Boettger 1885) (Anura Microhylidae) shifts its search tactics in response to two different prey distributions. *Ethol. Ecol. & Evol.* 23(4): 318–328.

Packard, G.C. 1971. Oxygen consumption of montane and piedmont chorus frogs (*Pseudacris triseriata*). Study of evolutionary temperature compensation. *Physiol. Zool.* 44: 90–97.

Prest, M.R.; Brust, D.G. & Wygoda, M.L. 1992. Cutaneous water loss and the effects of temperature and hydration state on aerobic metabolism of canyon treefrogs, *Hyla arenicolor*. *Herpetologica* 48: 210–219.

Pough, F.H. & Taigen, T.L. 1990. Metabolic correlates of the foraging and social behaviour of dart-poison frogs. *Anim. Behav.* 39: 145–155.

Putnam, R.W. & Hillman, S.S. 1977. Activity responses of anurans to dehydration. *Copeia* 1977: 746–749

Rezende, E.L.; Tejedo, M. & Santos, M. 2011. Estimating the adaptive potential of critical thermal limits: methodological problems and evolutionary implications *Funct. Ecol.* 25: 111–121.

Rogowitz, G.L.; Cortés-Rivera, M. & Nieves-Puigdoller, K. 1999. Water loss, cutaneous resistance, and effects of dehydration on locomotion in *Eleutherodactylus coqui*. *J. Comp. Physiol.* B169: 179–186.

- Rossa-Feres, D.C. & Jim, J. 2001. Similaridade no sítio de vocalização de uma comunidade de anfíbios anuros na região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Brasil. Zool.* 18 (2): 439–454.
- Russel, A.P.; Bauer, A.M. & Johnsonm, K. 2005. Migration in amphibians and reptiles: An overview of patterns and orientation mechanisms in relation to life history strategies. pp 151–203. *In: Migration of Organisms.* AMT Elewa (ed.). Springer.
- Secor, S. M. 2005. Physiological responses to feeding, fasting, and estivation for anurans. *J. Exp. Biol.* 208: 2595–2608.
- Shoemaker, V.H.; Balding, D. Ruibal, R. & McClanahan, L.L. 1972. Uricotelism and low evaporative water loss in a South American frog. *Science* 175: 1018–1020.
- Shoemaker, V.H. & McClanahan, L.L. 1975. Evaporative water loss, nitrogen excretion and osmoregulation in phyllomedusine frogs. *J. Comp. Physiol.* 100: 331–345.
- Shoemaker, V.H.; Hillman, S.S.; Hillyard, S.D.; Jackson, D.C.; McClanahan, L.L.; Withers, P.C. & Wygoda, M. 1992. Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. *In: Environmental physiology of the amphibians*, ed. Feder, M.E. & Burggren, W.W. 125–150. Chicago: University of Chicago Press.
- Sinsch, U. 1988. Seasonal changes in the migratory behaviour of the toad *Bufo bufo*: direction and magnitude of movements. *Oecologia* 76: 390–398.
- Spotila, J.R. & Berman, E.N. 1976. Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. *Comp. Biochem. Physiol.* A55: 407–411.
- Taigen, T.L. & Pough, F.H. 1983. Prey preference, foraging behavior, and metabolic characteristics of frogs. *Am. Nat.* 122: 509–520.
- Tashian, R.E. & Ray, C. 1957. The relation of oxygen consumption to temperature in some tropical, temperate, and boreal anuran amphibians. *Zoologica* 42: 63–68.
- Tejedo, M., H. Duarte, L. M. Gutiérrez-Pesquera, J. F. Beltrán, M. Katzenberger, F. Marangoni, C. A. Navas, A. G. Nicieza, R. A. Relyea, E. L. Rezende, A. Richter-Boix, M. Santos, M. Simon, and M. Solé. 2012. El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 23: 1-26.

Tempone, A.G.; Melhem, M.S.C.; Prado, F.O.; Motoie, G.; Hiramoto, R.M.; Antoniazzi, M.M.; Haddad, C.F.B. & Jared, C. 2007. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design and Discovery* 4: 67–73.

Terblanche, J.S.; Deere, J.A.; Clusella-Trullas, S.; Janion, C. & Chown, S.L. 2007. Critical thermal limits depend on methodological context. *P. Roy. Soc. Lond. B* 274: 2935–2942.20.

Terblanche, J.S.; Hoffmann, A.A.; Mitchell, K.A.; Rako, L.; Roux, P.L.; Steven, L. & Chown, S.T. 2011. Ecologically relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *T J. Exp. Biol.* 214: 3713–3725.

Titon Jr., B. 2009. Balanço hídrico e desempenho locomotor em espécies de anuros de Mata Atlântica e Cerrado. Dissertação de Mestrado, IB, USP-SP. 56 pp.

Thorson, T. & Svihla, A. 1943. Correlation of the habitats of amphibians with their ability to survive the loss of water. *Ecology* 24: 374–81.

Thorson, T.B. 1955. The relationship of water economy to terrestriality in amphibians. *Ecology* 36: 100–16.

Van Berkun, F.H.; Pough, F.H.; Stewart, M.M. & Brussard, P.F. 1982. Altitudinal and interspecific differences in the rehydration abilities of Puerto Rican frogs (*Eleutherodactylus*). *Physiol. Zool.* 55: 130–136.

Vizotto, L.D. 1967. Desenvolvimento de anuros da região norte-ocidental do Estado de São Paulo. São José do Rio Preto, Tipografia Rio Preto, +161p.

Young, J.E.; Christian, K.A.; Donnellan, S.; Tracy, C.R. & Parry, D. 2005. Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. *Physiol. Biochem. Zool.* 78: 847–856.

Walton, B.M. 1993. Physiology and phylogeny: The evolution of locomotor energetics in hylid frogs. *Am. Nat.* 141: 26–50.

Warburg, M.R. 1971. On the water economy of Israel amphibians: the anurans. *Comp. Biochem. Physiol.* A40: 911–924.

Weathers, W.W. & Snyder, G.K. 1977. Relation of oxygen consumption to temperature and time of day in tropical anuran amphibians. *Aust. J. Zool.* 25: 19–24.

Wells, K.D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. Chicago: University of Chicago Press.

- Withers, P.C. 1993. Metabolic depression during estivation in the Australian frogs, *Neobatrachus* and *Cyclorana*. *Aust. J. Zool.* 41 (5): 467–473.
- Withers, P.C.; Louw, G. & Nicholson, S. 1982. Water loss, oxygen consumption and colour change in 'waterproof' reed frogs (*Hyperolius*). *S. Afr. J. Sci.* 78: 30–32.
- Withers, P.C.; Hillman, S.S. & Drewes, R.C. 1984. Evaporative water loss and skin lipids of anuran amphibians. *J. Exp. Zool.* 232: 11–17.
- Withers, P.C. 1998. Evaporative water loss and the role of cocoon formation in Australian frogs. *Aust. J. Zool.* 46: 405–18.
- Witters, L.R.; Sievert, L. 2001. Feeding causes thermophily in the woodhouse's toad (*Bufo woodhousii*). *J. Therm. Biol.* 26(3): 205–208.
- Wygoda, M.L. 1984. Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. *Physiol. Zool.* 57: 329–337.

Table 1. Body size and mass, water balance, thermal tolerances, and resting metabolism for juvenile *Dermatonotus muelleri*. Chamber temperature for water balance and RMR was $25 \pm 1^\circ\text{C}$. SVL = snout-vent length; EWL = evaporative water loss; Rs = skin resistance; WU = water uptake. Mean \pm standard deviation.

	This study	Literature
Morphology (N)	27 individuals	Another <i>D. muelleri</i> population (1)
Body mass (g)	0.53 ± 0.03	–
SVL (mm)	16.17 ± 0.22	♀ = 67.2 ; ♂ = 59.3 (1)
Water balance (N)	9 individuals	41 species
EWL ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	8.81 ± 0.21	10.4 to 31.3 (2)
Rs ($\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)	1.82 ± 0.12	< 1 to 500 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14)
WU ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	53.57 ± 11.16	77.3 to 525 (15)
Dorsal skin Tb ($^\circ\text{C}$)	22.93 ± 0.04	–
Thermal tolerance (N)	8 individuals	15 species
Critical minimum ($^\circ\text{C}$)	10.62 ± 1.21	-4 to 11 (16)
Critical maximum ($^\circ\text{C}$)	37.20 ± 0.84	32.8 to 44.2 (16,17)
Resting metabolic rate (N)	7 individuals	13 species
Body mass (g)	0.436 ± 0.041	0.5 to 5.1 (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27)
$\dot{V} \text{O}_2$ ($\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.291 ± 0.065	0.09 to 0.610 (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27)
$\dot{V} \text{O}_2$ ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$)	0.1268 ± 0.028	0.0435 to 1.131 (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27)

Sources: (1) Nomura, 2003; (2) Wygoda, 1984; (3) Loveridge, 1970; (4) Shoemaker et al., 1972; (5) Shoemaker & McClanahan, 1975; (6) Spotila & Berman, 1976; (7) Drewes et al., 1977; (8) Withers et. al, 1982; (9) Withers et. al, 1984; (10) Buttemer, 1990; (11) Preest et al., 1992; (12) Amey & Grigg, 1995; (13) Christian & Parry, 1997; (14) Rogowitz et. al, 1999; (15) R.P. Bovo, unpublished data; (16) Brattstrom, 1968; (17) Navas et al., 2007; (18) Tashian & Ray, 1957; (19) Taigen & Pough, 1983; (20) Dunlap, 1971; (21) Dunlap, 1972; (22) Dunlap, 1980; (23) Davison, 1955; (24) Packard, 1971; (25) Bucher et al., 1982; (26) MacNally, 1981; (27) Weathers & Snyder, 1977.

FIGURES

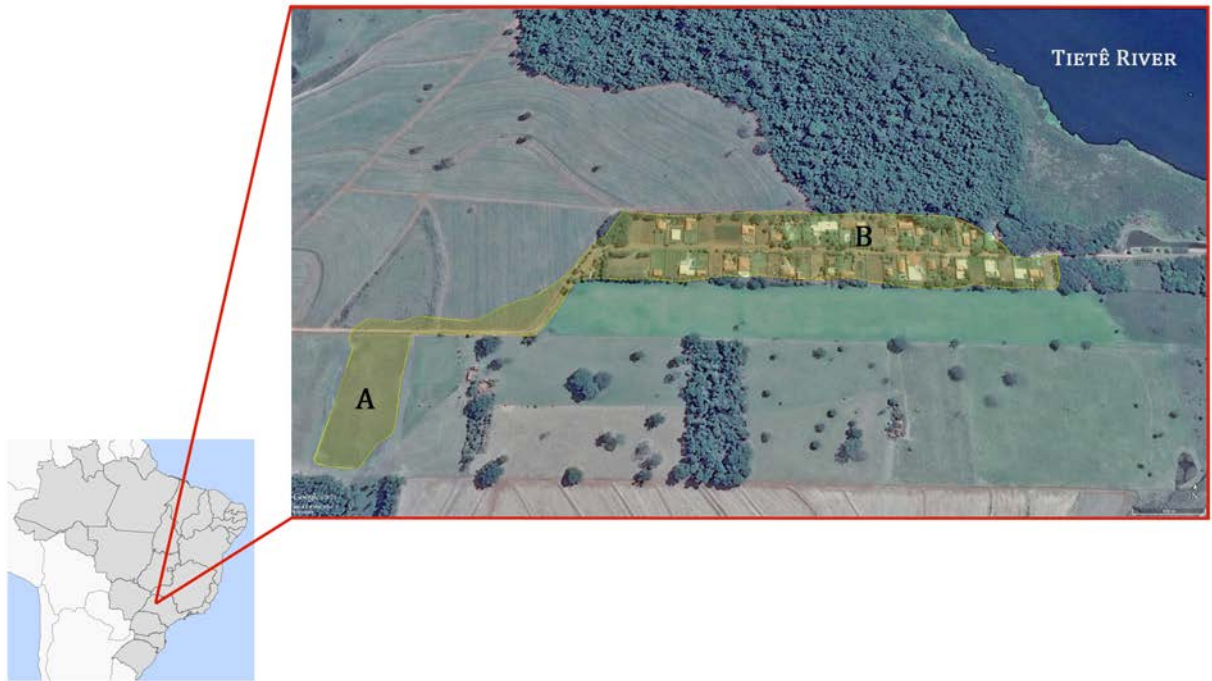


Figure 1. Map showing the location of the massive dispersion of *Dermatotonotus muelleri*, municipality of Barbosa, São Paulo, Brazil. Highlighted area (in yellow) indicates where juveniles were observed. A) A pond where thousands *D. muelleri* individuals metamorphosed; B) Capture location.

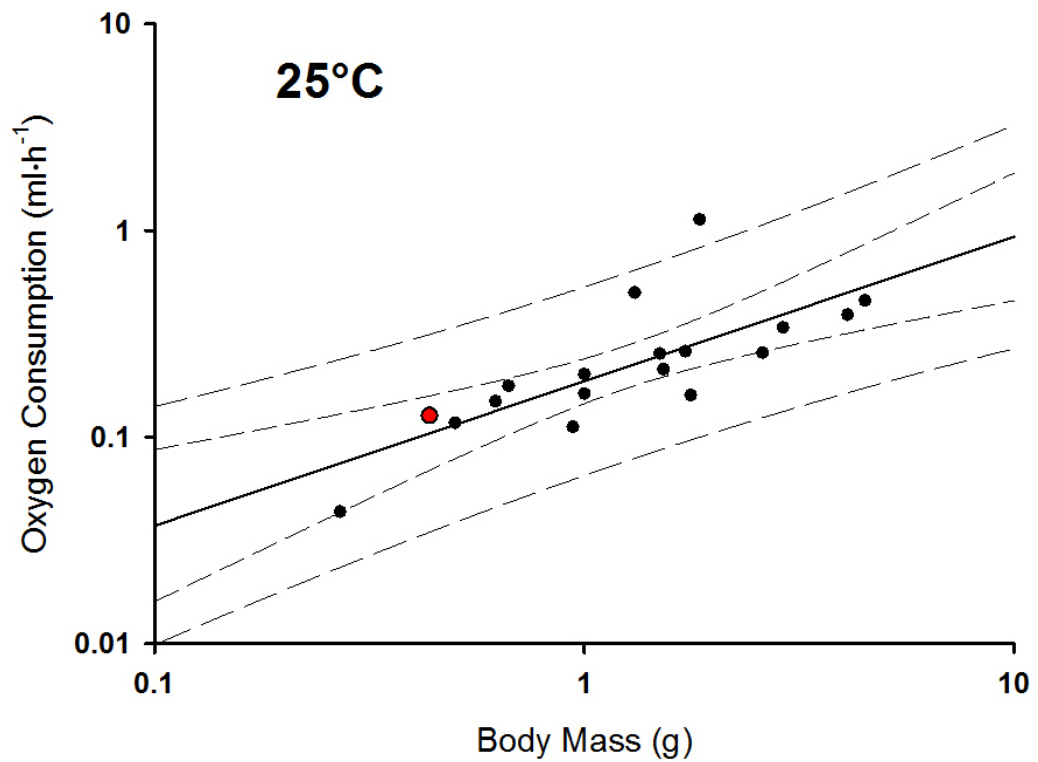


Figure 2. Log-log scaling relationship of resting metabolic rate as function of body mass, measured at 25°C. *Dermatonotus muelleri* (red dot) and several other anuran species with up to 5 grams (black dots), modified from Gatten et al. (1992). A linear regression fit (solid line) is included along with the 95% (outer dashed lines) and 99% (inner dashed lines) confidence intervals.

CONCLUDING REMARKS

Studying the thermal biology of amphibians is fundamental to understanding their physiology, ecology, behavior, distribution, and evolution. Amphibian thermal physiology involves interaction with other functions, such as water balance, both parameters that are virtually impossible to be evaluated in a decoupled manner. Interactions of this type add a scientifically stimulating dimension of complexity, which coupled with the high amphibian species diversity, and also with life modes found in this group, point to the fact that the potential for thermal biology studies in amphibians has been largely underestimated. Fortunately, this situation has been reversed in recent years, as reviewed in the Chapter 1 of this thesis.

Furthermore, we explored three topics (ecological gradients, diseases, and activity) focusing on the general theme of this thesis, i.e. the thermal physiology and water balance of amphibians. In the Chapter 2, we found interpopulational variation in physiological parameters in five amphibian species along elevational gradients in the Brazilian Atlantic Forest. Specifically, thermal tolerances to cold (critical thermal minimum, CTMin) – markedly – and rates of evaporative water loss (EWL) – slightly – decreased with altitude. On the other hand, other physiological traits tended to be more conservative (resistance to water efflux, rates of rehydration, and critical thermal maximum). Our findings call attention to altitudinal effects on physiological parameters, even in lower and older mountains as those from the east side of the South America, when compared to, for instance, the Andes (west side, higher and more recent reliefs). On the track of the emerging field of the Conservation Physiology, we believe that the effects of environmental parameters examined along an ecological gradient (altitudinal, latitudinal, etc.) on physiological capabilities bear the potential to yield valuable data to understand and predict potential consequences and responses of animals to scenarios of man caused changes in habitat and climate.

The pathophysiological effects of chytridomycosis – an emerging fungal disease claimed to cause amphibian population declines and extinctions worldwide due to cutaneous osmoregulatory disorders – remains to be more deeply investigated (as suggested in the Chapter 3 of this thesis). Infections by the enzootic fungus (Global Pandemic Lineage) caused no significant mortality, however we found a reduction of EWL and increase in resistance skin to water efflux in one of three host species from Brazilian Atlantic Forest. Our findings underscore the need for

further assessment of host physiological responses to *Bd* infection, even in cases of aclinical chytridiomycosis and long-term enzootic infections in natural populations. Indeed, sub-lethal physiological changes, as observed in one of our focal species, might reflect decreased fitness and lead to silent shifts in population numbers and community structure in the wild.

Lastly, the diurnal activity of dispersing juvenile burrowing frogs, *Dermatonotus muelleri*, seems not correlated with changes in physiological traits, which might allow them to cope with challenging conditions during daytime migrations (Chapter 4 of this thesis). We found juvenile frogs exhibited low resting metabolic rate, high rates of evaporative water loss, low skin resistance, low levels of water uptake, and low thermal tolerance. In general, all parameters measured fell within the expected range anticipated for fossorial/non-arboreal anurans. Thus, our results did not support the idea that activity, during daytime dispersal, of juveniles of a frog species are accompanied by adjustments on organismal physiological traits (at least those we measured).