
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rodolfo César de Oliveira Anderson

**Desidratação e balanço hídrico de um
Anfíbio anuro (*Rhinella schneideri*)**



Rio Claro

2015

RODOLFO CÉSAR DE OLIVEIRA ANDERSON

DESIDRATAÇÃO E BALANÇO HÍDRICO DE UM ANFÍBIO ANURO
(*RHINELLA SCHNEIDERI*)

Orientador: Denis Otavio Vieira de Andrade

Co-orientador: Rafael Parelli Bovo

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Rio Claro

2015

597.8 Anderson, Rodolfo César de Oliveira
A549r Desidratação e balanço hídrico de um anfíbio anuro
(*Rhinella schneideri*) / Rodolfo César de Oliveira Anderson. -
Rio Claro, 2015
34 f. : il., gráfs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Denis Otávio Vieira de Andrade

Coorientador: Rafael Parelli Bovo

1. Anuro. 2. Desidratação. 3. Balanço hídrico. I. Título.

Dedico este trabalho a minha avó Vandete e a minha mãe Salete

Agradecimentos

Através dessas singelas palavras escritas em meio ao calor estridente de Janeiro, gostaria de demonstrar gratidão a todos àqueles que me ajudaram, mesmo que imperceptivelmente, e me guiaram até o presente momento.

Primeiramente gostaria de agradecer aqueles dos quais, infelizmente, não recordarei nesse curto espaço de texto. São muitos, partindo desde o início da minha vida até agora, que acrescentaram uma gota, que seja, a essa condição existencial.

Em seguida, gostaria de agradecer a minha família. Meus pais, que além de fornecerem seus genes, também forneceram um lar e uma educação que eu desejaria a todos. A minha avó, nem o número de grãos de areia presentes em um deserto atingiria a magnitude dessa gratidão. Aos demais aparentados também lhes agradeço, especialmente meus tios e tias, pelo apoio e aconselhamento.

Agora, agradeço aqueles que compartilham e compartilharam essa fase ou momento da minha caminhada pela Terra, ou seja, as pessoas que lembrarei em mais detalhe. Agradeço, em resumo, as casas (Repúblicas) das quais as pessoas moradoras e ex-moradores contribuíram e muito na caminhada. Em especial, a Villa, Metazoa e Mojitos.

Agradeço também aos ilustríssimos parceiros de teto ao longo desses anos. Ao Troll (Otávio Baiano) e Carlos Kadu Eduardo, em aturam desde o início. Ao Tarzan (Thales Jigsó), Zuado (Renan), Luciano Huck (Lucas), Capiroto (outro Lucas), Piratão (Fernando), Pistinão (Arthur) Gabi, Roberto (vulgo Guilherme), Rei Caveira (mais um Lucas), Carol, Siri (Bruno), Fernanda Ogawa, Levi Dileve, Manuel, Caue, Regaça (Bia), Farofa, a galera da minha sala. Aos meus amigos de Muzambinho, Caetano, Filipe Castro, Caio, Wendell, Gabriel do Buda, Renatinho, Shimul, Gustavo, Chimanai. Agradeço a todos.

Agradeço também as pessoas que me ajudaram na condução e finalização deste trabalho. O orientador, Dênis. O co-orientador, Rafael. Todos os que trabalham e já trabalharam no Jacarezário.

Por fim, agradeço também aos livros e seus autores. A minha amada Gabriela. Ao esporte, principalmente o futebol. A abençoada cerveja. A música e a arte. O Sol. O Charles Darwin e a Evolução. A Natureza. As substâncias. A imaginação e criatividade. A noite. A Paz. Agradeço por estar vivo.

Com certeza pessoas muito importantes e marcantes nessa jornada não foram mencionadas, minhas desculpas. Porém, isso é só uma formalidade e um pedaço de papel que vai ser guardado. O que realmente importa, é que lhes estou agradecido de uma forma que transcende esse universo físico, uma forma que não compreendemos ainda.

Obrigado.

Resumo

A manutenção do balanço hídrico ou de água é particularmente desafiadora para os anfíbios em virtude de seu tegumento altamente permeável e o risco associado de perda evaporativa de água. Neste sentido, anuros terrestres exibem uma grande diversidade de mecanismos que atuam na diminuição da perda evaporativa de água e contribuem para a manutenção de um balanço hídrico adequado. Ademais, algumas espécies de anuros são conhecidas por tolerar altos níveis de desidratação e por engajar-se em atividades de rotina na natureza, ainda que sob níveis variáveis de desidratação. Finalmente, o próprio nível de desidratação pode acarretar alterações nos fatores envolvidos na manutenção do balanço de água dos anuros, aspecto muito pouco explorado em espécies terrestres neotropicais. Dessa forma, no presente estudo, mensuramos as taxas de perda evaporativa de água (PEA), reidratação a partir de água livre (Re) e calculamos a resistência da pele a desidratação (RP) em indivíduos adultos de *Rhinella schneideri* submetidos experimentalmente a diferentes níveis de desidratação (99%, 90%, 80% e 70% da massa corpórea inicial). Ademais, medimos as alterações causadas pela desidratação na osmolalidade plasmática (Osm), hematócrito (Htc), concentração de hemoglobina no sangue ([Hb]) e massa percentual dos órgãos viscerais. O objetivo central deste estudo foi avaliar os efeitos potenciais de diferentes níveis de desidratação sobre indicadores e repostas fisiológicas relevantes para a manutenção do balanço hídrico em uma espécie de anfíbio anuro terrestre. Nossos resultados mostram que quanto mais desidratados os animais, maiores a RP, a Re, a Osm, o Htc e a [Hb], e menores a PEA, e a massa percentual do fígado e do rim. O aumento da Osm, Htc e [Hb] indicam uma diminuição do compartimento aquoso do sangue, o que pode estar relacionado ao aumento da Re. A relação entre diminuição da PEA e aumento da RP com aumento do nível de desidratação pode ser interpretada como conveniente (e provavelmente generalizada entre anfíbios) para a manutenção do balanço hídrico. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores e apontam que diversas variáveis fisiológicas associadas ao balanço hídrico dos anuros variam significativamente (e de maneira concomitante) com o nível de desidratação. A contribuição potencial desses efeitos para o balanço hídrico global de anuros na natureza constitui tópico de grande interesse para investigações futuras.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Animais e Protocolo de Desidratação	11
3.2. Perda Evaporativa de Água e Reidratação	12
3.3. Coleta de Sangue, Plasma e Massa dos Órgãos Internos	12
3.4. Tratamento e Análise dos Dados	14
4. RESULTADOS	16
4.1. Perda Evaporativa de água e resistência da pele a desidratação	16
4.2. Taxa de reidratação e osmolalidade plasmática	18
4.2.1. Osmolalidade plasmática, perda evaporativa de água e taxa de reidratação	18
4.3. Hematócrito e concentração de hemoglobina	20
4.4. Massa percentual dos órgãos	22
5. DISCUSSÃO	24
6. REFERÊNCIAS	28

1. Introdução

A disponibilidade de água tem grande importância na distribuição geográfica e ecologia dos anfíbios, influenciando o comportamento e a atividade de muitas espécies de anfíbios (SCHWARZKOPF; ALFORD, 1996; GROVER, 2000; SEEBACHER; SALFORD, 2002). Em ambiente terrestre, anfíbios são expostos à desidratação e presumivelmente não sobrevivem sem contato periódico com a água (JORGENSEN, 1997). O aumento do risco de desidratação está associado com a colonização desses ambientes, tendo moldado diversos aspectos da história de vida e fisiologia dos anfíbios, incluindo padrões de atividade e evolução de hábitos noturnos (HADDAD, 1995; NAVAS, 2007; TITON; GOMES, 2012).

Uma ameaça inerente aos anfíbios, especialmente aqueles com hábito terrestre, é o risco potencial de perda excessiva de água devido à evaporação através do tegumento. De fato, anfíbios possuem tegumento altamente permeável, podendo exibir taxas de perda evaporativa de água tão altas quanto à de uma superfície de água livre (WYGODA, 1984). Em espécies terrestres e arbóreas, porém, a resistência da pele à evaporação geralmente é aumentada (YOUNG et al., 2005) podendo, em alguns casos excepcionais, ser comparadas àquelas dos répteis (SHOEMAKER et al., 1972; WYGODA, 1984). Muito embora haja uma variedade de modificações morfológicas, fisiológicas e comportamentais para diminuir o impacto do risco de desidratação, a tolerância à desidratação é essencial para que os anfíbios possam manter-se vivos e/ou mesmo ativos na maioria dos ambientes onde são encontrados (KATZ, 1989; JORGENSEN, 1997; WELLS, 2010). A tolerância à desidratação é bastante variável em anfíbios anuros, com algumas espécies tolerando perdas excepcionais de 50 a 60% da massa corpórea (MCNAB, 2002; HILLMAN, 2009). A variação na tolerância à desidratação parece estar relacionada a fatores como o hábito das espécies e o tamanho dos animais (THORSON; SVIHLA, 1943; THORSON, 1955).

Nos anuros desidratados, a perda evaporativa de água é acompanhada por um aumento na concentração dos fluidos corpóreos (SHOEMAKER, 1964; DEGANI et al., 1982) e aumento da concentração de solutos: ureia e íons sódio e cloreto se acumulam no sangue e nos tecidos (SHOEMAKER, 1964; ALVORADO, 1972; HILLMAN, 1978; DEGANI; WARLBURG, 1983; HILLMAN, 1988; DEGANI, 1995). Não obstante, os órgãos internos também são afetados pela perda de água podem ter suas massas relativas diminuídas quando o animal encontra-se desidratado (CHURCHILL; STOREY, 1994). A perda do volume

plasmático também é um efeito marcante, o sangue torna-se viscoso e há o aumento do hematócrito (HILLMAN, 2009) o que pode comprometer a capacidade cardiovascular e metabólica (HILLMAN, 1987), afetando o funcionamento de órgãos e músculos (HILLMAN, 1978; 1987). Em vista disso, o aumento da viscosidade do sangue e do grau de vasoconstrição ocasiona um aumento da resistência periférica e uma diminuição do débito cardíaco, consequências que, ligadas ao estresse hídrico, podem levar a insuficiência do metabolismo basal (HILLMAN, 1978; 1987).

Embora, em linhas gerais, a desidratação afete de maneira negativa o anuro, o aumento da pressão coloidosmótica dos fluidos corpóreos pode ter consequências convenientes para a manutenção do balanço hídrico, como a captação de água baseada na diferença osmótica entre o animal e o meio (Hillman, 2009), aspectos estes, muito pouco explorados em espécies terrestres neotropicais. De fato, o nível de desidratação pode afetar tanto o grau de perda evaporativa de água quanto o potencial para sua reabsorção. Nesse sentido, o presente trabalho procurou investigar os efeitos da desidratação sobre parâmetros relevantes para a manutenção do balanço hídrico em uma espécie de anfíbio anuro terrestre, *Rhinella schneideri* (Bufonidae). A elucidação detalhada de parâmetros fisiológicos associados a quadros de desidratação pode contribuir para o melhor entendimento dos tipos de ajustes que podem ser empregados por esses animais que, diante um estado de déficit hídrico, possam manter-se ativos e realizar suas atividades rotineiras na natureza.

2. Objetivos

Mensurar (i) as taxas de perda evaporativa de água (PEA) e (ii) taxas de reidratação a partir de água livre (Re), (iii) a osmolalidade plasmática (Osm), (iv) o hematócrito (Htc), (v) a concentração de hemoglobina no sangue ([Hb]) e também, (vi) calcular a resistência da pele à desidratação e (vii) a variação na massa relativa dos órgãos em indivíduos de *R. schneideri* submetidos experimentalmente a diferentes níveis de desidratação.

Especificamente, testamos as seguintes hipóteses:

1. Com o aumento do nível de desidratação, haverá a diminuição da perda evaporativa de água, causada pelo aumento da resistência da pele à desidratação.
2. A taxa de reidratação a partir de água livre será maior nos grupos mais desidratados.
3. A osmolalidade plasmática aumentará conforme o aumento do nível de desidratação.
4. O hematócrito e a concentração de hemoglobina serão maiores nos grupos mais desidratados.
5. Alguns órgãos manterão sua massa relativa e outros terão suas massas relativas diminuídas com o aumento do nível de desidratação.
6. As respostas descritas em 1 e 2 devem estar relacionadas com as alterações mencionadas em 3.

3. Material e Métodos

3.1. Animais e Protocolo de Desidratação

Rhinella schneideri (WERNER, 1894) (Anura, Bufonidae) é uma espécie de anfíbio anuro abundante e de grande porte amplamente distribuída na América do Sul, ocorrendo em uma vasta variedade de habitat, incluindo áreas abertas e urbanas, das regiões do Chaco, Cerrado e Floresta Atlântica (PRAMUK, 2006;). Quando adultos, os indivíduos são noturnos, predominantemente terrestres, se alimentam majoritariamente de artrópodes (LAJMANOVICH, 1994) e se reproduzem de Outubro a Abril (NORMAN, 1994).

Foram coletados 40 indivíduos adultos de *R. schneideri* (massa corpórea = $177,28 \pm 83,32$ g; Licença IBAMA 22028-1), de ambos os sexos, no município de Barbosa, SP, sudeste do Brasil (21.25048°S , 49.92132°W ; datum: WGS84; elev. 371 m) nos dias 30 e 31 de setembro 2013 (Licença IBAMA 22028-1). Após coletados, os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo natural no laboratório de Fisiologia Animal Comparada, junto ao Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, em Rio Claro, SP. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (20 cm x 30 cm x 70 cm) nas quais foram oferecidos locais de abrigo e recipientes contendo água *ad libitum*. A alimentação consistia em pequenos grilos que eram oferecidos aos animais a cada dois dias. Com três dias de antecedência dos experimentos a comida não era mais oferecida.

Os 40 animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais, cada um contendo 10 indivíduos. Cada grupo foi submetido experimentalmente à desidratação até que a massa corpórea dos animais atingisse valores equivalentes a 99% (controle hidratado; massa = $167,9 \pm 65,3$ g), 90% (massa = $214,17 \pm 116,7$ g), 80% (massa = $161,15 \pm 84,4$ g) e 70% (massa = $165,8 \pm 54,7$ g) da massa corpórea inicialmente registrada nos animais completamente hidratados (massa não apresentou diferença significativa, $P=0,793$). Para tanto, os animais foram inicialmente hidratados através de sua permanência, por uma hora, em um recipiente fechado contendo aproximadamente 1 cm de água, em uma câmara climática B.O.D (Eletro Lab, modelo 122FC) mantida a 25°C . Após, o conteúdo de água da bexiga dos animais foi retirado via pressão abdominal e os animais novamente pesados sendo que esta massa corpórea foi considerada como a massa inicial dos animais quando completamente hidratados. Imediatamente após esta pesagem, os animais foram desidratados através da sua exposição a

um túnel de vento (fluxo de ar = $2,5 \pm 0,5$ m/s), mantido a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $50 \pm 5\%$ ambiente. A cada intervalo de trinta minutos, os animais eram retirados e pesados, para o acompanhamento da massa corpórea até que o nível de desidratação desejado fosse atingido.

Uma vez desidratados, os animais foram imediatamente submetidos aos experimentos para a medição da taxa de perda evaporativa de água (PEA) e de reidratação (Re) (Ver seção 3.2). Após, os animais foram novamente reidratados e mantidos em cativeiro por um período mínimo de sete dias. Após este período de recuperação, os animais foram novamente desidratados até o mesmo nível de desidratação ao qual haviam sido submetidos anteriormente e, em seguida, foram eutanaziados com uma injeção de benzocaína 2% (aproximadamente 1 mL) diretamente no cérebro, via forame magno, para a coleta de sangue, plasma e determinação da massa dos órgãos internos.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (IB-UNESP-RC), nº2570, proc. 2/2

3.2. Perda Evaporativa de Água e Reidratação

As taxas de perda evaporativa de água foram mensuradas em um sistema de fluxo aberto, no qual um conjunto de bombas de ar associado a um fluxímetro de massa (SS-3 Sub-sampler – Sable Systems) gerava um fluxo constante de ar ($1,1 - 1,5 \text{ cm.s}^{-1}$), com umidade relativa controlada em 30% (RH/Dewpoint Controller – Sable Systems) que era direcionado para uma de duas câmaras hermeticamente fechadas: uma vazia e outra contendo o espécime em experimento. O fluxo de ar excurrente destas câmaras era então enviado a um analisador de vapor de água (RH – 300 RH/Dewpoint Analyzer – Sable Systems). Os registros obtidos por este analisador foram continuamente adquiridos via uma interface de aquisição de dados (UI-2 Data Acquisition Interface – Sable Systems) e digitalmente armazenados. Todo o sistema de determinação da PEA, exceto pela interface de aquisição de dados e computador, foi alojado dentro de uma câmara climática B.O.D (Eletro Lab, modelo 122FC) mantida a 25°C .

No início dos experimentos, os animais foram pesados (Balança Marte, Modelo AS5500C, com precisão de $\pm 0,01\text{g}$) e transferidos para a câmara experimental (volume = 1 litro), a qual foi então transferida para dentro da câmara climática (mencionada acima) para controle da temperatura. Os animais foram então deixados nesta condição por um período

mínimo de 60 minutos para aclimatação com a temperatura experimental. Após este período, as medições de PEA foram iniciadas e prosseguiram por um período mínimo de duas horas, buscando-se a obtenção de um período mínimo de medições constantes (*steady state*), em torno de 30 minutos. Ao final dos registros, os indivíduos foram retirados da câmara, tiveram a temperatura corpórea superficial (pele dorsal) imediatamente medida com um termômetro a laser (Fluke Infrared Thermometer 62 mini) e, por fim, foram novamente pesados ($\pm 0,01$ g).

A determinação da taxa de reidratação foi realizada imediatamente após a medição da PEA. Para tanto, os animais foram colocados em recipientes (15 cm de diâmetro e 6 cm de altura) contendo água mineral (0,5 a 1 cm de profundidade). Em intervalos de 2 minutos, os animais eram retirados deste recipiente, cuidadosamente secos com papel absorvente e pesados, processo realizado por seis vezes consecutivas. As taxas foram calculadas pela regressão linear do ganho de água pelo tempo para cada indivíduo.

3.3. Coleta de sangue, plasma e massa dos órgãos internos

Imediatamente após a eutanásia (ver seção 3.1), coletamos alíquotas de sangue para determinação do hematócrito, osmolalidade do plasma e concentração de hemoglobina. Quando não processadas imediatamente, as amostras de plasma e sangue total foram armazenadas em freezer – 80 °C. O hematócrito foi medido em alíquotas de sangue submetidas à centrifugação (Micro Spin micro hematocrit centrifuge) 10000 RPM por 10 minutos. O plasma foi igualmente separado por centrifugação a 13 000 RPM por 5 minutos. A osmolalidade plasmática foi determinada por meio do ponto de congelamento em um osmômetro Knauer SemiMicro (N.S. 19292). A concentração de hemoglobina foi analisada por método colorimétrico (BioClin K023 e K029) em um espectrofotômetro Femto 600Plus.

Imediatamente após a coleta das amostras de sangue, os animais foram dissecados e massa dos seguintes órgãos mensurada: ventrículo, fígado, rim, baço, estômago e intestino. Todos os órgãos foram secos com papel absorvente antes de serem pesados em uma balança (Ohaus Explorer E12140) com precisão de 0,0001 g.

3.4. Tratamento e análise dos dados

As taxas de perda de água por evaporação foram medidas a partir da fórmula:

$$TD = Fa DVAA - Fv DVAv$$

onde TD representa a taxa de perda de água por evaporação absoluta ($\mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$); Fa e Fv representam o fluxo de ar ($\text{cm}^3\cdot\text{s}^{-1}$) na câmara contendo o animal e na câmara vazia, respectivamente; e $DVAa$ e $DVAv$ representam a densidade do vapor de água ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), do ar que deixa, respectivamente, a câmara contendo o animal e a câmara vazia. A taxa de perda de água por evaporação por área de exposição foi calculada dividindo-se a TD por dois terços da superfície corpórea total dos animais que, segundo Withers e colaboradores (1982). A área de superfície total foi calculada pela fórmula (McClanahan & Baldwin, 1969):

$$SA = 9,9M^{0,56}$$

onde SA representa a área de superfície total (cm^2) e M representa a massa corpórea do animal (g).

A resistência à perda de água por evaporação é composta pelas forças de resistência da pele (RP) e pela resistência da camada de vapor de água na superfície da pele (RB) resultando na resistência total (RT) ($RT = RP + RB$; Spotila & Berman, 1976; Wygoda, 1984, 1988). Modelos de ágar (3%) foram feitos para estimativa da resistência da camada de água da superfície (RB) e medidos nas mesmas condições descritas anteriormente para PEA, uma vez que o ágar perde água como uma superfície de água livre (Spotila & Berman, 1976). Tais modelos de ágar foram confeccionados a partir de contra-moldes de alginato utilizando-se indivíduos de tamanho similar aos espécimes utilizados nos experimentos. As resistências foram calculadas a partir da fórmula:

$$R = (DVAs - [DVAA * RH\%]) / TDa$$

onde R representa a resistência à perda de água por evaporação (s.cm^{-1}); DVA_s representa a densidade do vapor de água saturado ($\mu\text{g.cm}^{-3}$) na superfície da pele do animal; DVA_a representa a densidade do vapor de água ($\mu\text{g.cm}^{-3}$) do ar que entra na câmara contendo o animal ou o modelo de ágar; $RH\%$ é a umidade relativa do ar ambiente; e TD_a representa a taxa de perda de água por evaporação por área de exposição ($\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Utilizamos análises de variância para um fator (ANOVA One-Way) para verificar a existência de diferenças entre os grupos experimentais. Em todos os casos, as premissas de testes paramétricos foram previamente avaliadas. Caso os dados não atendessem as premissas, transformações em Logarítimo (Log 10 ou natural) foram realizadas na tentativa de melhorar a distribuição residual. Quando as transformações em Log não surtiram efeito, utilizamos testes não paramétricos com os valores originais das variáveis. Quando houve diferença significativa, análises *a posteriori* de comparação múltiplas foram feitas utilizando os testes Holm-Sidak ou Student-Newman-Keuls. Além disso, utilizamos correlação linear para testar a relação entre as variáveis PEA, Re, Osm, Htc e [Hb] e o nível de desidratação. Utilizamos correlação de Spearman para a comparação entre as variáveis Osm x TD e Osm x Re. Todos os testes estatísticos foram baseados em Zar (1999) e as diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Perda Evaporativa de água e resistência da pele a desidratação

As taxas de PEA variaram entre os diferentes grupos experimentais ($F_{3,33} = 9,655$, $P < 0,001$), sendo que diferenças significativas apenas não foram encontradas entre 90% e 80% e entre 80% e 70% (Student-Newman-Keuls: $P = 0,81$ e $P = 0,304$, respectivamente; Figura 1). Ademais, a PEA foi linearmente correlacionada com o nível de desidratação ($R = 0.691$; $P < 0,001$; $n = 40$), i.e., quando maior o nível de desidratação menor a PEA.

A RP também variou entre os diferentes grupos experimentais ($H_3 = 30,051$, $P \leq 0,001$), não apresentando diferenças significativas apenas entre 99% e 90% (Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$; Figura 2).

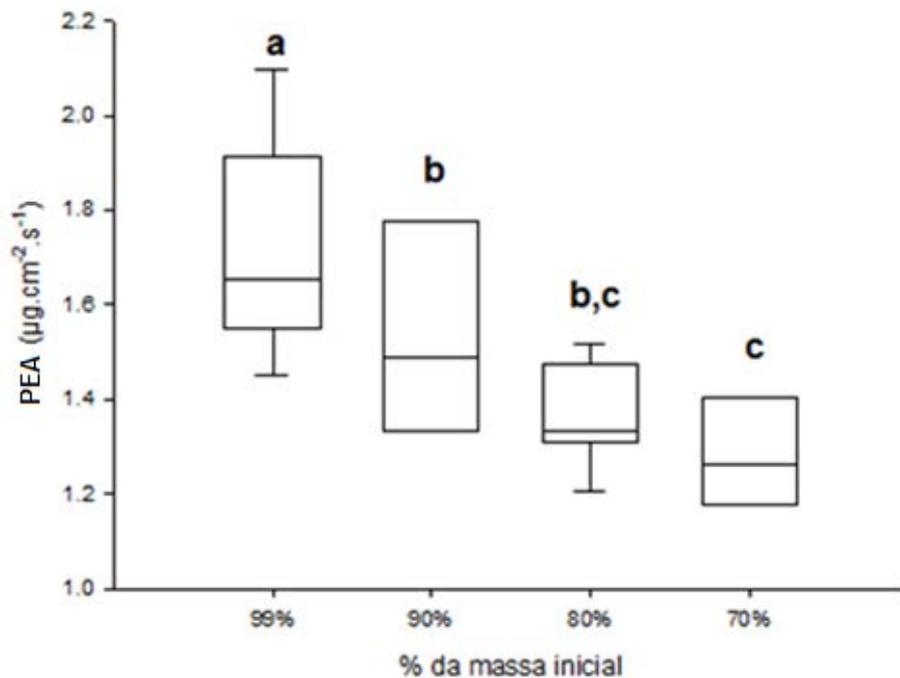


Figura 1. Box Plot da Perda evaporativa de água (PEA) em diferentes níveis de desidratação (% da massa corpórea inicial) em *Rhinella schneideri*. Quatro diferentes tratamentos

empregados: 99%, 90%, 80% e 70% da massa inicial. Letras indicam os grupos que diferiram entre si. Diferenças significativas consideradas entre os grupos quando $P \leq 0,05$.

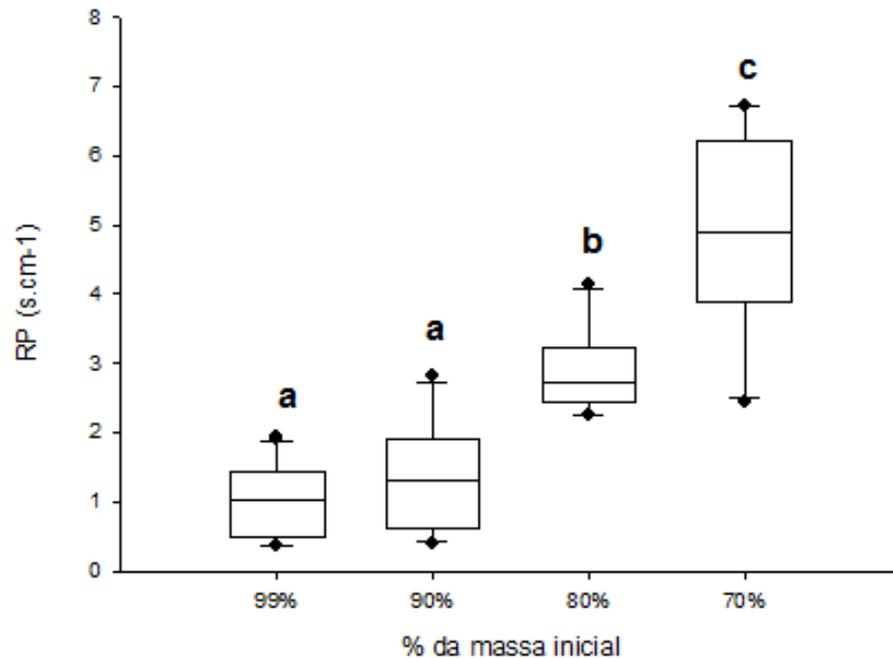


Figura 2. Box Plot da Resistência da pele a perda de água evaporativa (RP) em diferentes níveis de desidratação (% da massa corpórea inicial) em *Rhinella schneideri*. Quatro diferentes tratamentos empregados: 99%, 90%, 80% e 70% da massa inicial. Letras indicam os grupos que diferiram entre si. Diferenças significativas consideradas entre os grupos quando $P \leq 0,05$.

4.2. Taxa de reidratação e osmolalidade plasmática

A taxa de reidratação diferiu entre os diferentes tratamentos ($F_{3,36}=29,63$, $P < 0,001$), não apresentando diferenças significativas apenas entre 80% e 70% (Holm-Sidak: $P=0,14$; Figura 3). A Re apresentou correlação com o nível de desidratação ($R=0,784$; $P < 0,001$; $n=40$), sendo maior a medida que há o aumento do nível de desidratação.

A osmolalidade plasmática também diferiu entre os diferentes tratamentos ($F_{3,29}=124,493$; $P < 0,001$), apresentando diferenças significativas entre todos os grupos (Holm-Sidak: $P < 0,05$; Figura 4) e, houve relação positiva com o nível de desidratação ($R=0,965$; $P < 0,001$; $n=30$), ou seja, conforme maior o nível de desidratação maior a osmolalidade plasmática.

4.2.1. Osmolalidade plasmática, perda evaporativa de água e taxa de reidratação

O par de variáveis Osm e PEA foram significativamente correlacionadas e inversamente proporcionais entre si (Coeficiente de correlação = $-0,786$; $P < 0,001$), i.e, quando há o aumento da Osm haverá a diminuição da PEA. Na outra correlação, a Osm foi significativa e diretamente correlacionada a Re (Coeficiente de correlação: $0,764$; $P < 0,001$), i.e, quando maior o valor da Osm maior será a Re.

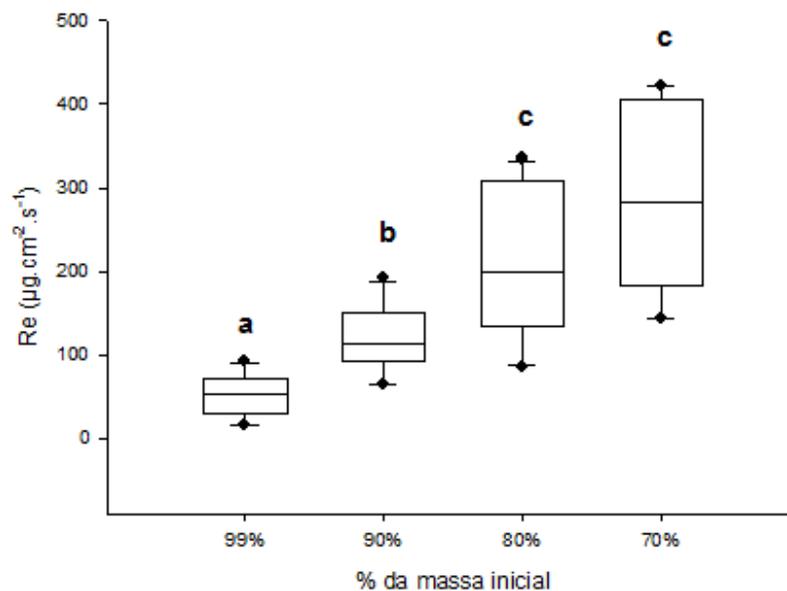


Figura 3. Box Plot da taxa de reidratação a partir de água livre (Re) em diferentes níveis de desidratação (% da massa corpórea inicial) em *Rhinella schneideri*. Quatro diferentes tratamentos empregados: 99%, 90%, 80% e 70% da massa inicial. Letras indicam os grupos que diferiram entre si. Diferenças significativas consideradas entre os grupos quando $P \leq 0,05$.

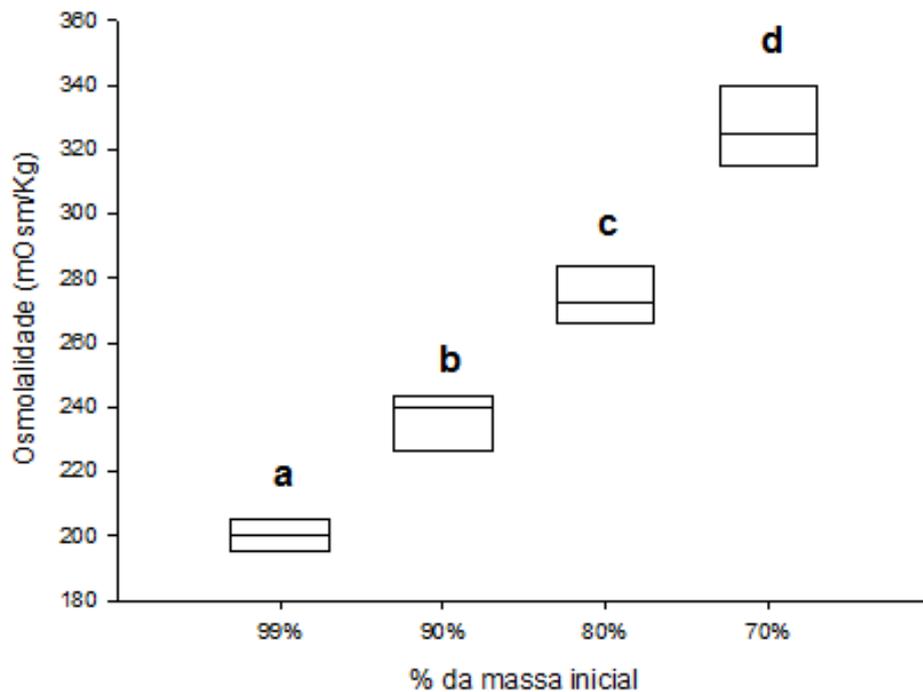


Figura 4. Box Plot da osmolalidade plasmática em diferentes níveis de desidratação (% da massa corpórea inicial) em *Rhinella schneideri*. Quatro diferentes tratamentos empregados: 99%, 90%, 80% e 70% da massa inicial. . Letras indicam os grupos que diferiram entre si. Diferenças significativas consideradas entre os grupos quando $P \leq 0,05$.

4.3. Hematócrito e concentração de hemoglobina

O Htc variou entre os diferentes níveis de desidratação ($F_{3,32} = 59,359$; $P < 0,001$), apresentando diferenças significativas entre todos os grupos (Holm-Sidak: $P < 0,001$; Figura 5). A [Hb] também variou entre os níveis de desidratação ($F_{3,33} = 9,954$, $P < 0,001$; Tabela1, Figura 6), apresentando diferenças significativas apenas entre o grupo 99% dos demais e entre 90% e os grupos 80% e 70% (Holm-Sidak $P < 0,05$; Figura 6). Quando testado a relação entre o Htc e o nível de desidratação obtemos um resultado significativo, com o Htc sendo positivamente correlacionado ao nível de desidratação ($R = 0,924$; $P < 0,001$; $n = 33$). A [Hb] também apresentou resultados significativos e foi positivamente relacionada ao nível de desidratação ($R = 0,692$; $P < 0,001$; $n = 34$).

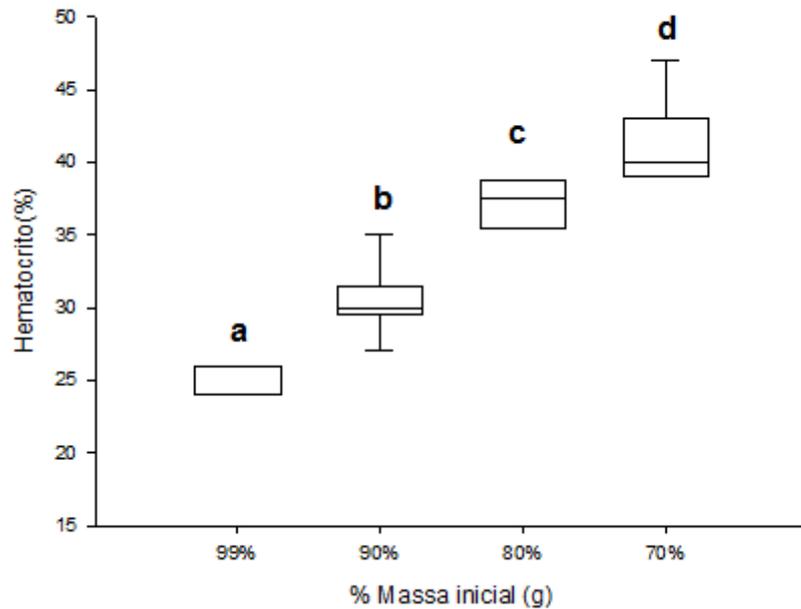


Figura 5. Box Plot do hematócrito em diferentes níveis de desidratação (% da massa corpórea inicial) em *Rhinella schneideri*. Quatro diferentes tratamentos empregados: 99%, 90%, 80% e 70% da massa inicial. Letras indicam os grupos que diferiram entre si. Diferenças significativas consideradas entre os grupos quando $P \leq 0,05$.

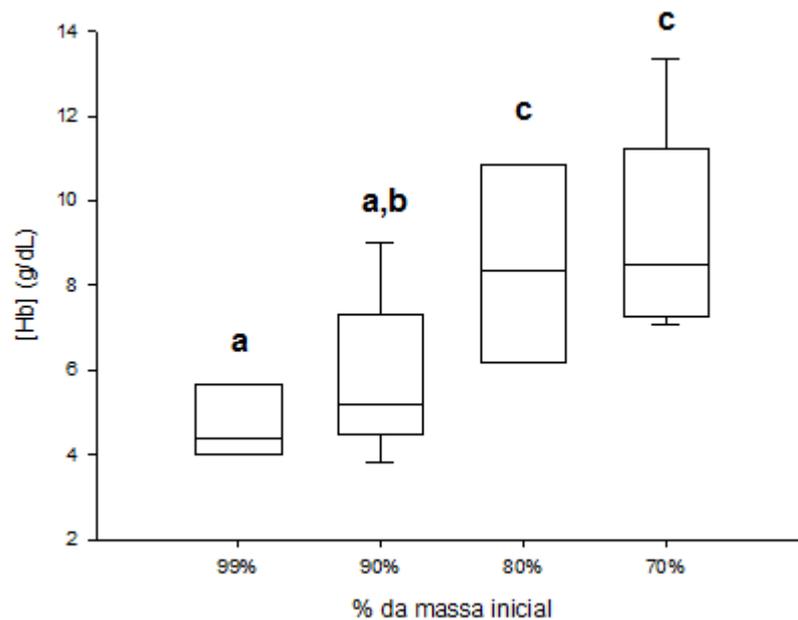


Figura 6. Box Plot da concentração de hemoglobina ([Hb]) em diferentes níveis de desidratação (% da massa corpórea inicial) em *Rhinella schneideri*. Quatro diferentes tratamentos empregados: 99%, 90%, 80% e 70% da massa inicial. Diferenças significativas consideradas entre os grupos quando $P \leq 0,05$.

4.4. Massa percentual dos órgãos

A massa percentual dos órgãos ventrículo, baço, estômago e intestino não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes níveis de desidratação ($P > 0,05$ em todos os casos; Figura 7). A massa relativa do fígado variou entre os tratamentos ($F_{3,34}=21.456$; $P<0,001$), não apresentando diferenças significativas apenas entre 99% x 90% e 90% x 80% (Student-Newman-Keuls: $P>0,05$; Figura 7). Finalmente, a massa relativa do rim também variou entre os diferentes tratamentos ($F_{3,37}=5,877$; $P=0,002$) e apresentou diferença significativa apenas entre 99% e os demais (Student-Newman-Keuls: $P<0,05$; Figura 7).

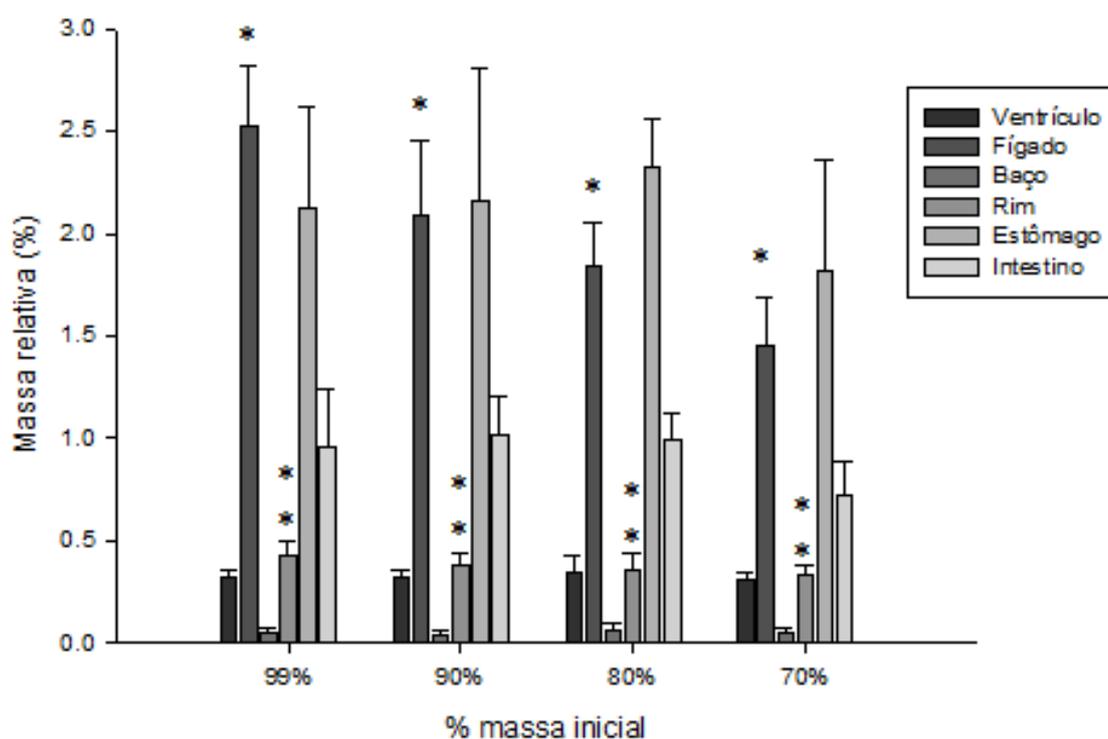


Figura 7. Massa percentual dos órgãos em diferentes níveis de desidratação (% da massa corpórea inicial) em *Rhinella schneideri*. Quatro diferentes tratamentos empregados: 99%, 90%, 80% e 70% da massa inicial. *,** Órgãos que apresentam diferenças significativa entre os tratamentos ($P<0,05$; ver detalhes das diferenças significativas nas figuras 8 e 9).

5. Discussão

Como já é bem estabelecido, o balanço hídrico é crucial para a manutenção da homeostase em anfíbios, envolvendo uma série de especializações fisiológicas, morfológicas e comportamentais (DUELMAN & TRUEB, 1996; WELLS, 2007). No caso de espécies terrestres, algumas são conhecidas por tolerar altos níveis de desidratação (THORSON, 1955; MCNAB, 2002). Ademais, em um contexto possivelmente até mais ecologicamente relevante, várias espécies de anuros terrestres engajam-se em atividades de rotina na natureza sob graus variados de desidratação (TRACY et al., 2014). Por outro lado, como as consequências associadas à desidratação têm o potencial para afetar os diversos fatores envolvidos na própria regulação do balanço hídrico, entender como esta dinâmica ocorre torna-se fundamental para avaliar os compromissos envolvidos no balanço de água dos anuros, especialmente face a eventuais eventos de desidratação. Nosso estudo identificou como alguns destes aspectos atuam no terrestre *Rhinella schneideri*.

Enquanto diferentes estudos têm demonstrando que a perda evaporativa de água (PEA) e, conseqüentemente, a resistência da pele à perda evaporativa de água (RP) estão ligadas a características do tegumento (TOLEDO & JARED, 1993; LILLYWHITE, 2006) e diferenças ecológicas (YOUNG et al., 2005), o efeito da desidratação sobre esses parâmetros do balanço hídrico dos anuros tem sido pouco investigado. Em relação à RP, nossos resultados mostraram que os valores da RP são maiores nos grupos mais desidratados, o que é ocasionado pela diminuição da PEA: relação já era esperada devido ao fato de a PEA ser inversamente proporcional a RP (deduzido a partir da fórmula de cálculo da perda de água, seção 3.4). Como PEA de *R. schneideri* foi altamente correlacionada às variações em Osm, podemos inferir que tal variação na PEA de *R. schneideri* em função do nível de desidratação pode ser explicada pelo aumento da concentração dos fluídos corpóreos. De fato, o aumento na concentração dos fluídos corpóreos proporciona um maior poder osmótico de retenção hídrica, auxiliando na diminuição da perda de água através da pele do animal (DEGANI et al., 1983; HOFFMAN, 2014). Este efeito parece ser especialmente decorrente do acúmulo de íons cloreto e sódio e ureia nos fluídos corpóreos durante a desidratação, espécies químicas com forte poder osmótico (SHOEMAKER, 1964; DEGANI et al., 1983; DEGANI et al., 1984; HOFFMAN, 2014). Condições semelhantes são encontradas em situações de privação de água em solos com baixo potencial hídrico e em ambientes aquáticos hiperosmóticos (e.g. condições salinas), nos quais o acúmulo de ureia impede o fluxo de água do animal para o

meio externo (DEGANI et al., 1984; KATZ; GABBAY, 1986; JORGENSEN, 1997; HOFFMAN, 2014).

A Re foi positivamente correlacionada com o nível de desidratação e também com a Osm, evidenciando que a absorção de água é mais alta quando o animal está mais desidratado e maior a concentração dos fluidos corpóreos. Este resultado, já documentado em outros anuros (BOUTILIER et al., 1992; WARBURG, 1972), reflete o fato de que a absorção de água através da pele é, todos os outros fatores fixados, ditada pelo diferencial osmótico entre os fluidos corpóreos e o meio externo, no caso a água. Além do mais, em um estado de desidratação, há o aumento do fluxo sanguíneo no tegumento em contato com a água em animais desidratados (VIBORG; HILLYARD, 2005; HILLYARD; WILLUMSEN, 2011), o que pode facilitar a captação e distribuição de água sendo absorvida. Finalmente, é preciso considerar que, pelo menos parcialmente, as alterações em Re associadas a desidratação podem também envolver uma alteração na permeabilidade do tegumento especialmente na área denominada mancha pélvica, a qual tem uma resposta muito expressiva à desidratação (MCCLANAHAN; BALDWIN, 1969). Essa resposta parece, ainda, ser mediada via hormonal, através do vasodilatador arginina vasotocina (AVT) (BOUTILIER et al., 1992; BENTLEY; MAIN, 1972), o qual aumenta a permeabilidade da pele (MCCLANAHAN; BALDWIN, 1969). De fato, Cree (1988) demonstrou que a água flui de três a quatro vezes mais rapidamente em tecidos isolados da região ventral de anuros quando tratados com AVT. Durante a desidratação, além da via hormonal (AVT, entre outros) (DESOUZA; GROSSO, 1982; UCHIYAMA et al., 1998; KONNO et al., 2005) a permeabilidade da pele da mancha pélvica também parece ser influenciada pela circulação (CHRISTENSEN, 1974), ambas as quais podendo alterar a distribuição das aquaporinas (canais de água) na mancha pélvica e bexiga urinária (SUZUKI et al., 2007). As aquaporinas são inseridas nas membranas apicais das células mais periféricas do tecido da mancha pélvica e, em conjunto à maior densidade e fluxo sanguíneo de capilares na região, a absorção de água se torna mais efetiva (HILLYARD; WILLUMSEN, 2011). Uma vez ultrapassada a pele, a água flui para os capilares cutâneos (WORD; HILLMAN, 2005), sustentada pela presença das aquaporinas (WILLUMSEN et al., 2003). Simultaneamente, o aumento da osmolalidade plasmática causado pela desidratação eleva a pressão oncótica dos fluidos corpóreos, o que promove a melhora do fluxo de água do ambiente para dentro dos capilares da mancha pélvica (CREE, 1988).

Durante a desidratação, a perda de água de alguns órgãos internos pode não ser proporcional à perda total de água do anfíbio (HILLMAN, 1980; CHURCHILL; STOREY, 1996). Neste sentido, uma perda de água por um órgão específico proporcionalmente menor do que a perda de água total do indivíduo pode ser interpretada como indicativa de que o volume celular deste órgão foi preservado até certo ponto, o que pode contribuir para a preservação funcional deste órgão (CHURCHILL; STOREY, 1996; HILLMAN, 2009). No caso de *R. schneideri*, a massa do ventrículo foi preservada e não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, é possível que isto seja especialmente importante em condições de desidratação quando há o aumento da viscosidade do sangue e do trabalho exigido para manter a circulação, especialmente sobre o ventrículo (HILLMAN, 1980; 1987). O que, muito provavelmente, também ocorreu em *R. schneideri* conforme indicado pelo aumento do hematócrito e da [Hb] em função do aumento do nível de desidratação. Outros órgãos em *R. schneideri* também tiveram sua massa preservada, como o estômago e intestino. Embora especulativo, a manutenção da massa desses órgãos pode ser decorrente da necessidade de extração de água de uma possível alimentação, mesmo em condições de desidratação, e pela extração de íons do conteúdo fecal (SHOEMAKER; NAGY, 1977).

Por outro lado, alguns órgãos, como rim e do fígado, tiveram suas massas relativas afetadas pela desidratação. No fígado de animais desidratados há o aumento de vias metabólicas para síntese de ureia e glicose (CHURCHILL; STOREY, 1994; CHURCHILL; STOREY, 1995), porém suspeitamos que a diminuição da massa deste órgão reflita uma perda, de fato, de volume de água. Talvez pela necessidade de manutenção de um fluxo sanguíneo mesmo durante e, talvez especialmente, durante a desidratação, o sangue com osmolaridade aumentada nessas condições, faça com que este órgão perca volume significativo de água. Nos rins, esta mesma explicação nos parece plausível, porém, quando privados de água, a filtração glomerular e a consequente produção de urina dos anfíbios parece ser interrompida (SHOEMAKER; NAGY, 1977). Desta forma, é possível que os efeitos da desidratação sobre a perda de água dos diferentes órgãos internos e suas causas seja mais complexa do que possamos elucidar no momento.

A desidratação exerce uma série de efeitos significativos sobre parâmetros fisiológicos ligados ao balanço hídrico do anuro terrestre *R. schneideri*. A perda de água por evaporação acarreta um aumento na concentração dos fluidos corpóreos e aumento da viscosidade do sangue, aspectos que geralmente interpretados como negativos e potencialmente causadores de compromissos funcionais. Porém, estas mesmas alterações

foram aqui identificadas como potencialmente positivas (ou, pelo menos convenientes) para o desempenho de alguns parâmetros envolvidos no próprio balanço hídrico. Quando desidratados, a maior concentração dos fluídos corpóreos diminuiu a perda evaporativa de água e aumentou as taxas de reabsorção de água livre, o que esteve associado ao aumento da osmolalidade plasmática e, possivelmente, às alterações na circulação e ação hormonal. Durante a desidratação, alguns órgãos mantiveram sua massa relativa enquanto outros diminuíram. Os fatores causais e implicações deste efeito da desidratação sobre a massa dos órgãos internos, porém, permanece bastante incerto e claramente merece investigações posteriores.

6. Referências

BENTLEY, P. J.; MAIN, A. R. Zonal differences in permeability of the skin of some anuran Amphibia. **Am J Physiol**, v. 223, n. 2, p. 361-363, 1972.

BENTLEY, P. J.; YORIO, T. Evaporative water loss in anuran amphibia: a comparative study. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 62, n. 4, p. 1005-1009, 1979.

BOUTILIER, R.G.; STIFFLER, D. F.; TOEWS, D. P. Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians. **Environmental Physiology of the Amphibians**. The University of Chicago Press, Chicago. Pg. 81-124. 1992.

BURGGREN, W. W.; VITALIS, T. Z. The interplay of cutaneous water loss, gas exchange and blood flow in the toad, *Bufo woodhousei*: adaptations in a terrestrially adapted amphibian. **Journal of experimental biology**, v. 208, n. 1, p. 105-112, 2005.

CHRISTENSEN, C. U. Adaptations in the water economy of some anuran amphibia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 47, n. 3, p. 1035-1049, 1974.

CHRISTIAN, K.; PARRY, D. Reduced rates of water loss and chemical properties of skin secretions of the frogs *Litoria caerulea* and *Cyclorana australis*. **Australian Journal of Zoology**, v. 45, n. 1, p. 13-20, 1997.

CHURCHILL, T. A.; STOREY, K. B. Dehydration tolerance in wood frogs: a new perspective on development of amphibian freeze tolerance. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. R1324-R1324, 1993.

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

CHURCHILL, T. A.; STOREY, K. B. Metabolic effects of dehydration on an aquatic frog, *Rana pipiens*. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, n. 1, p. 147-154, 1995.

CHURCHILL, T. A.; STOREY, K. B. Organ metabolism and cryoprotectant synthesis during freezing in spring peepers *Pseudacris crucifer*. **Copeia**, p. 517-525, 1996.

CLAUSSEN, D. L. Studies on water loss and rehydration in anurans. **Physiological zoology**, p. 1-14, 1969.

CREE, A. Water balance responses of the hylid frog *Litoria aurea*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 247, n. 2, p. 119-125, 1988.

DEGANI, G.; GOLDENBERG, S.; WARBURG, M. R. changes in ion, urea concentrations and blood plasma osmolarity of *Pelobates syriacus* juveniles under varying conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 75, n. 4, p. 619-623, 1983.

DEGANI, G.; SILANIKOVE, N.; SHKOLNIK, A. Adaptation of green toad (*Bufo viridis*) to terrestrial life by urea accumulation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 77, n. 3, p. 585-587, 1984.

DE SOUSA, R. C.; GROSSO, Alda. Osmotic water flow across the abdominal skin of the toad *Bufo marinus*: effect of vasopressin and isoprenaline. **The Journal of physiology**, v. 329, n. 1, p. 281-296, 1982.

DUELLMAN W. E. & TRUEB, L. Biology of amphibians. John Hopkins University Press, 1994.

GROVER, M. C. Determinants of salamander distributions along moisture gradients. **Copeia**, v. 2000, n. 1, p. 156-168, 2000.

HADDAD, C. F. B. Comunicação em anuros (Amphibia). **Anais de Etologia**, v. 13, p. 116-132, 1995.

HILLMAN, S. S. Some effects of dehydration on internal distributions of water and solutes in *Xenopus laevis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 61, n. 2, p. 303-307, 1978.

HILLMAN, S. S. Physiological correlates of differential dehydration tolerance in anuran amphibians. **Copeia**, p. 125-129, 1980.

HILLMAN, Stanley S. Dehydrational effects on cardiovascular and metabolic capacity in two amphibians. **Physiological zoology**, p. 608-613, 1987.

HILLMAN, S. S.; WITHERS, P. C.; DREWES, R. C.; HILLYARD, S. D. Ecological and Environmental Physiology of Amphibians. Oxford University Press. 2009.

HILLYARD, S. D.; HOFF, K.; PROPPER, C. The water absorption response: a behavioral assay for physiological processes in terrestrial amphibians. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 71, n. 2, p. 127-138, 1998.

HILLYARD, S. D.; WILLUMSEN, Niels J. Chemosensory function of amphibian skin: integrating epithelial transport, capillary blood flow and behaviour. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 3, p. 533-548, 2011.

HOFFMAN, J.; KATZ, U. Salt and Water Balance in the Toad *Bufo viridis* During Recovery From Two Different Osmotically Stressful Conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1997.

HOFFMAN, J.; KATZ, U. Elevated plasma osmotic concentration stimulates water absorption response in a toad. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, n. 2, p. 168-173, 1999.

HOFFMAN, J. Physiological response of *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) populations across an aridity gradient. **Alytes**, v. 30, n. 1-4, p. 33-41, 2014.

JØRGENSEN, C. B. 200 years of amphibian water economy: from Robert Townson to the present. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, n. 02, p. 153-237, 1997.

KATZ, U. Strategies of adaptation to osmotic stress in anuran amphibia under salt and burrowing conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 93, n. 3, p. 499-503, 1989.

KONNO, N.; HYODO, S.; TAKEI, Y.; MATSUDA, K.; UCHIYAMA, M. Plasma aldosterone, angiotensin II, and arginine vasotocin concentrations in the toad, *Bufo marinus*, following osmotic treatments. **General and comparative endocrinology**, v. 140, n. 2, p. 86-93, 2005.

LAJMANOVICH, R. C. Hábitos alimentarios de *Bufo paracnemis* (Amphibia, bufonidae) en el Parami medio, Argentina. *Revista de Hydrobiologia Tropical*, v. 27, n. 2, p. 107-112, 1994.

LEE, A. K.; MERCER, E. H. Cocoon surrounding desert-dwelling frogs. **Science**, v. 157, n. 3784, p. 87-88, 1967.

LEE, A. R., Silove, M., Katz, U., Balinsky, J. B.. Urea cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in *Xenopus laevis* and *Bufo viridis* adapted to high salinity. **Journal of Experimental Zoology**, v. 221, n. 2, p. 169-172, 1982.

LILLYWHITE, H. B. Review: Water relations of tetrapod integument. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 2, p. 202-226, 2006.

LILLYWHITE, H. B.; MITTAL, A. K., GARG, T. K.; AGRAWAL, N. Integumentary structure and its relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. **Journal of Zoology**, v. 243, n. 4, p. 675-687, 1997.

MCCLANAHAN, L. L. Adaptations of the spadefoot toad, *Scaphiopus couchi*, to desert environments. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v.20, p. 73-99, 1997.

MCCLANAHAN JR, L.; BALDWIN, R. Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 28, n. 1, p. 381-389, 1969.

MCNAB, B. K. **The physiological ecology of vertebrates: a view from energetics**. Cornell University Press, 2002.

NAVAS, C. A.; ANTONIAZZI, M. M.; CARVALHO, J. E.; SUZUKI, H.; JARED, C. . Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosus* in the Caatinga,

a Brazilian semi-arid environment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 3, p. 647-657, 2007.

NAVAS, C. A.; OTANI, L. Physiology, environmental change, and anuran conservation. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 6, n. 2, p. 83-103, 2007.

NORMAN, D. R. Anfibios y reptiles del Chaco paraguayo, Tomo 1; Amphibians and Reptiles of the Paraguayan Chaco. **Private printing, San José, Costa Rica**, 1994.

PRAMUK, J. B. Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 146, n. 3, p. 407-452, 2006.

SCHWARZKOPF, L.; ALFORD, R. A. Desiccation and shelter-site use in a tropical amphibian: comparing toads with physical models. **Functional Ecology**, p. 193-200, 1996.

SCOTT JR, N. J. The abundance and diversity of the herpetofaunas of tropical forest litter. **Biotropica**, p. 41-58, 1976.

SEEBACHER, F.; ALFORD, R. A. Shelter microhabitats determine body temperature and dehydration rates of a terrestrial amphibian (*Bufo marinus*). **Journal of Herpetology**, v. 36, n. 1, p. 69-75, 2002.

SEYMOUR, R. S. Gas exchange in spadefoot toads beneath the ground. **Copeia**, p. 452-460, 1973.

SHOEMAKER, V. H. The effects of dehydration on electrolyte concentrations in a toad, *Bufo marinus*. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 13, n. 3, p. 261-271, 1964.

SHOEMAKER, V. H.; BALDING, D.; RUIBAL, R.; MCCLANAHAN, L. L. Uricotelism and low evaporative water loss in a South American frog. **Science**, v. 175, n. 4025, p. 1018-1020, 1972.

SHOEMAKER, V. H.; HILLMAN, S. S.; HILLYARD, S. D.; JACKSON, D. C.; MCCLANAHAN JR, L. L.; WHITERS, P. C.; WYGODA, M. L. Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. **Environmental physiology of the amphibians**, p. 125-150, 1992.

SPOTILA, J. R.; BERMAN, E. N. Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 55, n. 4, p. 407-411, 1976.

SUZUKI, M.; HASEGAWA, T.; OGUSHI, Y.; TANAKA, S. Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 1, p. 72-81, 2007.

THORSON, T.; SVIHLA, A. Correlation of the habitats of amphibians with their ability to survive the loss of body water. **Ecology**, v. 24, n. 3, p. 374-381, 1943.

THORSON, T. B. The relationship of water economy to terrestriality in amphibians. **Ecology**, p. 100-116, 1955.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 105, n. 4, p. 593-608, 1993.

UCHIYAMA, M.; TAKEUCHI, T.; MATSUDA, K. Effects of homologous natriuretic peptides in isolated skin of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 120, n. 1, p. 37-42, 1998.

VIBORG, A. L.; HILLYARD, S. D. Cutaneous blood flow and water absorption by dehydrated toads. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 78, n. 3, p. 394-404, 2005.

WARBURG, M. R. Water economy and thermal balance of Israeli and Australian amphibians from xeric habitats. In: **Symposia of the Zoological Society of London**. 1972. p. 79-111.

WELLS, K. D. **The ecology and behavior of amphibians**. University of Chicago Press, 2010.

WILLUMSEN, N. J.; AMSTRUP, J.; NEJSUM, L. M.; LARSEN, E. H.; NIELSEN, S.; HILLYARD, S. D. Differential localization of aquaporins 1-3 in amphibian skin. In: **FASEB JOURNAL**. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL, 2003. p. A919-A919.

WILLUMSEN, N. J.; VIBORG, A. L.; HILLYARD, S. D. Vascular aspects of water uptake mechanisms in the toad skin: perfusion, diffusion, confusion. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 148, n. 1, p. 55-63, 2007.

WITHERS, P. C.; HILLMAN, S. S.; DREWES, R. C.; SOKOL, O. M. Water loss and nitrogen excretion in sharp-nosed reed frogs (*Hyperolius nasutus*: Anura, Hyperoliidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 97, n. 1, p. 335-343, 1982.

WORD, J. M.; HILLMAN, S. S. Osmotically absorbed water preferentially enters the cutaneous capillaries of the pelvic patch in the toad *Bufo marinus*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 78, n. 1, p. 40-47, 2005.

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

WYGODA, M. Adaptive control of water loss resistance in an arboreal frog. **Herpetologica**, p. 251-257, 1988.

YOUNG, J. E.; CHRISTIAN, K. A.; DONNELLAN, S.; TRACY, C. R.; PARRY, D. Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 78, n. 5, p. 847-856, 2005.

ZAR, J. **Biostatistical analysis**. Pearson Education India, 1999.