

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**BALANÇO HÍDRICO E DESEMPENHO  
LOCOMOTOR EM ESPÉCIES DE ANUROS DE  
MATA ATLÂNTICA E CERRADO.**

**BRAZ TITON JUNIOR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP - para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Zoologia).

**BOTUCATU - SP**

**2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**BALANÇO HÍDRICO E DESEMPENHO  
LOCOMOTOR EM ESPÉCIES DE ANUROS DE  
MATA ATLÂNTICA E CERRADO.**

**BRAZ TITON JUNIOR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP - para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Zoologia).

**ORIENTADOR: PROF. ASS. DR. FERNANDO RIBEIRO GOMES**

**BOTUCATU - SP**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

**Titon Junior, Braz.**

**Balanço hídrico e desempenho locomotor em espécies de anuros de  
Mata Atlântica e Cerrado / Braz Titon Junior. – Botucatu, 2010**

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Fernando Ribeiro Gomes

Assunto CAPES: 20400004

1. Mata Atlântica. 2. Cerrados. 3. Anuro. 4. Balanço hidrológico.

Palavras-chave: Anuros; Balanço hídrico; Cerrado; Desempenho  
locomotor; Mata Atlântica.



## *Dedicatória*

---

*À Deus*

*Que sempre perdoou cada momento que duvidei de  
Sua força e me deu a determinação e a perseverança  
necessária para prosseguir com meus trabalhos e  
meus ideais de maneira cada vez melhor.*

*À minha família*

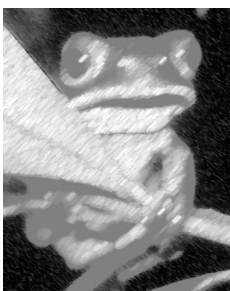
*Aos meus pais Braz Titon e Maria Ap. Galli Titon que me deram  
todas as condições, apoio, ensinamentos morais, confiança e  
principalmente amor para que eu pudesse conduzir minha vida da  
melhor maneira possível e realizar feitos como este.*

*Aos meus tios, tias, primos e primas, os quais tiveram, cada qual à  
sua maneira, uma participação importante na realização de mais  
uma etapa importante da minha vida.*

*Especialmente à minha avó Maria de Lourdes Galo, que se tornou  
meu mais recente anjo da guarda junto aos outros entes queridos que  
velam por mim de um lugar melhor.*

*À Gisele Ap. Dionísio Lopes*

*Uma estrela guia em minha vida apontando sempre as  
direções corretas através de todos os meus medos e  
inseguranças trazendo à tona sempre o melhor de mim.*

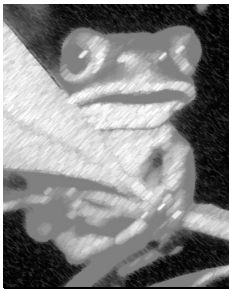


## *Agradecimentos Especiais*

---

*Ao Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes*

*Uma pessoa a quem só não posso considerar como um pai por uma pura questão etária. É como um irmão mais velho que me guiou em todas as etapas da minha vida científica, agregando à minha formação além do conhecimento acadêmico, todo o conhecimento necessário para enfrentar a vida sendo uma pessoa feliz com tudo aquilo que faz, sempre de uma maneira ética. Obrigado por ser um exemplo para mim.*



## *Agradecimentos*

---



### *Aos amigos do laboratório*

*Agradeço muito a essas pessoas maravilhosas que convivem comigo no dia a dia, tornando-o sempre melhor. Pessoas sempre prontas para o trabalho e para a descontração com um sorriso estampado no rosto. Muito obrigado Eduardo (Popetar), Vânia (Foguin), Tatiana (Origami), Raquel (Babuska), Carla (Skol), Jully, Adriana (Alguém) e Verônica.*

### *Aos funcionários do departamento*

*Agradeço a essas pessoas fundamentais para o andamento de qualquer trabalho e que também são responsáveis por mais esta etapa da minha vida. Muito obrigado Antônio Carlos de Barros Tardivo, Hélio Kushima (Pompom), Junior Vidotti (Juninho), Janete Camargo Teixeira e Luciana Ap. Spadotto Borgatto (Lú).*

### *Aos amigos mais antigos*

*Obviamente, jamais poderia deixar de ressaltar a importância daqueles que fizeram e continuam fazendo parte da minha vida e são tão responsáveis por tudo que sou e que tenho quanto minha família. Não vou citar nomes para não cometer a injustiça de esquecer-me de alguém, mas sei que todos vão saber que estão em um lugar especial das minhas mais doces lembranças. Agradeço a todos meus amigos de infância, da época do colégio e da graduação, sem eles jamais seria o que sou hoje.*

*Este trabalho contou com o apoio das seguintes instituições:*

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP:*

*Bolsa de Mestrado (2008/01917-7)*

*Projeto Jovem Pesquisador (06/54699-1)*

*Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu.*

*Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu.*

## Sumário:

Resumo .....	L
Abstract .....	M

### I. Introdução

A pele dos anfíbios e o balanço hídrico .....	02
Tolerância à desidratação .....	03
Perda de água por evaporação .....	05
Reidratação .....	06
Biomassas do Estado de São Paulo, distribuição e balanço hídrico de anuros .....	09
Objetivos .....	12

### II. Metodologia

Sítios de estudo e espécies incluídas .....	14
Manutenção dos anuros em laboratório .....	14
Desempenho locomotor e sensibilidade à desidratação .....	15
Resistência e taxa de perda de água por evaporação .....	16
Taxas de reidratação a partir de água livre .....	19
Análise dos resultados .....	19

**III. Resultados**

<b>Diferenças interespecíficas .....</b>	<b>23</b>
<b>Sinal filogenético .....</b>	<b>25</b>
<b>Relações entre as variáveis estudadas .....</b>	<b>25</b>
<b>Efeito das diferenças em hábito e hábitat .....</b>	<b>25</b>

**IV. Discussão**

<b>Sinal filogenético .....</b>	<b>27</b>
<b>Relações entre as variáveis estudadas .....</b>	<b>27</b>
<b>Balanco hídrico e as relações com hábito e hábitat .....</b>	<b>30</b>
<b>Conclusões Gerais .....</b>	<b>35</b>

**V. Referências Bibliográficas .....** 37**VI. Figuras e Tabelas .....** 48**VII. Anexos**

<b>Anexo 1 .....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>56</b>

## Lista de figuras:

**Figura 1:** Topologia obtida a partir de hipóteses disponíveis na literatura (Faivovich 2002; Faivovich *et al.* 2005; Frost *et al.* 2006) e utilizada para o cálculo do sinal filogenético, contrastes independentes e simulações da evolução das variáveis estudadas por movimento Browniano. Os braços da filogenia foram arbitrariamente estabelecidos com comprimento constante.

**Figura 2:** Média  $\pm$  desvio padrão das resistências à perda de água por evaporação para Dm: *Dendropsophus microps*, Ha: *Hypsiboas albopunctatus*, Hb: *Hypsiboas bischoffi*, Hf: *Hypsiboas faber*, Hp: *Hypsiboas polytaenius*, Ln: *Leptodactylus notoaktites*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Pd: *Phyllomedusa distincta*, Pt: *Phyllomedusa tetraploidea*, Po: *Physalaemus olfersii*, Ps: *Physalaemus spiniger*, Pb: *Proceratophrys boiei*, Ri: *Rhinella icterica*, Ro: *Rhinella ornata*, Sc: *Scinax crospedospilus*, Sh: *Scinax hayii*, Sr: *Scinax rizibilis*.

**Figura 3:** Média  $\pm$  desvio padrão das taxas de perda de água por evaporação para Dm: *Dendropsophus microps*, Ha: *Hypsiboas albopunctatus*, Hb: *Hypsiboas bischoffi*, Hf: *Hypsiboas faber*, Hp: *Hypsiboas polytaenius*, Ln: *Leptodactylus notoaktites*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Pd: *Phyllomedusa distincta*, Pt: *Phyllomedusa tetraploidea*, Po: *Physalaemus olfersii*, Ps: *Physalaemus spiniger*, Pb: *Proceratophrys boiei*, Ri: *Rhinella icterica*, Ro: *Rhinella ornata*, Sc: *Scinax crospedospilus*, Sh: *Scinax hayii*, Sr: *Scinax rizibilis*.

**Figura 4:** Média  $\pm$  desvio padrão das taxas de reidratação a partir de água livre para Dm: *Dendropsophus microps*, Dmn: *Dendropsophus minutus*, Ha: *Hypsiboas albopunctatus*, Hb: *Hypsiboas bischoffi*, Hf: *Hypsiboas faber*, Hp: *Hypsiboas polytaenius*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Pt: *Phyllomedusa tetraploidea*, Po: *Physalaemus olfersii*, Pb: *Proceratophrys boiei*, Ri: *Rhinella icterica*, Ro: *Rhinella ornata*, Sh: *Scinax hayii*.

**Figura 5:** Média  $\pm$  desvio padrão da sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, definido como nível de hidratação cujo desempenho locomotor atinge 70% do máximo, para Dm: *Dendropsophus microps*, Dmn: *Dendropsophus minutus*, Ha: *Hypsiboas albopunctatus*, Hb: *Hypsiboas bischoffi*, Hf: *Hypsiboas faber*, Hp: *Hypsiboas polytaenius*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Pt: *Phyllomedusa tetraploidea*, Po: *Physalaemus olfersii*, Pb: *Proceratophrys boiei*, Ri: *Rhinella icterica*, Ro: *Rhinella ornata*, Sh: *Scinax hayii*.

## Lista de tabelas:

**Tabela 1:** Estatística descritiva trazendo média  $\pm$  desvio padrão da massa corpórea, resistência à perda de água por evaporação, taxa de perda de água por evaporação, taxa de reidratação a partir de água livre e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação para cada espécie, bem como as famílias às quais pertencem.

**Tabela 2:** Probabilidade de presença de sinal filogenético e resultado da estatística  $K$  para as variáveis estudadas.

**Tabela 3:** Fatores retidos na análise de componentes principais das características associadas ao balanço hídrico de espécies de anuros do Estado de São Paulo.

**Tabela 4:** Valores de  $F$  obtidos da ANOVA e percentil 95.º dos valores de  $F$  de mil simulações de evolução Browniana ao longo da filogenia das variáveis: massa corpórea, resistência à perda de água por evaporação e taxa de perda de água por evaporação para três categorias de hábito (arborícola, terrícola e criptozóico) e duas categorias de habitat (Mata Atlântica e Cerrado).

**Tabela 5:** Resultados da ANOVA das variáveis: taxa de reidratação a partir de água livre e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação para três categorias de hábito (arborícola, terrícola e criptozóico) e duas categorias de habitat (Mata Atlântica e Cerrado).

**Tabela 6:** Habitat, hábito e resistência à perda de água por evaporação de espécies consideradas à prova de água e espécies com resistência moderada.

**Resumo:** Como anfíbios em geral perdem água por evaporação a taxas equivalentes à de uma superfície de água livre, a disponibilidade de água no ambiente é de fundamental importância para determinar os limites da distribuição das espécies deste grupo, bem como a evolução de caracteres fisiológicos associados ao balanço hídrico. No Estado de São Paulo, a comparação entre espécies de anuros características da Floresta Atlântica e do Cerrado representa um interessante sistema para o estudo das relações entre o balanço hídrico e a distribuição geográfica de anuros, já que estes dois biomas diferem em aspectos fundamentais para a biologia deste grupo, tais como regime de chuvas e cobertura vegetal. O objetivo deste projeto foi investigar a evolução da sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação (SDLD), taxas de perda de água por evaporação (TPAE), resistência à perda de água por evaporação (RPAE) e taxas de reidratação a partir de água livre (TRAL) ao longo da filogenia de anuros do Estado de São Paulo, bem como investigar as relações evolutivas entre estas variáveis e suas possíveis associações com a distribuição geográfica das espécies, através de uma abordagem comparativa entre anuros de Mata Atlântica e Cerrado. Foi encontrada presença de sinal filogenético para RPAE, TPAE e a massa corpórea, havendo para estas, provavelmente, uma grande influência da evolução por deriva genética ao longo da filogenia. As relações entre todas as variáveis corrigidas para a filogenia podem ser resumidas por dois componentes principais. O primeiro componente explica 49,77% da variância entre as espécies e mostra uma relação positiva entre as TPAE e a SDLD e ambas se relacionando negativamente com a RPAE. Uma vez que a variação na resistência da pele à perda de água por evaporação é determinante da taxa de perda de água por evaporação, TPAE e RPAE devem formar uma unidade evolutiva. Já na segunda relação apontada dentro desse componente, uma hipótese plausível seja a de seleção correlacionada, de forma que as características (RPAE-TPAE e SDLD) venham respondendo paralelamente às pressões seletivas. O segundo componente explica 33,21% da variância entre as espécies e mostra uma relação positiva entre a massa corpórea e a TRAL, porém, essa relação parece ser explicada pela alometria entre a massa corpórea e o tamanho da mancha pélvica, considerando-se uma variação proporcional entre esta e a área de superfície total para as diferentes espécies. Embora existam indícios da importância da atuação de pressões seletivas sobre as características estudadas, a amostragem de espécies e/ou localidades provavelmente não foi suficiente para identificar estas pressões. Assim, as relações entre as variáveis associadas ao balanço hídrico e o ambiente poderiam se tornar mais claras com a inclusão de espécies chave que combinassem características como diversidade de hábitos dentro de um mesmo grupo e distribuição geográfica em regiões com um déficit hídrico relativamente mais intenso do que os abordados no presente trabalho.

**Abstract:** Amphibians are generally characterized by rates of evaporative water loss equivalent to those observed for a free water surface. In this way, water availability in the environment should be fundamental to determine the limits of geographical distribution and the evolution of physiological characters associated with anuran water balance. The comparison of anuran species from the Atlantic Forest and the Cerrado in the State of São Paulo consists an interesting system to study the relationship between water balance and geographic distribution, since these two biomes differ in fundamental aspects for amphibian life history, such as rainfall and vegetation cover. The objective of this project was to investigate (1) the evolution of the sensitivity of locomotor performance to dehydration (SDLD), rates of evaporative water loss (TPAE), resistance to evaporative water loss (RPAE) and rates of rehydration from free water (TRAL) along the phylogeny of anurans from the State of São Paulo, (2) the evolutionary relationships between these variables, and (3) their possible associations with the geographic distribution of the species, through a comparative approach of species found in the Atlantic Forest and the Cerrado. We found significant phylogenetic signal for RPAE, TPAE, and body mass, probably with a large influence of genetic drift along the phylogeny in the evolution of these characters. The relationships between all variables corrected for phylogeny can be summarized by two main components. The first component explained 49.77% of the variance, and showed a positive relationship between TPAE and SDLD, and both were negatively related to RPAE. Since the variation in the rate of evaporative water loss is determined by skin resistance to evaporative water loss, TPAE and RPAE should comprise an evolutionary unit. A plausible hypothesis for the negative relationship between TPAE and SDLD is of correlated selection, with both characters responding to the same selective pressures. The second component explained 33.21% of the variance, and showed a positive relationship between body mass and TRAL, possibly explained by the allometric relationship between body mass and the area of pelvic patch, assuming that the proportion between the area of pelvic patch and the total surface area is maintained for different species. Although the results indicated the importance of natural selection acting on the studied traits, sampling of species and/or localities probably were insufficient to identify these selective pressures. In this way, the relationship between the variables associated with water balance and the environment could become clearer with the inclusion of key species that combine features such as diversity of habits in the same group, and geographical distribution encompassing regions with a relatively more intense drought than those covered by the present study.





## *I - Introdução*

---

### **A pele dos anfíbios e o balanço hídrico**

Um dos grandes compromissos funcionais com o surgimento da organização multicelular e a evolução de organismos cada vez maiores e mais complexos, foi assegurar a proteção contra os riscos mecânicos, químicos e radioativos, simultaneamente mantendo a capacidade de interagir e trocar materiais com o ambiente. Assim, o tegumento evoluiu como um sistema heterogêneo, pluriestratificado e multimembrânico, fornecendo proteção física e, ao mesmo tempo, regulando o intercâmbio de energia e materiais entre o organismo e seu entorno (Chuong *et al.*, 2002).

A manutenção do volume e concentração osmótica dos fluidos corpóreos relativamente constantes é fundamental para a homeostase. Desde a ocupação do ambiente terrestre pelos vertebrados, a excreção e a evaporação tornaram-se as principais rotas de perda de água. Duas novidades evolutivas permitiram aos tetrápodes uma grande economia de água a partir da excreção, sendo de fundamental importância na ocupação do ambiente terrestre: a mudança da amônia para uréia e ácido úrico como produtos de excreção de nitrogênio e uma capacidade de reduzir drasticamente as taxas de filtração glomerular. Esta última é particularmente desenvolvida nos tetrápodes não-endotermos, que não apresentam capacidade de produzir urina osmoticamente mais concentrada que o plasma (McNab 2002). Outro aspecto importante da evolução dos vertebrados foi a orquestração de caracteres que tornaram a pele cada vez menos permeável à água conforme as formas invadiam e se adaptavam aos mais difíceis e secos ambientes terrestres. A compreensão das relações hídricas da pele dos vertebrados tem tido avanços com base em conhecimentos empíricos e perspectivas de diversas fontes. Estas incluem estudos descritivos da morfologia, estudos fisiológicos e físico-químicos de mecanismos específicos de transporte e, em geral, estudos comparativos relacionados a medidas quantitativas do fluxo de água em toda a pele de animais adaptados a ambientes específicos. Segundo Lillywhite (2006), a compreensão holística de adaptação de vertebrados a ambientes terrestres exige a integração dos caracteres que determinam as relações hídricas do tegumento *per se*, com o balanço hídrico para todo o organismo.

Dentre os tetrápodes, os anfíbios enfrentam um desafio hídrico particularmente pungente em ambiente terrestre, dada à necessidade de manutenção de uma alta permeabilidade de seu tegumento, que representa um importante órgão de troca de gases respiratórios neste grupo. A alta permeabilidade tegumentar característica da maior parte das espécies de anfíbios acarreta em taxas de perda de água também particularmente elevadas destes, quando comparados a outros tetrápodes, e expõe estes animais a um alto risco de desidratação em ambiente terrestre (McNab 2002).

### **Tolerância à desidratação**

Por limitar potencialmente a manutenção das atividades normais, o alto risco de desidratação em ambiente terrestre moldou diversos aspectos da história de vida dos anfíbios, como por exemplo, a evolução de hábitos noturnos (Haddad 1995, mas veja também Navas *et al.* 2007). Porém, a resposta fisiológica mais comum de anfíbios às altas taxas de desidratação em ambiente terrestre é a tolerância à dessecação.

A habilidade de tolerar a perda de água é variável entre os anfíbios, sendo algumas espécies capazes de tolerar uma perda de água de até 50% de sua massa corpórea total, representando 60% do total de água que apresenta (McNab2002). Essa capacidade de tolerar a perda de água encontra-se associada a alguns fatores, como por exemplo, o hábito das diferentes espécies: espécies terrestres e fossoriais apresentam uma maior tolerância à desidratação que espécies aquáticas (Thorson & Svihla 1943). Além disso, o tamanho dos animais também influencia essa tolerância, sendo que espécies menores toleram uma perda de água proporcionalmente maior que as espécies maiores. Porém, apesar da maior tolerância, eles perdem água mais rapidamente que espécies maiores e, portanto chegam mais rapidamente em um nível letal (Geise & Linsenmair 1988).

Alguns autores têm proposto uma associação positiva entre massa cardíaca e níveis de tolerância à desidratação (Withers & Hillman 2001). Essa correlação seria explicada pelo fato de que, dentre as diferentes espécies de anuros, variações no débito cardíaco devem-se não a diferenças em frequência cardíaca máxima, mas principalmente em diferenças em volume sistólico, estimado através da massa ventricular. A combinação de hiperosmolaridade, hipovolemia e hiperviscosidade do sangue associada ao estresse hídrico causa aumento da resistência vascular periférica e concomitante diminuição da função cardíaca, podendo resultar na morte por incapacidade de sustentar o metabolismo basal (Hillman 1987). Já que a capacidade aeróbia de anuros parece estar limitada pelo débito cardíaco (Withers & Hillman 1988), esta correlação também sugere que espécies que apresentam maior taxa de exercício vocal e/ou locomotor aerobiamente sustentado e, conseqüentemente, uma maior capacidade aeróbia (Pough *et al.* 1992), apresentariam uma maior vantagem na exploração de ambientes caracterizados por maior desafio hídrico em comparação a espécies aerobiamente menos ativas (Hillman *et al.* 2000).

A desidratação afeta tanto o desempenho locomotor de alta intensidade e curta duração quanto de resistência em anfíbios (Moore & Gatten 1989). Dado que a locomoção é um aspecto fundamental de diversos comportamentos de claro valor adaptativo, tais como captura de alimentos, fuga de predadores, dispersão pós-metamórfica e busca de parceiros

reprodutivos, a tolerância à desidratação estimada através do seu efeito sobre a habilidade locomotora apresenta uma forte correlação ecológica para estes animais. Embora um controle filogenético não tenha sido aplicado até então, o impacto da perda de água sobre o desempenho locomotor parece variar entre diferentes grupos filogenéticos, como demonstram os estudos de Gatten (1987) e Hillman (1987), onde as taxas de consumo de oxigênio durante a locomoção parecem cair mais drasticamente em espécies de *Rana* que em espécies de *Bufo* com a desidratação.

A influência da variação conjunta de diferentes temperaturas e níveis de hidratação sobre o desempenho locomotor, por exemplo, tem sido investigada em estudos intra-específicos com anuros. Prest & Pough (1989) mostraram que a desidratação e temperatura corpórea têm efeito sinérgico sobre o desempenho locomotor em *Bufo americanus*. Enquanto o desempenho de animais completamente hidratados ou ligeiramente desidratados aumentou proporcionalmente ao aumento da temperatura, o desempenho máximo de animais desidratados mudou em direção à temperaturas mais baixas (Prest & Pough, 1989). Surpreendentemente, essa abordagem multivariada, utilizando temperatura e nível de hidratação como fatores simultaneamente, foi aplicada em poucos trabalhos para testar hipóteses de adaptação do desempenho locomotor, comparando espécies e/ou populações de anuros. Beuchat e colaboradores (1984) demonstraram que dentre três espécies de *Eleutherodactylus* da Costa Rica, *E. antillensis*, encontrada em terras mais baixas, quentes e muitas vezes secas, apresenta uma menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação com o aumento da temperatura. Por outro lado, as duas espécies que habitam florestas de maiores altitudes (*E. coqui* e *E. portoricensis*), apresentaram sensibilidade à desidratação equivalente a diferentes temperaturas. Já Rogowitz e colaboradores (1999) compararam duas espécies de *Eleutherodactylus* de Porto Rico, sendo *E. coqui* uma espécie que apresenta uma ampla ocupação de habitats, enquanto *E. cooki*, uma ocupação restrita à cavernas úmidas. Este estudo mostrou que apesar destas espécies não diferirem quanto à resistência à perda de água por evaporação, *E. coqui* se mostrou mais apto a saltar sob condições de desidratação quando comparado com *E. cooki*. Por fim, um estudo realizado com bufonídeos, demonstrou que *Rhinella schneideri*, cuja distribuição esta associada à áreas abertas e com maiores temperaturas, apresenta uma menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação à temperaturas mais altas, quando comparada a *R. icterica* e *R. ornata*, cuja distribuição encontra-se mais associada à ambientes florestados e com temperaturas mais amenas (Titon *et al.*).

## Perda de água por evaporação

A taxa de perda de água por evaporação na maioria dos anfíbios é equivalente àquela apresentada por uma superfície de água livre, sendo essas espécies consideradas como anfíbios “típicos” (Wygoda 1984). Entretanto, algumas poucas espécies apresentam níveis de resistência à perda evaporativa de água comparáveis aos de répteis adaptados a desertos, e são considerados atípicos ou “a prova de água” (Christian & Parry 1997; Lillywhite *et al.* 1997).

Embora alguns estudos tenham mostrado a importância das relações entre a espessura da pele em anuros e o ambiente (ver Toledo & Jared 1993 para referências), a espessura da pele por si só não é o principal mecanismo para reduzir a perda evaporativa de água (Lillywhite 2006). Além disso, a camada de queratina na pele dos anuros é muito pequena, e um tegumento altamente queratinizado não parece ter sido selecionado ao longo da evolução dos anfíbios (Lillywhite 2006). Em alguns casos, uma co-ossificação de determinadas regiões do corpo confere grande aumento da resistência a perda de água para essas regiões (Seibert *et al.* 1974; Ruibal and Shoemaker 1984; Navas *et al.* 2002; Jared *et al.* 2005). A secreção de fluidos pode ser muito importante para as relações hídricas principalmente em anfíbios que apresentam uma pele caracterizada como glandular, produzindo três principais categorias de secreções: toxinas, muco e lipídeos (Lillywhite 2006). Destas secreções, o muco e os lipídeos vêm sendo funcionalmente associadas ao balanço hídrico. Alguns estudos conjecturaram uma possível função da secreção mucosa na redução da perda de água por evaporação, seja selando os espaços extracelulares do *stratum corneum* (Toledo & Jared 1993), seja selando pequenas fendas entre o corpo e os membros de alguns anuros (Geise & Linsenmair 1986; Kobelt & Linsenmair 1986), porém a composição desta secreção mucosa não foi determinada, de forma que seu conteúdo de lipídeos permanece não conhecido (Lillywhite 2006). Em algumas espécies de anfíbios, assim como nos demais tetrápodes, os lipídeos secretados parecem ser o principal fator controlador do movimento transepitelial de água. Essa substância produzida por glândulas da pele é geralmente espalhada através da superfície do corpo por movimentos estereotipados, é geralmente associado à busca de um local onde o animal permanece praticamente imóvel por longo período do dia, em uma situação semelhante a um torpor (Lillywhite 2006).

A resistência à perda evaporativa de água em anuros apresenta grande variação interespecífica e encontra-se associada aos hábitos dos animais, sendo que anuros com hábitos arbóreos, em geral, apresentam uma maior resistência à perda de água quando comparados a espécies terrestres e aquáticas (Whithers *et al.* 1984; Wygoda 1984). Em um estudo comparativo com 25 espécies de anuros australianos, Young e colaboradores (2005)

demonstraram uma clara influência do hábitat na evolução da resistência à perda evaporativa de água, que permanece significativa mesmo após correção das análises para as relações filogenéticas das espécies incluídas. Tal resultado sugere que o aumento da resistência surgiu múltiplas vezes ao longo da história evolutiva deste grupo.

Apesar da espessura da pele por si só não ser o principal mecanismo para reduzir a perda evaporativa de água, a produção periódica de "cocoons" (casulos) em alguns táxons de anfíbios certamente é uma exceção a esta generalização (Lillywhite 2006). Estes casulos podem ser constituídos por cerca de 40-60 camadas de células do estrato cornificado, com lipídios e materiais protéicos secretados e imprensados entre estas camadas (McClanahan *et al.*, 1976; Ruibal & Hillman, 1981; Withers, 1995; Christian & Parry, 1997). Estes casulos conferem uma considerável resistência à passagem de água, permitindo que anuros com hábito de se enterrar estabeleçam-se a profundidades mais rasas durante a seca do que as espécies sem casulos (Lee & Mercer, 1967; Ruibal & Hillman, 1981; McClanahan *et al.*, 1983; Withers, 1998).

### **Reidratação**

Quando desidratados, os anuros captam água principalmente através da mancha pélvica, uma região especializada da pele ventral caracterizada por alta permeabilidade e rica vascularização (Roth, 1973; Boutilier *et al.* 1992). As taxas de reidratação podem atingir níveis de até 20-30% da massa corpórea por hora (Niels *et al.*, 2007), sendo a taxa de absorção de água uma função da osmolalidade plasmática (Boutilier *et al.* 1992; Warburg 1972), com apoio hormonal e neural na mediação de aumentos de condutância hidráulica e circulação sanguínea da pele na mancha pélvica (Boutilier *et al.* 1992; Parsons *et al.* 1993). A diminuição da pressão oncótica do fluido intersticial, dada pela entrada de água através da pele da mancha pélvica, bem como uma possível redução de pressão hidrostática capilar devido ao efeito vasodilatador da arginina vasotocina (AVT), favorecem o fluxo de água do espaço intersticial para o sangue e mantém um gradiente osmótico favorável à absorção de água pela mancha pélvica (Word & Hillman 2005). Segundo os mesmos autores, a absorção de água se dá através de uma via transcapilar, não havendo a passagem intermediária pelos vasos linfáticos.

Viborg e colaboradores (2006) detectaram um aumento médio de 80% do fluxo sanguíneo aórtico em *R. marina* desidratados que tiveram acesso à água (Viborg *et al.*, 2006). Adicionalmente, Viborg e Hillyard (2005) estimaram o fluxo sanguíneo para a mancha pélvica de *Bufo punctatus* e *B. alvarius* através da quantificação do fluxo de células

sanguíneas (FCS), que é o produto do número de glóbulos vermelhos e sua velocidade média no volume de tecido explorado. Estes autores demonstraram que indivíduos de *B. punctatus* e *B. alvarius*, desidratados a 18-26% da massa corpórea, apresentaram um aumento do fluxo cutâneo durante a exposição à água, sendo o tempo para alcançar máximo FCS variável entre as espécies. *B. punctatus* (20 - 25 g) alcançou o valor máximo em cerca de 20 segundos (Viborg e Hillyard, 2005), enquanto *B. alvarius* (200-400 g) levou de 2 a 3 minutos. Os resultados para esta última espécie são equivalentes aos obtidos para *R. marina*, sendo a massa corpórea destas duas espécies semelhante (Viborg *et al.*, 2006). Como *B. alvarius* são encontrados em ambientes xéricos, enquanto *R. marina* são encontrados em ambientes mais méxicos, a diferença no tempo para atingir máximo FCS parece estar relacionada com a variação em massa corpórea, e não com hábitat (Viborg e Hillyard, 2005). Por outro lado, o valor máximo de FCS é maior nas espécies de deserto, *B. punctatus* e *B. alvarius*, que nas mesófilas, *R. marina* e *B. bufo* (Viborg e Hillyard, 2005). Tais resultados se coadunam com as observações morfológicas feitas por Roth (1973), de que espécies de ambientes xéricos têm uma rede de capilares mais desenvolvida na pele ventral abdominal.

Viborg e Rosenkilde (2004) mostraram a necessidade de uma interação entre o contato com água e certo grau de desidratação para estimular o aumento do FCS na mancha pélvica. Segundo estes autores, deve existir algum mecanismo sensorial nesta região capaz de detectar o contato com a água, estimulando o FCS em sapos desidratados. Adicionalmente, foi observado um aumento tanto do FCS quanto da absorção de água em animais hidratados quando estes foram injetados com um agonista beta adrenérgico (isoproterenol), enquanto que houve uma inibição do FCS e da absorção de água em sapos desidratados quando estes foram injetados com um antagonista beta adrenérgico (propranolol) (Viborg e Rosenkilde, 2004). Estes resultados indicam que a estimulação do FCS em sapos desidratados pode ser mediada por uma resposta simpática reflexa de um quimio-receptor da pele (Niels *et al.*, 2007).

Fora de seu período reprodutivo, bufonídeos mantém pouco contato com corpos de água livre em seu ambiente. Neste período, o hormônio antidiurético dos anfíbios, arginina vasotocina (AVT), reduz a filtração glomerular, estimula a reabsorção de água armazenada na bexiga e aumenta a permeabilidade da pele para facilitar a rápida reidratação (Bentley, 1966). A água também é reabsorvida da urina, pelos néfrons, e pela bexiga urinária também em resposta ao AVT (Ogushi *et al.*, 2007).

O movimento de água através do epitélio ocorre através de duas vias, transcelular e paracelular. Apesar de haver algum transporte através da via paracelular no epitélio de anfíbios, a principal rota é a via transcelular (Guo *et al.*, 2003; Orce *et al.*, 2004). Durante a

década de 90, uma classe de proteínas integrais de membrana, que formam poros específicos para o transporte de água foi descoberta, recebendo o nome de aquaporinas (AQP) (Agre *et al.*, 1993). As AQPs já foram descritas para vários organismos, desde bactérias até animais e plantas, e estas podem ser divididas em duas subfamílias: aquaporinas ortodoxas, que transportam exclusivamente água, impedindo a passagem de íons, e as aquagliceroporinas, que transportam água e alguns solutos, como glicerol e uréia (Borgnia *et al.*, 1999; Takata *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2005; Gorelick *et al.*, 2006). Análises filogenéticas demonstraram que as AQPs de anuros e mamíferos são evolutivamente próximas (Ogushi *et al.*, 2007). Em anuros encontramos 6 grupos de AQPs, sendo as pertencentes aos grupos 1, 2, 3 e 5 comuns para anuros e mamíferos, além daquelas pertencentes a dois grupos específicos para anuros - 1a e 2a (a letra “a” representa anuro) (Suzuki *et al.*, 2007).

AQP 1 (tipo 1) é expressa no endotélio dos capilares de diversos tecidos, incluindo a mancha pélvica e bexiga urinária, possivelmente desempenhando papel central no transporte da água absorvida a partir destes epitélios para a circulação (Hasegawa *et al.*, 2003). AQP 1 é também expressa no mesotélio da bexiga urinária, provavelmente mediando o movimento de água da bexiga para o restante do corpo (Suzuki *et al.*, 2007). AQPh-2 e AQPh-3 são AQPs do tipo 2a, e em resposta ao AVT ambas são translocadas para a membrana apical das células granulares a partir de um estoque citoplasmático (Hasegawa *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2007). Em *H. japonica*, a AQP-h2 é expressa nas células granulares da bexiga urinária (Hasegawa *et al.*, 2005), enquanto AQP-h2 e AQP-h3 são expressas em duas ou três camadas de células granulares que compõem a camada mais externa do stratum granulosum, sendo mediadores da absorção de água através da mancha pélvica (Tanii *et al.*, 2002; Hasegawa *et al.*, 2003). Embora AQPs do tipo 2a não sejam expressos nos rins de *Hyla japonica*, foi recentemente descoberta a AQP-h2k, responsiva ao AVT, e expressa na membrana apical e/ou citoplasma das células principais dos ductos coletores desta espécie (Ogushi *et al.*, 2007). Análises filogenéticas das AQPs demonstraram que a AQP-h2K pertence ao tipo 2, sugerindo que esta seria um ortólogo da AQP-2 dos mamíferos (Ogushi *et al.*, 2007).

Os estudos acima citados demonstram que diversos aspectos do balanço hídrico em anuros, tais como tolerância à desidratação, resistência à perda de água, sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação e taxas de reidratação podem apresentar clara relação com a distribuição geográfica e os hábitos das diferentes espécies. O Brasil apresenta condições propícias para um estudo comparativo da relação entre aspectos do balanço hídrico e distribuição geográfica em anuros, uma vez que apresenta uma grande riqueza de espécies desta ordem, distribuídos em biomas com características hídricas contrastantes.



## **Biomias do Estado de São Paulo, distribuição e balanço hídrico de anuros**

Embora um processo de drástica redução das populações de anfíbios venha sendo detectado em todo o mundo (Houlahan *et al.* 2000, Stuart *et al.* 2004), ainda não temos uma compreensão básica dos controladores da distribuição e diversidade destes animais em ampla escala espacial (Buckley & Jetz 2007). As limitações fisiológicas peculiares dos anfíbios estão bem documentadas e sugerem forte sensibilidade às condições ambientais (Feder & Burggren 1992).

Segundo Buckley & Jetz (2007), a riqueza de espécies de anfíbios aumenta em direção ao equador, com altas concentrações nas florestas tropicais úmidas, particularmente na Bacia Amazônica e Mata Atlântica. Outras regiões de alta riqueza incluem a Bacia do Congo e sudeste da Ásia. Embora estes padrões correspondam amplamente aos observados em aves (Orme *et al.* 2005) e mamíferos (Ceballos *et al.* 2005), algumas características dos anfíbios mostraram que múltiplos fatores parecem trabalhar em conjunto restringindo a riqueza de espécies destes grupo, em particular (Currie 1991; Jetz & Rahbek 2002). A água é uma restrição fundamental para os anfíbios, devido à pele altamente permeável e necessidades de água para a reprodução (Feder & Burggren 1992). Como esperado, a disponibilidade hídrica apresentou, juntamente com a temperatura, muita consistência na restrição da riqueza dos anfíbios (Buckley & Jetz 2007), contrastando com a diminuição da riqueza em direção aos pólos observada em aves e mamíferos devido a restrições energéticas (Hawkins *et al.* 2003; Whittaker *et al.* 2007).

No Estado de São Paulo encontramos os biomas Floresta Atlântica e Cerrado, com características contrastantes em diversos aspectos de potencial relevância para a distribuição geográfica e evolução fisiológica de anuros, tais como regime de chuvas e cobertura vegetal.

O Cerrado é o segundo maior domínio vegetacional do Brasil, abrangendo cerca de 2 milhões de km<sup>2</sup> e se distribui nas regiões Norte, Central, Oeste, e Sudeste do país. Nas décadas passadas, as áreas naturais de Cerrado foram extremamente perturbadas, principalmente devido à prática da agricultura e à criação extensiva de gado (Ratter *et al.* 1998). Atualmente, somente 20% da cobertura original deste bioma se mantém intacto, e somente 1.2% são protegidos na forma de reservas (Mittermeier *et al.* 2000). O Cerrado foi classificado recentemente entre os 25 hotspots terrestres mais importantes (Myers *et al.* 2000), além disso é, possivelmente, o trecho de savana tropical mais ameaçado do mundo (Silva & Bates 2002).

Embora este bioma apresente características próprias quando comparadas às de outros biomas, uma grande variação geográfica também pode ser encontrada dentro do Cerrado. A

precipitação varia entre 600 a 800mm no limite com a Caatinga e de 2.000 a 2.200mm na interface com a Amazônia. Dois parâmetros devem ser considerados, uma vez que definem o clima estacional do bioma: a precipitação média anual de 1.200 a 1.800mm e a duração do período seco, que oscila entre cinco a seis meses, denominado de veranico. Na região amazônica o *déficit* hídrico é inferior a três meses e na Caatinga entre sete a oito meses (Adámoli *et al.*, 1986; Assad e Evangelista, 1994). Apresenta ainda uma vegetação cujas fisionomias englobam formações florestais, savânicas e campestres. As formações florestais são representadas por Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão. As formações savânicas são representadas por Cerrado: denso, típico, ralo e rupestre; Vereda, Parque de Cerrado e Palmeiral. Por fim, as formações campestres são representadas por Campo: sujo, limpo e rupestre (Ribeiro *et al.*, 1983 e Ribeiro & Walter, 1998).

O conhecimento sobre a fauna de anuros do Cerrado é extremamente limitado, adicionalmente, a maioria dos estudos realizados foram conduzidos nas regiões Norte e Central do Brasil (Moreira & Barreto 1996, Martins 1998, Strüssmann 2000, Bastos *et al.* 2003). Dado que poucos remanescentes destas formações abertas são protegidos, os estudos que fornecem informações sobre a fauna e a flora nativos das regiões de Cerrado são de grande importância para o seu manejo e conservação (Silva & Bates 2002).

A Floresta Atlântica abriga cerca de 21.361 espécies de plantas e animais sendo 8.567 dessas endêmicas (Myers *et al.* 2000). Toda essa riqueza e nível de endemismo são também observados dentro da ordem Anura, apresentando cerca de 322 espécies, sendo 300 destas endêmicas (Duellman 1999a). Este bioma cobria originalmente 12% do território nacional (uma área de cerca de 1.1 milhões de Km<sup>2</sup>), se estendendo entre as latitudes 6° e 30°S (SOS Mata Atlântica & INPE 1993).

Pela extensão que ocupa do território brasileiro, a Mata Atlântica apresenta um conjunto de ecossistemas com processos ecológicos interligados. As formações do bioma são as florestas Ombrófila Densa, Ombrófila Mista (mata de araucárias), Estacional Semidecidual e Estacional Decidual e os ecossistemas associados como manguezais, restingas, brejos interioranos, campos de altitude e ilhas costeiras e oceânicas. Atualmente, sua área se encontra ameaçadoramente reduzida a menos de 5% da cobertura original, distribuída em pequenos fragmentos alterados e vertentes com altas declividades, basicamente pela ação humana (SOS Mata Atlântica 1998).

A Floresta Atlântica apresenta temperaturas médias de 18°C (Walsh 1996), e a orientação das serras costeiras dá origem a chuvas orográficas e uma precipitação considerável durante o inverno. Desta forma, a Floresta Atlântica Ombrófila apresenta um

clima quente e úmido sem apresentar uma estação seca definida, com precipitação anual variando de 2000 mm a mais de 4000 mm (Morellato *et al.* 2000). No Parque Estadual de Intervales (SP), foi registrado um índice pluviométrico de  $4216,2 \pm 245,5$  mm entre 1994 e 1996 (Pizo 2000). Uma estação seca definida, geralmente entre Abril e Setembro, só aparece na Floresta Atlântica Semi-decídua (Oliveira-Filho & Fontes 2000).

Assim, as características contrastantes do Cerrado e da Floresta Atlântica, que apresentam respectivamente áreas predominantemente abertas e fechadas, representam um sistema ideal para um estudo comparativo da relação entre aspectos do balanço hídrico e distribuição geográfica em anuros, aumentando ainda o conhecimento sobre a fauna desses sítios e os argumentos para a sua conservação.

A destruição do hábitat é certamente a maior ameaça à diversidade de anfíbios (Duellman 1999b), sendo a pouca informação a respeito do desmatamento sobre as populações de anfíbios, alarmante. Na Amazônia, por exemplo, 90% das espécies de anfíbios estão restritos a fragmentos de florestas tão pequenos quanto 350 ha (Zimmerman & Bierregaard 1986). Este processo de fragmentação pode levar ao desaparecimento de recursos importantes para a manutenção de populações naturais, expondo seus indivíduos a condições ambientais adversas. Segundo Parsons (1983), a exposição de populações a condições ambientais extremas, mesmo que por curtos períodos durante a vida dos indivíduos, pode representar um importante fator modulador tanto da distribuição geográfica quanto da evolução de caracteres associados à habilidade de sobreviver sob condições de estresse ambiental.

Carnaval (2002) relatou que espécies encontradas em fragmentos da Mata Atlântica do Nordeste apresentam padrões de divergência genética associados às necessidades ambientais táxon-específicas. Tais diferenças interespecíficas na susceptibilidade ao desmatamento encontradas por Carnaval (2002) demonstram que, enquanto a destruição do hábitat é prejudicial para muitas espécies, para outras pode não resultar em nenhum efeito ou até mesmo beneficiá-las. O desmatamento da Floresta Amazônica para a construção de rodovias ou fazendas, por exemplo, pode criar ambientes que são rapidamente ocupados por *R. marina* e *Scinax ruber*, espécies que não são encontradas na floresta preservada (Duellman 1999b).

É interessante observar que dentro de famílias ou até mesmo de gêneros de anuros é possível distinguir espécies estritamente dependentes da Floresta Atlântica e espécies que se ajustam bem à ambientes alterados e/ou naturalmente abertos. Porém, é importante ressaltar que a maior parte das espécies que se beneficiam com a ocupação humana, representa uma pequena parcela da diversidade de anuros, com numerosas populações e ampla distribuição

geográfica (Duellman 1999b). Como diferenças inter-populacionais em caracteres fisiológicos obedecendo um padrão espacial sugerem que o clima pode limitar a distribuição geográfica através de restrições fisiológicas (Chown & Gaston 1999, Hochachka & Somero 2002), diferenças de susceptibilidade às modificações ambientais de origem antrópica talvez também possam ser fundamentadas em restrições em nível fisiológico.

Entretanto, devemos levar em consideração que outros aspectos da história de vida dos anuros, como diferenças nos modos de reprodução, podem também influenciar a distribuição das espécies em adição ou substituição aos ajustes fisiológicos. Anuros que não realizam oviposição aquática, por exemplo, são muito mais diversificados nas regiões da América do Sul com alta umidade atmosférica (Duellman 1999a). Adicionalmente, muitos grupos de anuros em que as larvas se desenvolvem em corpos d'água lóticos são restritos a áreas com relevo dissecado no sudeste brasileiro e Andes (Duellman 1999a). A duração da estação reprodutiva também se encontra associada aos desafios impostos pelo ambiente. A maioria das espécies de áreas caracterizadas por longos períodos de seca e curtos períodos de chuva intensa, por exemplo, apresentam reprodução explosiva e adaptações comportamentais a ambientes xéricos, tais como construção de ninhos de espuma, hábito de escavação, estivação em tocas de roedores ou cupinzeiros, ou ocupação bromélias durante a estação seca (Gallardo 1979, Duellman 1999a). Conseqüentemente, não devemos nunca perder de vista que os padrões de distribuição e biodiversidade não são somente resultado de necessidades fisiológicas, mas também da complexa interação com aspectos do comportamento e história de vida, bem como do histórico das diferentes regiões e das linhagens que as habitam (Duellman 1999a).

### **Objetivo**

Considerando todos os aspectos até então abordados, o objetivo deste projeto foi investigar a evolução de características do balanço hídrico como a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, as taxas de perda de água por evaporação, a resistência à perda de água por evaporação e as taxas de reidratação a partir de água livre, ao longo da filogenia de anuros do Estado de São Paulo. Adicionalmente, o projeto teve como objetivo investigar as relações evolutivas entre estas variáveis, bem como as suas possíveis associações com a distribuição geográfica das espécies, através de uma abordagem comparativa entre anuros de Mata Atlântica e Cerrado.



## *II - Metodologia*

---

### Sítios de estudo e espécies incluídas

As coletas foram realizadas em quatro localidades no Estado de São Paulo, sendo duas delas regiões de Mata Atlântica Ombrófila (Estação Ecológica de Boracéia, no Município de Salesópolis e Parque Estadual Intervales, no Município de Ribeirão Grande), uma região de ecótono entre a Mata Atlântica Semi-Decidual e o Cerrado (Câmpus da UNESP, no Município de Botucatu) e uma região de cerrado (Estação Ecológica de Assis, no Município de Assis). Na Estação Ecológica de Boracéia (23°39'13.99"S; 45°53'22.41"W) foram coletados entre 20 e 23 de Janeiro de 2009, indivíduos pertencentes às espécies: *Dendropsophus microps* (N=7), *Scinax hayii* (N=10), *Hypsiboas polytaenius* (N=9), *Hypsiboas bischoffi* (N=8), *Scinax crospedospillus* (N=2), *Rhinella icterica* (N=10). Na Estação Ecológica de Assis (22°34'19.88"S; 50°24'32.82"W), foram coletados entre 05 e 08 de Março de 2009, indivíduos pertencentes às espécies: *Hypsiboas albopunctatus* (N=9), *Dendropsophus minutus* (N=10), *Leptodactylus podicipinus* (N=7) e *Hypsiboas faber* (N=10). Nos dias 24 e 31 de Agosto de 2009, foram coletados 10 indivíduos da espécie *Phyllomedusa tetraploidea* dentro do Campus da UNESP de Botucatu (22°53'1.22"S; 48°30'2.83"W). Por fim, no período de 14 a 17 de Novembro de 2009, foram coletados no Parque Estadual de Intervales (24°16'24.55"S; 48°25'2.27"W), indivíduos pertencentes às espécies: *Leptodactylus notoaktites* (N=3), *Phyllomedusa distincta* (N=5), *Physalaemus olfersii* (N=7), *Physalaemus spiniger* (N=8), *Proceratophrys boiei* (N=10), *Rhinella icterica* (N=9), *Rhinella ornata* (N=3) e *Scinax rizibilis* (N=10). Todos os indivíduos coletados, para todas as espécies, foram machos adultos durante o período reprodutivo.

Os animais foram coletados sob a licença de captura e transporte do IBAMA (Número: 17377-1). A metodologia para obtenção dos dados descrita nos itens a seguir foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) tanto para o presente projeto (Anexo1) quanto para projeto jovem pesquisador intitulado “Fragmentação das Florestas, Distribuição Geográfica e Evolução Fisiológica em Anuros Neotropicais” (Anexo2), de autoria do orientador, Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes do Departamento de Fisiologia da UNESP de Botucatu (FAPESP - processo número 06/54699-1).

### Manutenção dos anuros em laboratório

Os animais foram mantidos em recipientes plásticos individuais, substrato úmido e algum tipo de refúgio (fornecendo esconderijo). As tampas dos recipientes eram furadas para permitir a circulação de ar. Os animais foram expostos ao ciclo natural de luz e temperatura, e alimentados com larvas de tenébrio, baratas ou neonatos de camundongo, conforme o seu

tamanho. Todas as medidas em laboratório foram realizadas num prazo de 15 dias desde a chegada do animal, pois nesse período o efeito do tempo de manutenção em cativeiro, ao menos para variáveis metabólicas, não foi observado (Navas & Gomes 2001).

### **Desempenho locomotor e sensibilidade à desidratação**

O desempenho locomotor dos animais foi medido em uma Estufa Tipo Sala Climatizada/Fitotron (Eletrolab, modelo 011 com 4x2m), mantendo-se uma temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Anteriormente às medidas, os animais foram individualmente mantidos em recipientes plásticos com substrato úmido por duas horas, à temperatura do teste, sendo a manutenção de substrato úmido durante este período fundamental para prevenir a perda de água corpórea antes do início do teste. Após este período, os animais tiveram suas bexigas urinárias esvaziadas e, em seguida, foram secos com papel absorvente, pesados ( $\pm 0,01\text{g}$ ) e medidos em seu comprimento rostro-cloacal ( $\pm 0,01\text{cm}$ ). Esta medida de massa foi considerada padrão, ou seja, com os indivíduos 100% hidratados. Os animais foram então estimulados a saltar no chão da sala através de leves toques na região posterior do corpo, por uma série de seis saltos consecutivos. As distâncias entre os saltos foram medidas e o maior valor entre os seis foi considerado como desempenho locomotor do animal 100% hidratado.

Os animais foram individualmente colocados em caixas teladas através das quais foi passado um fluxo de ar, gerado por ventiladores elétricos, no interior da estufa climática mantida a  $50\% \pm 5\%$  de umidade relativa. A distância dos animais em relação ao ventilador, bem como a inclinação da incidência do vento sobre as caixas teladas, foram controladas de forma a manter uma taxa de perda de água por evaporação ao redor de 10% da massa corpórea padrão por hora.

A redução da massa corpórea foi monitorada constantemente e, cada vez que a massa corpórea dos animais era reduzida em 10% de sua massa corpórea padrão, a série de seis saltos foi repetida. Foram obtidos dados de desempenho locomotor em pelo menos três níveis de hidratação para cada indivíduo, ou seja, indivíduos 100% hidratados, com 90% e 80% da massa inicial. Testes com massa corpórea em 75% e 70% da massa inicial foram realizados quando a espécie em questão tolerava atingir tais níveis de desidratação. Para obter estes níveis de desidratação, as condições foram modificadas para que a taxa de desidratação fosse mantida em 5% da massa corpórea padrão por hora, mantendo-se assim um intervalo mínimo de uma hora entre cada série de saltos.

Os resultados destes testes poderiam, teoricamente, apresentar influência de fatores adicionais à desidratação, tais como a fadiga e possíveis ritmos diários da motivação para

atividade locomotora. Mesmo considerando que Beuchat e colaboradores (1984) demonstraram que um intervalo de uma hora entre as séries de salto não afeta o desempenho locomotor em algumas espécies de anuros, consideramos possível a ocorrência de uma grande variação interespecífica. Sendo assim, um dia adicional contendo cinco testes consecutivos de desempenho locomotor com intervalos de uma hora foi realizado para cada espécie, sendo todos realizados com os animais completamente hidratados e a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Tal teste adicional foi realizado com o objetivo de detectar a influência de possíveis efeitos adicionais no desempenho locomotor para as diferentes espécies testadas.

Para analisar a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, inicialmente os dados de distância saltada foram relativizados para cada indivíduo, sendo o maior salto considerado entre as cinco séries como 100%, e os demais considerados uma porcentagem deste. Em seguida, foi feito um gráfico para cada indivíduo onde o nível de hidratação foi colocado no eixo das abscissas e a porcentagem da distância saltada em cada nível de hidratação no eixo das ordenadas. Esses pontos foram então interligados empiricamente, obtendo-se uma reta a partir da qual se extraiu o valor do nível de hidratação cujo desempenho locomotor atingiu 70% do desempenho locomotor máximo para cada indivíduo (Beuchat *et al.* 1984). Esse valor foi considerado como a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, sendo que a sensibilidade é menor quanto menor o nível de hidratação cuja distância saltada atinge 70% da máxima.

### **Resistência e taxa de perda de água por evaporação**

Animais 100% hidratados foram mantidos por duas horas em uma sala com temperatura controlada ( $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ), acondicionados no interior de recipientes plásticos com um substrato úmido, para prevenir perda de água corpórea. Após este período, os indivíduos tiveram suas bexigas urinárias esvaziadas, sendo em seguida secos com papel absorvente, pesados ( $\pm 0,01$  g) e colocados no interior de uma câmara de acrílico com entrada e saída de ar. Foram utilizados dois tamanhos de câmaras:  $1700\text{ cm}^3$  para animais maiores, e  $140\text{ cm}^3$  para os animais menores.

Para as medidas de taxas de perda de água por evaporação e resistência à perda de água por evaporação, foi utilizado um sistema de fluxo aberto, com fluxo de ar positivo constante ( $5\text{ cm}^3.\text{s}^{-1}$  na câmara menor e  $23\text{ cm}^3.\text{s}^{-1}$  na câmara maior) gerado por um conjunto de bomba de ar associado a um fluxímetro de massa (SS-3 Subampler – Sable Systems) e mantido a uma umidade relativa de 20% por um controlador de umidade relativa (RH/Dewpoint Controller – Sable Systems). Estes dois fluxos para as câmaras de tamanhos



diferentes foram calculados de forma a manter uma velocidade de vento padronizada ( $0,25 \text{ cm.s}^{-1}$ ). O fluxo de ar com umidade controlada foi então encaminhado para três câmaras distintas: uma câmara vazia, uma contendo o indivíduo, e uma contendo um modelo de agar 3%, confeccionados a partir de contra-moldes de alginato feitos a partir de indivíduos das diferentes espécies, de forma a utilizar modelos com forma e tamanho compatíveis com cada espécie estudada. O ar saindo de cada uma das câmaras foi então encaminhado, através de um direcionador de fluxo (RM8 – Intelligent Multiplexer – Sable Systems), para um analisador de vapor de água (RH – 300 RH/Dewpoint Analyzer – Sable Systems). Um sistema de interface (UI-2 Data Acquisition Interface – Sable Systems) acoplado a um computador permitiu registros contínuos, sendo utilizados somente os registros nos quais os animais se mantiveram na postura de conservação de água. A detecção dos períodos do registro em que os animais se mantiveram na postura de conservação de água era facilmente realizada através da análise do registro de vapor de água, uma vez que observações prévias demonstraram que qualquer ajuste de posição ou movimentação do animal dentro da câmara era acompanhado de alterações súbitas nos valores médios e também na variância do sinal registrado. Após o término do registro, os indivíduos foram retirados das câmaras e novamente pesados ( $\pm 0,01 \text{ g}$ ). Nos cálculos de perda de água por evaporação não foram diferenciadas as perdas pela pele e pelo trato respiratório, já que estudos anteriores demonstraram que esta última não é significativa em anuros (Spotila & Berman, 1976; Bentley & Yorio, 1979; Wygoda, 1984).

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

$$TD = F_a DVA_a - F_v DVA_v$$

Onde  $TD$  representa a taxa de perda de água por evaporação absoluta ( $\mu\text{g.s}^{-1}$ );  $F_a$  e  $F_v$  representam o fluxo de ar ( $\text{cm}^3.\text{s}^{-1}$ ), respectivamente na câmara contendo o animal e na câmara vazia; e  $DVA_a$  e  $DVA_v$  representam a densidade do vapor de água, ( $\mu\text{g.cm}^{-3}$ ), do ar que deixa, respectivamente, a câmara contendo o animal e a câmara vazia. O cálculo da taxa de perda de água por evaporação por área de exposição foi realizado dividindo-se a taxa de perda de água por evaporação absoluta por dois terços da superfície corpórea total dos animais, que segundo Withers e colaboradores (1982a), é a porção que se mantém exposta enquanto os animais se encontram na postura de conservação de água. A área de superfície total foi considerada a partir de McClanahan & Baldwin (1969):

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

Onde  $SA$  representa a área de superfície total ( $\text{cm}^2$ ), e  $M$  representa a massa corpórea do animal (g).

A resistência à perda de água por evaporação é composta por duas forças de resistência: a resistência da pele ( $R_i$ ) e a resistência da camada de vapor de água na superfície da pele ( $R_b$ ) resultando numa resistência total ( $R_t$ ) (Spotila & Berman, 1976; Wygoda 1984, 1988).

$$R_t = R_i + R_b \rightarrow R_i = R_t - R_b$$

Para se determinar a resistência da pele foram utilizados os registros dos animais que mantiveram a postura de conservação de água, os quais forneceram os dados de resistência total ( $R_t$ ). Os registros dos modelos de agar 3%, confeccionados para as diferentes espécies e mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente para as medidas de taxa de perda de água por evaporação, forneceram os dados de resistência da camada de vapor de água na superfície ( $R_b$ ), já que o agar perde água à taxas equivalentes à uma superfície de água livre (Spotila & Berman, 1976). Ambas as resistências foram calculadas a partir da fórmula:

$$R = (DVA_s - DVA_a) / TD_a$$

Onde  $R$  representa a resistência à perda de água por evaporação ( $\text{s.cm}^{-1}$ );  $DVA_s$  representa a densidade do vapor de água na saturação ( $\mu\text{g.cm}^{-3}$ ) na superfície da pele do animal;  $DVA_a$  representa a densidade do vapor de água ( $\mu\text{g.cm}^{-3}$ ) do ar que deixa a câmara contendo o animal ou o modelo de agar; e por fim,  $TD_a$  representa a taxa de perda de água por evaporação por área de exposição ( $\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). A densidade do vapor de água na saturação foi calculada utilizando-se a lei dos gases ideais, de acordo com Campbell (1977), a partir da temperatura da superfície da pele dos animais, medida através do uso de termômetros infravermelhos digitais (TI-860, Instrutherm), ao final de cada teste e da pressão do vapor de água saturado obtida a partir de uma tabela em Dejourns (1981). Todo o sistema utilizado no registro foi mantido em uma Estufa Tipo Sala Climatizada/Fitotron (Eletrolab, modelo 011 com 4x2m) com temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

### **Taxas de reidratação a partir de água livre**

As medidas de taxa de reidratação a partir de água livre foram obtidas através da taxa de ganho de massa corpórea dos indivíduos. Logo após a coleta de dados de perda de água por evaporação, os animais já desidratados, foram pesados ( $\pm 0,01$  g) e colocados em potes plásticos de tamanho compatível com a massa dos indivíduos e contendo água em um nível suficiente para que os indivíduos mantivessem somente a região ventral em contato com a água. Em intervalos de 2 minutos, esses animais eram retirados da água, secos com papel absorvente e pesados ( $\pm 0,01$  g) novamente, por pelo menos seis vezes consecutivas. Com isso, foi possível estimar a taxa de reidratação absoluta ( $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ ) à partir da regressão do ganho de massa corpórea pelo tempo. Para a obtenção da taxa de reidratação por área, foi utilizada a fórmula proposta por McClanahan & Baldwin (1969), porém considerando-se um terço da área corpórea total, o que representa a região ventral que está exposta à água durante a reidratação.

### **Análise dos resultados**

A estatística descritiva completa foi realizada para cada variável em cada espécie através do uso do programa SPSS for Windows versão 13.0, sendo todas as análises descritas a seguir realizadas a partir dos dados médios para cada espécie, transformados em  $\text{Log}_{10}$ . Para detectar a existência de diferenças interespecíficas nas variáveis estudadas (taxa de perda de água por evaporação, resistência à perda de água por evaporação, taxa de reidratação a partir da água livre e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação) foram utilizadas análises de covariância (ANCOVA) em que espécie entrou como fator e massa corpórea como co-variável. Nos casos em que a massa corpórea não afetou significativamente a variável dependente, uma análise de variância (ANOVA) foi utilizada, em que espécie entrou como fator. No caso da existência de variação interespecífica significativa, a discriminação destas diferenças foi realizada através de testes *a posteriori* de pares de médias com ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Para detectar a possível influência das relações filogenéticas sobre a variação interespecífica das características estudadas, bem como corrigir os dados para a influência da filogenia quando esta influência foi significativa, uma árvore filogenética para as espécies utilizadas no presente projeto foi construída, sendo a topologia desta baseada na sobreposição de hipóteses propostas na literatura (Faivovich 2002; Faivovich *et al.* 2005; Frost *et al.* 2006 – Figura 1). Dado que estes artigos não traziam estimativas de datação dos eventos de

especiação ao longo da filogenia, três comprimentos arbitrários de braços foram testados quanto à adequação estatística através do uso do módulo PDTREE do Programa de Análise da Diversidade Fenotípica (PDAP; Garland *et al.* 1992, Garland & Díaz-Uriarte 1999, Garland & Ives 2000). Os três comprimentos arbitrários testados foram: constante (todos os braços com comprimento igual a 1,0), Grafen (1989) e Pagel (1992). A análise dos gráficos diagnósticos para cada comprimento de braço permitiu a escolha pelo comprimento de braços constante.

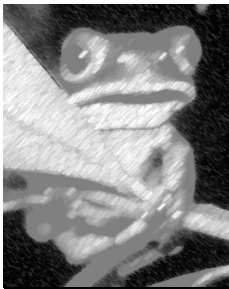
O próximo passo na análise foi verificar, para as variáveis contínuas, a presença de sinal filogenético, definido como a tendência de organismos filogeneticamente próximos serem semelhantes entre si com relação às variáveis em questão (Blomberg *et al.* 2003). Para tal, foi utilizado o procedimento de aleatorização do programa PHYSIG.M, desenvolvido para o MatLab por Blomberg *et al.* (2003). Este método consiste na permutação aleatória e sucessiva dos valores fenotípicos entre os terminais da árvore filogenética utilizada para obtenção de um modelo nulo de distribuição para a variável em questão. Se a variância dos dados reais for menor que 5% dos valores obtidos das randomizações (foram utilizadas 1000 aleatorizações), a hipótese nula (ausência de sinal com  $P < 0,05$ ) é rejeitada. Para descrever a quantidade de sinal filogenético nas variáveis contínuas foi utilizada uma estatística  $K$ , onde, quando o valor de  $K$  for igual a um, a variável apresenta a quantidade exata de sinal filogenético esperado para o modelo de evolução Browniana através da topologia e comprimentos de braços da árvore em questão; quando  $K < 1$ , a quantidade de sinal filogenético é menor do que a esperada; e, conseqüentemente,  $K > 1$ , a quantidade de sinal filogenético é maior do que a esperada dentro das especificações da árvore em questão (Blomberg *et al.* 2003). Dado que não foram obtidos dados de todas as variáveis para todas as espécies coletadas, uma árvore filogenética com o máximo número de espécies foi obtida para cada variável, sendo a probabilidade de existência de sinal filogenético, bem como sua quantificação, calculada para cada uma delas.

No caso das variáveis que apresentaram sinal filogenético, o método dos contrastes independentes foi utilizado para determinar as associações entre as variáveis após o controle para as relações filogenéticas (Felsenstein 1985). Os contrastes independentes foram calculados através do módulo PDTREE do PDAP, sendo as análises estatísticas subseqüentes realizadas com estes contrastes. Através do módulo PDSIMUL do PDAP, foram realizadas também simulações de evolução por movimento Browniano (foram utilizadas 1000 simulações) de cada variável (massa corpórea, resistência à perda de água por evaporação, taxa de perda de água por evaporação, taxa de reidratação a partir de água livre e sensibilidade

do desempenho locomotor à desidratação) de acordo com a topologia e comprimentos de braços das árvores utilizadas.

Para investigar as relações entre as variáveis contínuas estudadas (massa corpórea, resistência à perda de água por evaporação, taxa de perda de água por evaporação por área, taxa de reidratação a partir de água livre por área e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação), uma análise de componentes principais com rotação Varimax foi realizada a partir dos contrastes independentes destas variáveis, sendo considerados para interpretação somente os componentes que apresentaram eigenvalues maiores que 1,000.

Para investigar se espécies com diferentes hábitos e habitats diferiam quanto às variáveis estudadas, as espécies foram inicialmente classificadas em grupos. De acordo com o hábito, as espécies foram divididas em 3 categorias: arborícolas (*P. distincta*, *P. tetraploidea*, *H. albopunctatus*, *H. faber*, *H. polytaenius*, *H. bischoffi*, *S. hayii*, *S. crospeospillus*, *S. rizibilis*, *D. microps* e *D. minutus*); criptozóicas (*L. podicipinus*, *L. notoaktites*, *P. olfersii*, *P. spiniger* e *P. boiei*); e terrestres (*R. icterica* e *R. ornata*). Quanto ao habitat, as espécies foram divididas em 2 categorias: encontradas na Floresta Atlântica (*P. distincta*, *H. polytaenius*, *H. bischoffi*, *S. hayii*, *S. crospeospillus*, *S. rizibilis*, *D. microps*, *L. notoaktites*, *P. olfersii*, *P. spiniger*, *P. boiei*, *R. icterica* e *R. ornata*); e encontradas em áreas de Cerrado ou em ambas (*P. tetraploidea*, *H. albopunctatus*, *H. faber* e *L. podicipinus*). Através do uso do módulo PDANOVA do PDAP, foi realizada uma ANOVA para cada simulação feita pelo PDSIMUL, e o percentil 95.º do conjunto de valores de *F* provenientes das ANOVAs de cada simulação foi calculado através do SPSS Windows versão 13.0. Os grupos foram considerados significativamente diferentes quanto à uma determinada variável quando o valor de *F* para a real distribuição dos dados (obtido à partir da ANOVA convencional realizada por outro módulo do PDAP chamado PDSINGLE) foi superior ao percentil 95.º do conjunto de valores de *F* obtidos a partir do PDANOVA. Para as variáveis que não apresentaram sinal filogenético a mesma investigação foi realizada, porém, utilizando a estatística convencional com uma ANOVA no software SPSS for Windows versão 13.0.



### *III - Resultados*

---

### Diferenças interespecíficas

Os dados de massa corpórea, taxa de perda de água por evaporação, resistência à perda de água por evaporação, taxa de reidratação a partir da água livre e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação estão representados, na forma de média  $\pm$  desvio padrão, na Tabela 1.

#### *Resistência à perda de água por evaporação*

A resistência à perda de água por evaporação diferiu entre as espécies ( $F_{16,103} = 25,403$ ,  $P < 0,001$ ), sem apresentar relação com a variação em massa corpórea ( $F_{1,103} = 3,367$ ,  $P = 0,069$ ). A ANOVA utilizando espécie como fator reafirmou a existência de diferenças interespecíficas ( $F_{16,104} = 26,258$ ,  $P < 0,001$  – Figura 2), sendo que as duas espécies do gênero *Phyllomedusa* apresentam uma resistência à perda de água por evaporação muito maior que a observada para as demais espécies ( $P < 0,001$ ), não diferindo apenas entre elas ( $P = 1,000$ ) e de *D. microps* ( $P = 0,222$ ). Como a resistência à perda de água por evaporação de *Phyllomedusa* é muito elevada, sua inclusão nas análises poderia camuflar diferenças mais sutis entre as demais espécies. Dessa forma, a mesma análise foi repetida, sem a inclusão das duas espécies de *Phyllomedusa*. A partir desta análise, foi possível constatar que as diferenças interespecíficas de resistência à perda de água por evaporação permanecem ( $F_{14,91} = 29,324$ ,  $P < 0,001$ ), sendo que *D. microps* teve a maior resistência a perda de água por evaporação ( $P \leq 0,017$ ), seguido de *H. bischoffi* e *H. polytaenius* que não diferiram significativamente entre si e de *H. faber*, *S. crospedospilus*, *S. hayii* e *S. rizibilis* ( $P \geq 0,187$ ). Para *S. hayii* a resistência à perda de água por evaporação foi maior ( $P \leq 0,015$ ) que para *H. albopunctatus*, *L. podicipinus*, *P. boiei*, *R. icterica* e *R. ornata*, já *H. faber* e *S. rizibilis* tiveram um valor significativamente maior ( $P \leq 0,026$ ) que *L. podicipinus*, *R. icterica* e *R. ornata*, enquanto *H. albopunctatus*, *P. olfersii*, *P. spiniger*, *P. boiei* e *S. crospedospilus*, tiveram valores significativamente maiores ( $P \leq 0,014$ ) que *R. icterica* e *R. ornata*. Finalmente, *L. notoaktites* teve uma resistência à perda de água por evaporação maior apenas que *R. ornata* ( $P = 0,009$ ).

#### *Taxas de perda de água por evaporação*

As taxas de perda de água por evaporação diferiram entre as espécies ( $F_{16,103} = 16,314$ ,  $P < 0,001$ ), não apresentando relação com a variação em massa corpórea ( $F_{1,103} = 0,811$ ,  $P = 0,370$ ). Uma ANOVA utilizando espécie como fator reafirmou a existência de diferenças interespecíficas nas taxas de perda de água por evaporação ( $F_{16,104} = 17,022$ ,  $P < 0,001$  – Figura 3), sendo que *P. tetraploidea* e *P. distincta* tiveram as menores taxas de perda de água

por evaporação diferindo significativamente das demais espécies ( $P \leq 0,003$ ), seguidas de *D. microps* e *P. boiei* que diferiram significativamente apenas de *P. spiniger*, *R. ornata* e *S. rizibilis* ( $P \leq 0,050$ ).

As diferenças interespecíficas das taxas de perda de água por evaporação também permanecem após a exclusão do gênero *Phyllomedusa* da análise ( $F_{14,91} = 13,676$ ,  $P < 0,001$ ), sendo que *P. spiniger*, *R. ornata* e *S. rizibilis* tiveram as maiores taxas de perda de água por evaporação, não diferindo significativamente entre elas e de *H. albopunctatus*, *L. podicipinus* e *P. olfersii* ( $P \geq 0,070$ ). Já para *L. podicipinus*, as taxas de perda de água por evaporação foram maiores que as observadas para *D. microps*, *H. bischoffi*, *L. notoaktites* e *P. boiei* ( $P \leq 0,038$ ), enquanto que para *H. albopunctatus*, *H. faber*, *P. olfersii*, *R. icterica* e *S. crospedospilus*, esses valores foram maiores somente que os observados para *D. microps* e *P. boiei* ( $P \leq 0,045$ ). Finalmente, os valores de taxas de perda de água por evaporação encontrados para *S. hayii* só foram maiores do que os encontrados para *D. microps* ( $P = 0,014$ ).

#### *Taxas de reidratação a partir da água livre*

As espécies diferiram em suas taxas de reidratação a partir de água livre por área ( $F_{13,97} = 19,555$ ,  $P < 0,001$ ), não existindo um efeito significativo da massa corpórea sobre essa variável ( $F_{1,97} = 0,730$ ,  $P < 0,395$ ). Uma ANOVA tendo espécie como fator reafirmou a diferença significativa entre as espécies ( $F_{13,99} = 28,158$ ,  $P < 0,001$  – Figura 4), sendo que *P. boiei* apresentou as maiores taxas de reidratação à partir de água livre, não diferindo significativamente apenas de *H. bischoffi*, *H. faber* e *R. icterica* ( $P \geq 0,094$ ). Esses valores também foram altos para *H. bischoffi* e *H. faber*, que além de não diferirem de *P. boiei* ( $P = 0,642$ ) e entre si ( $P = 1,000$ ), também não diferiram de *R. icterica* ( $P = 1,000$ ). *R. icterica*, por sua vez, apresentou uma taxa de reidratação a partir de água livre maior que *D. microps*, *L. podicipinus*, *P. tetraploidea* e *P. olfersii* ( $P \leq 0,038$ ). *H. albopunctatus* e *S. hayii* tiveram taxas de reidratação a partir de água livre maiores que *D. microps*, *L. podicipinus* e *P. olfersii* ( $P \leq 0,008$ ). Finalmente, *D. minutus*, *H. polytaenius* e *P. tetraploidea* tiveram esses valores maiores somente do que *D. microps* e *P. olfersii* ( $P \leq 0,017$ ).

#### *Sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação*

As espécies estudadas diferiram significativamente quanto à sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação ( $F_{12,89} = 7,297$ ,  $P < 0,001$ ), não havendo relação com a variação em massa corpórea ( $F_{1,89} = 0,917$ ,  $P < 0,341$ ). A ANOVA tendo espécie como fator confirmou a diferença significativa entre estas ( $F_{12,91} = 7,509$ ,  $P < 0,001$  – Figura 5), sendo



o desempenho locomotor de *H. bischoffi* menos sensível à desidratação que em *R. icterica* ( $P = 0,006$ ), *P. olfersii* ( $P = 0,029$ ), *D. minutus* ( $P < 0,001$ ), *H. albopunctatus* ( $P < 0,001$ ) *S. hayii* ( $P < 0,001$ ) e *L. podicipinus* ( $P < 0,001$ ). *D. microps*, *H. faber*, *P. boiei* também apresentaram menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação que *D. minutus*, *H. albopunctatus*, *S. hayii* e *L. podicipinus* ( $P \leq 0,022$ ).

### **Sinal filogenético**

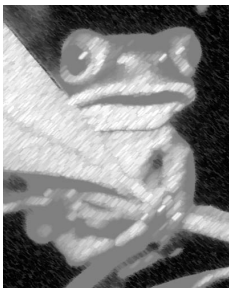
Das cinco variáveis estudadas, apenas três apresentaram sinal filogenético (massa corpórea, taxa de perda de água por evaporação e resistência à perda de água por evaporação), com valores de  $K$  entre 0,826 e 1,223 (Tabela 2). Desta forma, os efeitos da relação filogenética entre as espécies estudadas foi pervasiva na variação interespecífica para estas três variáveis, sendo o emprego dos contrastes independentes realizado nas análises subsequentes, sempre que estas variáveis foram incluídas.

### **Relações entre as variáveis estudadas**

A análise de componentes principais realizada a partir dos contrastes independentes das cinco variáveis contínuas estudadas resultou em dois componentes (Tabela 3). O componente 1 explicou 49,77% da variância total, estando associado, em termos gerais, à perda de água e a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação: quanto maior a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação e a resistência à perda de água por evaporação, menores são as taxas de perda de água por evaporação. O componente 2 explicou 33,21% da variância total, sendo composto pela relação positiva entre taxa de reidratação a partir da água livre e a massa corpórea.

### **Efeito das diferenças em hábito e habitat**

A Tabela 4 é relativa às variáveis que apresentaram sinal filogenético e, portanto tiveram uma análise diferenciada tanto entre as categorias de hábito quanto as de habitat e traz os valores de  $F$  obtidos de uma ANOVA convencional, bem como os representados pelo percentil 95.º de mil simulações de evolução Browniana das variáveis estudadas, cuja comparação revela que não houve uma diferença significativa em nenhuma das variáveis, uma vez que os valores de  $F$  para a real distribuição dos dados foi muito menor. Já a Tabela 5 traz os resultados uma ANOVA convencional realizada para as variáveis que não apresentaram sinal filogenético, mostrando a ausência de diferença significativa, para ambas variáveis, entre as categorias tanto de hábito ( $P \geq 0,668$ ) quanto de habitat ( $P \geq 0,167$ ).



## *IV - Discussão*

---

### Sinal filogenético

Ao se avaliar a Tabela 2, vemos que três das variáveis estudadas apresentaram um forte sinal filogenético: massa corpórea ( $P = 0,010$ ), resistência a perda de água por evaporação ( $P = 0,001$ ) e a taxa de perda de água por evaporação ( $P = 0,017$ ). Podemos ainda verificar que os valores de  $K$  para as três variáveis permaneceram próximos de 1,000, sugerindo que a evolução destas características pode ser explicada de maneira muito contundente por movimento Browniano simples, com pouca ação de algum tipo de seleção direcional ou estabilizadora (Blomberg *et al.* 2003). Por outro lado, tanto a taxa de reidratação a partir de água livre, quanto a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação não apresentaram sinal filogenético significativo ( $P = 0,237$  e  $P = 0,437$ , respectivamente), sendo ambas as variáveis caracterizadas por valores de  $K$  menores que 1,000. Tal constatação sugere que estas variáveis apresentam uma grande variância fenotípica, embora não tenhamos elementos para discernir sua natureza. Talvez, esta grande variabilidade possa representar uma grande resposta à seleção direcional, embora não tenhamos ainda uma clara idéia sobre os possíveis fatores seletivos atuantes sobre estas características ao longo da história evolutiva (ver próximos itens desta discussão). Uma outra possibilidade é que a grande variabilidade fenotípica encontrada para estas características deva-se à plasticidade fenotípica. Experimentos de aclimação serão necessários para verificar a maleabilidade fenotípica individual destas variáveis.

Uma última possibilidade é a de que a pequena representatividade de espécies para cada grupo filogenético tenha mascarado a existência do sinal filogenético para a taxa de reidratação e a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação. Tal observação deve-se ao fato de que, foram justamente para estas duas variáveis, que na maioria das vezes foram utilizadas somente uma espécie dentro de cada gênero. Talvez, a existência de sinal filogenético significativo para estas variáveis pudesse ser detectada com a inclusão de um maior número de espécies, principalmente dentro de gêneros pouco representados, tais como *Phyllomedusa*, *Dendropsophus*, *Proceratophrys* e *Rhinella*.

### Relações entre as variáveis estudadas

A observação de correlações fenotípicas entre variáveis ao longo da evolução podem surgir como resultado de (1) uma correlação funcional e genética entre estas, resultando em uma unidade evolutiva, ou (2) como resultado de uma resposta paralela e integrada à seleção natural, no processo conhecido como seleção correlacionada (Futuyma 1998). A análise de componentes principais para os dados do presente estudo mostrou, em um dos componentes

extraídos, uma forte relação negativa entre a resistência à perda de água por evaporação e as taxas de perda de água por evaporação e, adicionalmente, quanto maior a taxa de perda de água por evaporação, maior também a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação (Tabela 3). Em um segundo componente, encontrou-se definida uma relação positiva entre taxa de reidratação por área e massa corpórea (Tabela 3).

Modelos de genética quantitativa predizem que complexos de caracteres relacionados a um sistema funcional particular devam tornar-se fortemente integrados através de efeitos pleiotrópicos de genes que, por sua vez, apresentam poucos efeitos em outros complexos fenotípicos funcionalmente integrados. Desta forma, a evolução da arquitetura genética subjacente a caracteres funcionalmente relacionados levaria ao padrão de herança destes como se fossem um caráter único, permitindo a adaptação de diferentes funções com pouca ou nenhuma interferência entre estas (Cheverud 1996, Wagner 1996). Uma evidência de que diferentes características fenotípicas representariam uma unidade modular de evolução, seria a manutenção das relações entre estas características por longos períodos de tempo, abarcando diversos eventos de cladogênese, e ao longo de um grande intervalo de condições do ambiente (Schwenk & Wagner 2001).

A relação entre a resistência e a taxa de perda de água por evaporação já era esperada, uma vez que a variação na resistência da pele à perda de água por evaporação é determinante da taxa de perda de água por evaporação (Spotila & Berman 1976; Wygoda 1984, 1988). Desta forma, faz sentido a forte relação fenotípica encontrada entre estas ao longo da evolução, sugerindo que estas realmente devem formar uma unidade evolutiva (Cheverud 1996, Wagner 1996). Adicionalmente, o próprio cálculo da resistência é derivado da medida da taxa de perda de água por evaporação. Por outro lado, a interpretação da relação encontrada entre a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação com as outras duas variáveis é muito menos óbvia.

Enquanto diversos estudos vêm demonstrando que a resistência à perda de água por evaporação e, conseqüentemente, a taxa de perda de água por evaporação parecem estar ligadas a características da pele como espessura, grau de queratinização e secreção de lipídeos (Toledo & Jared 1993; Lillywhite 2006), o efeito da desidratação sobre o desempenho locomotor em anuros vem recebendo menor atenção. O desempenho aeróbio é afetado pela desidratação principalmente por um declínio no volume plasmático, e um aumento no hematócrito, na concentração de solutos plasmáticos e na pressão osmótica e coloidal (Hillman 1978, 1980, 1982, 1984; Hillman *et al.* 1987). Como conseqüência, o débito cardíaco diminui e a resistência periférica aumenta, principalmente devido à diminuição de

volume aumento da viscosidade sangüínea além do aumento da vasoconstrição (Hillman 1978, 1987). Todas essas conseqüências fisiológicas da desidratação associadas à redução da eficiência circulatória podem claramente estar associadas de maneira causal à redução da capacidade aeróbia máxima, porém, não à capacidade glicolítica durante o exercício (Gatten 1987; Stefanski *et al.* 1989).

Como neste estudo o desempenho locomotor foi avaliado através de uma série de seis saltos, a fonte de ATP para sustentar este exercício deve certamente provir de glicólise anaeróbia, e a desidratação deve ter afetado o desempenho locomotor de forma diferenciada à descrita pelos estudos acima citados. De um modo geral, anfíbios adultos captam O<sub>2</sub> principalmente através dos pulmões, porém, excretam a maioria do CO<sub>2</sub> através da pele (Pinder 1992) e a taxa de eliminação de CO<sub>2</sub> é reduzida em *R. marina* quando desidratado, impondo mudanças compensatórias na freqüência ventilatória bem como no balanço ácido-base renal (Boutilier *et al.* 1979). Entretanto, embora *R. marina* desidratados possa apresentar uma resposta compensatória adequada à manutenção do pH dos fluidos corpóreos durante o repouso, a situação deve se agravar durante o exercício. Nesta situação de exercício e desidratação, o aumento da taxa de formação de ácidos combinada com a redução da eficiência de liberação de CO<sub>2</sub> poderia causar um redução do pH muscular, gerando queda na atividade das enzimas glicolíticas e desempenho de salto (Hochachka & Somero 2002). Uma outra possibilidade é a de que, com a desidratação e o aumento da resistência periférica, a disponibilidade de O<sub>2</sub> fique prejudicada não somente para os músculos em exercício mas também para o sistema nervoso, reduzindo a eficiência do recrutamento de fibras e a potência do salto. Estas hipóteses permanecem por ser investigadas, e se considerarmos as diferenças interespecíficas já encontradas, torna-se particularmente interessante a abordagem comparativa destes mecanismos.

Considerando os aspectos funcionais acima descritos não temos indícios, pelo menos até o momento, de que a resistência à perda de água e a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação estejam funcionalmente e evolutivamente interligados. Assim, a hipótese mais plausível para a correlação encontrada seja a de seleção correlacionada, de forma que ambas as características venham respondendo paralelamente às pressões seletivas. Um exemplo de evolução correlacionada é o estudo de Brodie (1992) sobre o polimorfismo e o comportamento anti-predatório da serpente *Thamnophis ordinoides*, em que este autor demonstrou que os indivíduos listrados que fugiam rapidamente em linha reta e em uma única direção, e os indivíduos manchados que tendiam a reverter a rota de fuga freqüentemente, ocupavam dois picos adaptativos distintos, sem que estas duas características estivessem

geneticamente interligadas. De forma semelhante, acreditamos que os indivíduos que tiveram uma maior resistência a perda de água por evaporação (conseqüentemente com menores taxas de perda de água por evaporação) e uma menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação tiveram maior sucesso reprodutivo, deixando maior número de descendentes ao longo da história evolutiva dos anuros incluídos no presente estudo. Embora a seleção correlacionada seja uma hipótese plausível para estas variáveis, o contexto histórico e ecológico de sua ocorrência permanece obscuro, como melhor abordado no próximo sub-item desta discussão.

Com relação ao componente 2, que apresentou uma relação positiva entre a massa corpórea e a taxa de reidratação a partir de água livre (Tabela 3), podemos apenas especular sobre esta relação, dado que a maior parte dos estudos sobre reidratação foi realizado comparando apenas espécies de massa corpórea similar. A comparação da inclinação da reta de uma regressão entre os contrastes independentes da massa corpórea e da taxa de reidratação a partir de água livre passando pela origem ( $\beta = 0,595$ ;  $P = 0,041$ ), com a inclinação da reta da regressão entre massa corpórea e área de superfície proposta por McClanahan & Baldwin (1969) ( $\beta = 0,56$ ) revela que a relação encontrada entra as duas variáveis do componente 2 talvez possa refletir a relação alométrica da área de mancha pélvica, se considerarmos que a mancha pélvica apresenta a mesma proporção em relação a superfície corpórea total para espécies de diferentes massas corpóreas.

### **Balanco hídrico e as relações com hábito e hábitat**

Podem ser encontrados na literatura diversos estudos comparativos que trazem evidências da relação entre ocupação de ambientes que diferem em disponibilidade hídrica e variáveis associadas ao balanço hídrico em anuros, tais como taxas de perda de água por evaporação, que mostra que espécies de ambientes úmidos apresentam maiores valores (Warburg 1965; Gehlbach *et al.* 1969); taxas de reidratação, mostrando que espécies de ambientes áridos apresentam as maiores taxas (Main & Bentley 1964; Christensen 1974 Viborg e Hillyard 2005; Viborg *et al.* 2006); e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, mostrando que essa sensibilidade pode significar uma restrição à ocupação de ambientes mais abertos (Beuchat *et al.* 1984; Titon *et al.* 2010). Porém, é importante lembrar também que outros estudos não encontram tais relações (Littleford *et al.* 1947; Thorson 1955; Ray 1958; Claussen 1969; Fair 1970). Podem ser adicionalmente encontrados na literatura, relatos da existência de relações entre características do balanço hídrico e diferenças interespecíficas em hábito. Wygoda (1984), por exemplo, demonstrou que animais de hábito

arborícola tendem a apresentar menores taxas de perda de água por evaporação. Bentley (1958) sugeriu que anuros de hábito terrícola têm maiores taxas de reidratação a partir de água livre, quando comparados aos de hábito aquático.

Ao compararmos os valores obtidos para as diversas variáveis estudadas entre as espécies incluídas no presente estudo, bem como com dados provenientes da literatura, alguns padrões interessantes merecem destaque. Quando comparados aos valores de resistência à perda de água por evaporação obtidos para as demais espécies de anuros no presente estudo, os valores para *P. distincta* e de *P. tetraploidea*,  $23,04 \pm 14,66 \text{ s.cm}^{-1}$  e  $26,89 \pm 23,58 \text{ s.cm}^{-1}$  respectivamente (média  $\pm$  desvio padrão), são claramente mais altos, formando um grupo à parte. Entretanto, quando comparados às outras espécies de *Phyllomedusa* consideradas à prova de água, bem como anuros à prova de água pertencentes a outros gêneros (Tabela 6), os valores de *P. distincta* e *P. tetraploidea* são visivelmente menores. É interessante ainda observar que as espécies de *Phyllomedusa* consideradas à prova de água ocorrem em ambientes xéricos, enquanto *P. distincta* e *P. tetraploidea* ocorrem em ambientes mais úmidos. Adicionalmente, os valores de resistência à perda de água por evaporação para estas duas espécies de *Phyllomedusa* de ambientes úmidos são equivalentes aos obtidos para duas espécies de *Pachymedusa* de ambientes xéricos, e mais altos que o apresentado por um outro *Phyllomedusinae* de ambientes úmidos, *Agalychnis annae*. Este quadro sugere que tanto fatores históricos quanto seleção natural devem ter desempenhado importantes papéis na história evolutiva da resistência à perda de água por evaporação no gênero *Phyllomedusa*. Embora as espécies pertencentes a este gênero sejam caracterizadas por uma alta resistência à perda de água por evaporação, a ocupação de ambientes xéricos parece associada à seleção direcional desta característica. Por outro lado, podemos observar também na Tabela 6, que anuros à prova de água de outros grupos filogenéticos também ocorrem em ambientes úmidos. Esta observação reforça a necessidade da inclusão dos fatores históricos tanto de diferenciação filogenética quanto de ocupação de diferentes ambientes para entendermos a evolução de caracteres fisiológicos, sendo que a observação estante das diferenças de habitat atuais parecem não ser suficientes para explicar essa diferença de valor de resistência à perda de água por evaporação. Outra fonte de variação que permanece até o momento inexplorada para este grupo, é o papel da plasticidade fenotípica da resistência à perda de água por evaporação em espécies úmidas e xéricas.

Outra espécie que se destacou quanto a resistência a perda de água por evaporação no presente estudo foi *Dendropsophus microps*, com  $9,23 \pm 0,93 \text{ s.cm}^{-1}$  (média  $\pm$  desvio padrão). Esse valor encontrado é comparável àqueles encontrados para diversas espécies caracterizadas

por uma resistência moderada à perda de água (Tabela 6), tais como *Agalychnis annae*, *Pachymedusa dacnicolor*, *Litoria caerulea*, *L. coplandi*, *L. gilleni*, *L. rothi*, *L. rubella*. Tendo em vista que *Dendropsophus* se encontra filogeneticamente muito distante das demais espécies citadas (Faivovich *et al.* 2005), poderíamos supor uma convergência adaptativa, porém, para testar esta hipótese, seria necessário um estudo comparativo envolvendo mais espécies dentro desses grupos, acompanhado de detalhados aspectos de história de vida.

Outro caso a se destacar é *Proceratophrys boiei*, uma espécie com distribuição geográfica claramente associada à Mata Atlântica, mas que apresentou resistência à perda de água por evaporação e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação apenas moderadas e, principalmente, as maiores taxas de reidratação à partir de água livre medidas no presente estudo. Aparentemente, essas características permitiriam que esta espécie ocupasse áreas abertas e/ou mais xéricas, porém, o que observamos é uma distribuição associada à Mata Atlântica. Estes dados sugerem a possibilidade de que Cycloramphidae tenha surgido em ambientes mais xéricos, que foram posteriormente substituídos pela mata em parte da distribuição deste grupo ao longo de sua história evolutiva. Desta forma, *P. boiei* poderia expressar características associadas à pressões seletivas atuantes em ambientes do passado. Porém, essa hipótese só poderá ser testada com a inclusão de dados fisiológicos para mais espécies, bem como com uma proposta filogenética com datações para este grupo.

A forma particular como diferentes aspectos do fenótipo encontram-se integrados em diferentes grupos também deve ser levada em consideração na interpretação adaptativa. Um exemplo desta interpretação integrativa é o estudo realizado por Bentley (1958), em que o autor descreve como o comportamento de escavação e o tipo de solo escavado influenciou a evolução das taxas de reidratação nos gêneros *Heleioporus* e *Neobatrachus*. Segundo este autor, quando comparadas espécies pertencentes ao gênero *Neobatrachus*, que vivem em solos com muita argila e, portanto, impedem a escavação profunda, existe uma clara correlação entre grau de aridez ambiental e taxa de reidratação. Por outro lado, quando comparadas espécies pertencentes ao gênero *Heleioporus*, que vivem em solos arenosos e escavam a grandes profundidades, evitando assim condições micro-ambientais de estresse hídrico, não existe relação entre taxa de reidratação e aridez (Bentley 1958). Titon e colaboradores (2010), demonstraram que tanto *R. icterica* quanto *R. ornata*, que habitam áreas florestadas, apresentaram uma menor sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação quando comparados à *R. schneideri*, que conseguem ocupar ambiente mais abertos. Adicionalmente, *R. schneideri* apresentou taxas de reidratação mais altas que *R. ornata*, espécie cujo grupo inteiro apresenta distribuição geográfica restrita à Mata Atlântica



(Titon *et al.* 2010). Outros estudos também tem demonstrado relações entre características do balanço hídrico e distribuição geográfica atual em Bufonídeos, como por exemplo, Viborg e Hillyard (2005) que demonstraram que do fluxo celular sangüíneo é maior nas espécies de ambientes xéricos, *B. punctatus* e *B. alvarius*, que nas de ambientes méxicos, *R. marina* e *B. bufo*. Esses resultados estão de acordo ainda com as observações morfológicas feitas por Roth (1973), de que espécies de ambientes xéricos têm uma rede de capilares mais desenvolvida na pele ventral abdominal. Esses resultados, associados ao fato que Bufonídeos apresentam uma resistência à perda de água por evaporação particularmente baixa (Tabela 1 do presente estudo, Prates & Navas, 2009), apontam para a possibilidade de que este grupo responda de maneira mais proeminente às pressões seletivas associadas à disponibilidade hídrica do ambiente em diversos aspectos de seu balanço hídrico, justamente por causa de sua baixa resistência à perda de água, tornando mais clara a relação entre aspectos do balanço hídrico e a distribuição geográfica atual. Complementarmente, talvez a resposta à atuação de pressões seletivas associadas à disponibilidade hídrica ambiental seja parcialmente tamponada em grupos caracterizados por uma resistência mais alta à perda de água por evaporação, como os Hilídeos, por exemplo.

Mas se todos estes indícios da ação da seleção natural podem ser encontrados a partir da análise não formal dos dados obtidos, por que a análise formal do presente conjunto de dados não corrobora estes indícios? Como observado nas Tabelas 4 e 5, os resultados provenientes da análise conjunta dos dados do presente estudo não demonstraram relação com hábito e com o hábitat das espécies. Entretanto, acreditamos que este resultado deva-se, principalmente a problemas de amostragem. Na divisão por hábito, por exemplo, observa-se uma forte sobreposição da filogenia, onde todos os animais que apresentam hábito arborícola são Hilídeos. Young *et al.* (2005) encontrou uma correlação entre a resistência a perda de água por evaporação e o hábito entre hilídeos australianos, porém estas espécies apresentavam uma variação muito maior em hábito, englobando espécies tipicamente arborícolas, terrestres, aquáticas e criptozóicas. Por tanto, uma ação que poderia favorecer a comparação feita no presente trabalho é o aumento do número de espécies, que mesmo dentro de um mesmo grupo, apresentem hábitos diferentes. A inclusão de espécies pertencentes ao gênero *Pseudis*, por exemplo, poderia aumentar o poder de discriminação de hábitos dentro dos Hilídeos amostrados, assim como espécies de *Dendrophryniscus* dentro de Bufonidae, e *Cycloramphus* e *Crossodactylodes* dentro de Cycloramphidae.

Quanto à divisão por hábitat, a resolução da análise poderia também se beneficiar de um aumento sistematizado do número de espécies incluídas. Dentro da presente amostra,

tivemos um grande número de espécies com sua distribuição mais associada à áreas florestadas e um número relativamente menor de espécies encontradas em áreas abertas, além disso, apenas uma das espécies incluídas é encontrada exclusivamente em formações abertas, *Leptodactylus podicipinus*. Da mesma forma, aqui a inclusão de algumas espécies chave poderia ajudar na busca por uma correlação com o habitat. Seria interessante a inclusão de espécies com ampla distribuição geográfica, tais como *Dendropsophus nanus*, *Scinax fuscovarius* e *Physalaenus cuvieri*.

Uma grande dificuldade foi encontrada na busca de dados ecológicos na literatura para a classificação das espécies quanto ao hábito e, principalmente, quanto ao habitat. A informação disponível é, de forma geral, escassa, muito concentrada em termos espaciais e temporais, e baseada em uma diversidade metodológica muito grande. Esta heterogeneidade resultou em pouco poder para discriminação das espécies nos grupos propostos para hábito e habitat. Além disso, a relação dos dados obtidos no presente estudo com outras variáveis comportamentais e ecológicas que poderiam estar associadas à diversidade do balanço hídrico de anuros, tais como duração e época da temporada reprodutiva, variância dos microambientes ocupados durante a época reprodutiva, ambiente ocupado fora do período reprodutivo, permanece por ser investigada.

Uma observação também deve ser feita quanto à escolha da forma com que a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação foi avaliada. Uma série de seis saltos como medida do desempenho foi utilizada por aparentar ser a mais representativa entre os tipos de locomoção da maioria das espécies incluídas no estudo, já que a maior parte destas são caracterizadas por uma locomoção sustentada prioritariamente por vias independentes do oxigênio (Pough *et al.* 1992). Entretanto, a opção por um protocolo que estimulasse a locomoção aerobiamente sustentada poderia talvez mostrar mais claramente os efeitos da desidratação sobre a locomoção nas diferentes espécies, já que existem muito mais evidências na literatura sobre o efeito da desidratação sobre este tipo de locomoção (Hillman 1978, 1982, 1984; Hillman *et al.* 1987).

Além disso, é importante ressaltar ainda, que a grande maioria dos trabalhos que encontrou essa associação de alguma característica com o ambiente, comparou ambientes xéricos e méxicos. Desta forma, não é possível garantir que as diferenças hídricas observadas entre o Cerrado e a Mata Atlântica presente no Estado de São Paulo, sejam grandes o suficiente para encontrarmos espécies com diferenças fisiológicas significativas. A inclusão de espécies da Caatinga poderia ser muito interessante nesse contexto, uma vez que ela

apresenta características hídricas muito mais contrastes do que as observadas entre Cerrado e Mata Atlântica, e, portanto, poderia ser também um ótimo sistema para esse tipo de estudo.

### **Conclusões Gerais**

A taxa de perda de água por evaporação, bem como a resistência a esta, a taxa de reidratação e a sensibilidade do desempenho locomotor a desidratação apresentam ampla variação interespecífica.

Existe sinal filogenético para taxa de perda de água por evaporação, resistência à perda de água por evaporação e massa corpórea, havendo para estas três características, provavelmente, uma grande influência da evolução por deriva genética ao longo da filogenia.

As características associadas ao balanço hídrico em anuros encontram-se evolutivamente interligadas. A relação negativa encontrada entre as taxas de perda de água por evaporação e a resistência a esta já era esperada, uma vez que a variação na resistência da pele à perda de água por evaporação é determinante da taxa de perda de água por evaporação, e próprio cálculo da resistência é derivado da medida da taxa de perda de água por evaporação. Por outro lado, a relação negativa entre resistência à perda de água por evaporação e a sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação provavelmente se deve à seleção correlacionada destas características. A relação positiva encontrada entre a taxa de reidratação a partir de água livre e a massa corpórea, deve-se provavelmente à relação alométrica da superfície da mancha pélvica, caso esta apresente a mesma proporção em relação a superfície corpórea total para todas as espécies.

Embora existam indícios da importância da atuação de pressões seletivas sobre as características estudadas, a amostragem de espécies e/ou localidades provavelmente não foram suficientes para identificar estas pressões.



## *V - Referências Bibliográficas*

---

- Adámoli, J.; Macedo, J.; Azevedo, L. G.; Madeira Neto, J. 1986. **Caracterização da região dos cerrados** In: GOEDERT, W.J. **Solos dos cerrados tecnologias e estratégias de manejo**. [Planaltina, DF]: **EMBRAPA-CPAC** / São Paulo: Nobel, p.33-74.
- Agre, P., Preston, G.M., Smith, B.L., Jung, J.S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W.B., Nielsen, S., 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. **Am. J. Physiol.** 265, F463–F476.
- Assad, E. D. & Evangelista, B. A. 1994. **Análise freqüencial da precipitação pluviométrica**. In: Assad, E. D. coord. *Chuvas nos Cerrados: análise e espacialização*. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados**. Brasília: **EMBRAPA-CPAC: EMBRAPA-SPI**, p. 25-42.
- Bastos, R. P., Motta, J. A. de O., Lima, L. P. & Guimarães, L. D. 2003. Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, estado de Goiás. Goiânia: R.P. Bastos.
- Bentley, P. J., and T. Yorio. 1979. Evaporative water loss in anuran amphibia: a comparative study. **Comp. Biochem. Physiol.** A62:1005–1009.
- Bentley, P. J., Lee, A. K. & Main, A. R., 1958. Comparison of Dehydration and Hydration of two genera of frogs (*Heleioporus* and *Neobatrachus*) that live in areas of varying aridity. **J. Exp. Biol.** 35, 667-684.
- Bentley, P.J. 1966. Adaptations of amphibians to arid environments. **Science** 152, 619–623.
- Beuchat, C.A., F.H. Pough & M.M. Stewart. 1984. Response to simultaneous dehydration and thermal stress in three species of Puerto Rican frogs. **J. Comp. Physiol.** 154B:579-585.
- Blomberg S. P., T. Garland, and A. R. Ives. 2003. Testing for Phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. **Evolution.** 57(4):717.
- Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., Agre, P., 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. **Annu. Rev. Biochem.** 68, 425–458.
- Boutilier, R.G., D. J. Randall, G. Shelton, and D.P. Toews. 1979. Acid-base relationship in the blood of the toad *Bufo marinus*: 2. The effects of dehydration. **J. Exp. Biol.** 82:345-355.
- Boutilier, R.G.; D.F. Stiffler; D.P. Toews. 1992. **Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians**. In: Feder, M.E.; Burggren, W.W. (eds). **Environmental Physiology of the Amphibians**. The University of Chicago Press, Chicago. 81-124.

- Brodie, E.D. 1992. Correlational selection for oclor pattern and antipredator behavior in natural populations of garter snake *Thamnophis ordinoides*. **Evolution** 46:1284-1298.
- Buckley, L. and Jetz B. W. 2007. Environmental and historical constraints on global patterns of amphibian richness. **Proc. R. Soc.** B274:1167-1173.
- Campbell G. S. 1977. **An introduction to environmental biophysics**. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Carnaval, A.C.O.Q. 2002. Phylogeography of four frog species in forest fragments of northeastern Brazil – a preliminary study. **Integr. Comp. Biol.** 42:913-921.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Soberon, J., Salazar, I. & Fay, J. P. 2005. Global mammal conservation: what must we manage? **Science** 309:603–607.
- Cheverud, J.M. 1996. Developmental integration and the evolution of pleiotropy. **Am. Zool.** 36:44-50.
- Chown, S.L. & K.J. Gaston. 1999. Exploring links between physiology and ecology at macro scales: the role of respiratory metabolism in insects. **Biol. Rev.** 74:87-120.
- Christensen, C.U. 1974. Effect of arterial perfusion on net water flux and active sodium transport across the isolated skin of *Bufo bufo bufo* (L.). **J. Comp. Physiol.** 93, 93–104.
- Christian K. and D. Parry. 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.
- Chuong, C. M., Nickoloff, B. J., Elias, P. M., Goldsmith, L. A., Macher, E., Maderson, P. A., Sundberg, J. P., Tagami, H., Plonka, P. M., Thestrup-Pedersen, K. 2002. What is the ‘true’ function of skin? **Exp. Dermatol.** 11, 159-187.
- Claussen, D. L. 1969. Studies on water loss and rehydration in anurans. **Phys. Zool.** 42:1-14.
- Currie, D. J. 1991. Energy and large-scale patterns of animal species and plant-species richness. **Am. Nat.** 137:27–49.
- Dejours, P., 1981. **Comparative Respiratory Physiology**, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam.
- Duellman, W.E. 1999a. Distribution patterns of amphibians in South America. In: **Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective**. Duellman W.E. (ed.), The John Hopkins University Press, Baltimore. pp. 255-328.
- Duellman, W.E. 1999b. Global distribution of amphibians: patterns, conservation, and future challenges. In: **Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective**. Duellman W.E. (ed.), The John Hopkins University Press, Baltimore. pp. 1-30.

- Fair, J. W. 1970. Comparative rates of rehydration of two species of toads, *Bufo boreas* and *Bufo punctatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 34:281–287.
- Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). **Cladistics** 18: 367–393.
- Faivovich, J.; Haddad, C.F.B.; Garcia, P.C.A.; Frost, D.R.; Campbell, J.A. & Wheeler, W.C., 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 294:1-240.
- Feder, M. E. & Burggren, W. W. 1992. **Environmental physiology of the amphibians**. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783–791
- Frost, D.R.; T. Grant; J. Faivovich; R.H. Bain; A. Haas; C.F.B. Haddad; R.O. De Sá; A.Channing; M.Willkinson; S.C Donnellan; C.J. Raxworthy; J.A. Campbell; B.L Blotto; P. Moler; R.C. Drewes; R.A. Nusbaum; J.D. Lynch; D.M. Green & W.C. Wheeler. 2006. The Amphibian Tree of Life. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.** 297: 1-370.
- Futuyma, D. J. 1998. **Evolutionary biology**. 3.<sup>a</sup> ed. New York: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 397-445pp.
- Gallardo, J.M. 1979. Composicion, distribuicion y origen de la herpetofauna chaquena. Pp. 299-307 in: The South American herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal. **Monogr. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas** 7:1-485.
- Garland, T., Jr., and A. R. Ives. 2000. Using the past to predict the present: confidence intervals for regression equations in phylogenetic comparative methods. **Am. Nat.** 155:346–364.
- Garland, T., Jr., and R. Díaz-Uriarte. 1999. Polytomies and phylogenetically independent contrasts: an examination of the bounded degrees of freedom approach. **Syst. Biol.** 48:547–558.
- Garland, T., Jr., P. H. Harvey, and A. R. Ives. 1992. Procedures for the analysis of comparative data using phylogenetically independent contrasts. **Syst. Biol.** 41:18–32.
- Gatten, R.E. 1987. Activity metabolism of anuran amphibians: tolerance to dehydration. **Physiol. Zool.** 60:576-585.
- Gehlbach, F. R., J. R. Kimmel, and W. A. Weems. 1969. Aggregations and body relations in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) from the Grand Canyon rims, Arizona. **Physiol. Zool.** 42:173-182.
- Geise, W. and 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.
- Geise, W. & K. E. Linsenmair. 1988. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. IV. Ecological significance of water economy with comments on thermoregulation and energy allocation. **Oecologia**. 77:327-338.
- Gorelick, D.A., Praetorius, J., Tsunenari, T., Nielsen, S., Agre, P., 2006. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. **BMC Biochemistry** 7, 14.
- Grafen, A. 1989. The phylogenetic regression. **Philos. Trans. Royal Soc. Lon.** B326:119-157.
- Guo, P., Hillyard, S.D., Fu, B.M., 2003. A two-barrier compartment model for volume flow across amphibian skin. **Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.** 285, R1384–R1394.
- Haddad, C.F.B. 1995. Comunicação em anuros. **Anais de Etologia**. 13:116-132.
- Hasegawa, T., Masaharu Suzuki, & S. Tanaka. 2005. Immunocytochemical studies on translocation of phosphorylated aquaporin-h2 protein in granular cells of the frog urinary bladder before and after stimulation with vasotocin. **Cell Tissue Res.** 322,407-515.
- Hasegawa, T., Tanii, H, Suzuki, M., Tanaka, S., 2003. Regulation of water absorption in the frog skins by two vasotocin- dependent water-channel Aquaporins, AQP-h2 and AQP-h3. **Endocrinology** 144(9):4087-4096.
- Hawkins, B. A., R. Field, H. V. Cornell, D. J. Currie, J. F. Guégan, D. M. Kaufman, J. T. Kerr, G. G. Mittelbach, T. Oberdorff, E. M. O'Brien, E. E. Porter, and J. R. G. Turner. 2003. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. **Ecology** 84:3105–3117.
- Hillman, S. S. 1892. The effects of in vivo and in vitro hyperosmolality on skeletal muscle performance in the amphibians *Rana pipiens* and *Scaphiopus couchii*. **Comp. Biochem. Physiol.** 73A:709-712.
- Hillman, S. S. 1894. Inotropic influence of dehydration and hyperosmolal solutions on amphibian cardiac muscle. **J. Comp. Physiol.** 154B:325-328.
- Hillman, S. S. 1978. The roles of oxygen delivery and electrolyte levels in the dehydrational death of *Xenopus laevis*. **J. Comp. Physiol.** 128B:169-175.



- Hillman, S. S. 1980. The effect of anemia on metabolic performance in the frog, *Rana pipiens*. **J. Exp. Zool.** 211:107-111.
- Hillman, S.S. 1987. Dehydrational effects on cardiovascular and metabolic capacity in two amphibians. **Physiol. Zool.** 60:608-613.
- Hillman, S.S. 1987. Dehydrational effects on cardiovascular and metabolic capacity in two amphibians. **Physiol. Zool.** 60:608-613.
- Hillman, S.S., P.C. Withers, & R.C. Drewes. 2000. Correlation of ventricle mass and dehydration tolerance in amphibians. **Herpetologica** 56:413-420.
- Hochachka, P.W. & G.N. Somero. 2002. **Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. Oxford University Press, New York. 466 pp.
- Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H. & Kuzmin, S. L. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature** 404, 752–755.
- Itoh, T., Rai, T., Kuwahara, M., Ko, S.B., Uchida, S., Sasaki, S., Ishibashi, K., 2005. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 330, 832–838.
- Jared, C., Antoniazzi, M. M., Navas, C. A., Katchburian, E., Freymuller, E., Tambourgi, D. V. and Rodrigues, M. T. 2005. Head co-ossification, phragmosis and defence in the casque-headed tree frog *Corythomantis greeningi*. **J. Zool. (Lond.)** 265, 1-8.
- Jetz, W. & Rahbek, C. 2002. Geographic range size and determinants of avian species richness. **Science** 297:1548–1551.
- Kobelt, F. and 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.
- Lee, A. K. and Mercer, E. H. 1967. Cocoon surrounding desert-dwelling frogs. **Science** 157, 87-88.
- Lillywhite H. B. 2006. Review: Water relations of tetrapod integument. **J. Exp. Biol.** 209:202-226
- Lillywhite H.B., A.K. Mittal, T.K. Garg, and N. Agrawal. 1997. Integumentary structure and its relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. **J. Zool. (Lond)** 243:675–687.
- Littleford, R. A. W. F. Keller, and N. W. Phillips. 1947. Studies on the vital limits of water loss in the plethodontid salamanders. **Ecology** 28:440-447.

- Main, A. R., and P. J. Bentley. 1964. Water relations of Australian burrowing frogs and tree frogs. **Ecology** 45:379-382.
- Martins, M. 1998. The frogs of the Ilha de Maracá. In Maracá: The biodiversity & environment of Amazonian Rainforest (W. Milliken & J. Ratter, eds). P-285-306.
- McClanahan L. L. and Baldwin R. 1969. Rate of water uptake through the integument of the desert toad, *Bufo punctatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 28:381–389.
- McClanahan, L. L., Ruibal, R. and Shoemaker, V. H. 1983. Rate of cocoon formation and its physiological correlates in a ceratophryd frog. **Physiol. Zool.** 56, 430-435.
- McClanahan, L. L., Shoemaker, V. H. and Ruibal, R. 1976. Structure and function of the cocoon of a ceratophryd frog. **Copeia** 1976, 176-185.
- McNab, B. K. 2002. **The Physiological Ecology of Vertebrates: A View From Energetics.** Cornell University Press, New York. 576 pp.
- Mittermeier, R.A., N. Myers, C.G. Mittermeier. 2000. Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Mexico City: CEMEX.
- Moore, F.R. and R.E. Gatten, Jr. 1989. Locomotor performance of hydrated, dehydrated and osmotically stressed anuran amphibians. **Herpetologica** 45:101-110.
- Moreira, G. & L. Barreto. 1996. Seasonal variation in nocturnal calling activity of savanna anuran community in central Brazil. **Amphibia- Reptilia** 18:49-57.
- Morellato, L. P. C.; D. C. Talora; A. Takahasi; C. C. Bencke; E. C. Romera; and V. B. Zipparro, 2000. Phenology of Atlantic Rain Forest Trees: A Comparative Study. **Biotropica** 32(4b):811-823.
- Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca, J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature.** 403: 853-858.
- Navas, C. A., Antoniazzi, M. M., Carvalho, J. E., Suzuki, H. and Jared, C. 2007. Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosus* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. **Comp. Biochem. Physiol.** 147:647-657.
- Navas, C. A., C. Jared, M. M. Antoniazzi. 2002. Water economy in the casque-headed tree-frog *Corythomantis greening* (Hylidae): role of behaviour, skin and skull skin co-ossification. **J. Zool.** 257:525-532.
- Navas, C.A. & F.R. Gomes. 2001. Time in captivity as a confounding variable in herpetological research: an example from the metabolic physiology of tree frogs (*Scinax*). **Herpetol. Rev.** 32:228-230.

- Niels J. W., A. L. Viborg. and S. D. Hillyard. 2007. Vascular aspects of water uptake mechanisms in the toad skin: Perfusion, diffusion, confusion. **Comp. Biochem. Physiol.** A148:55-63.
- Ogushi Y., Moshida H., Nakakura T., Suzuki M., Tanaka S. 2007. Immunocytochemical and Phylogenetic Analyses of an Arginine Vasotocin-Dependent Aquaporin, AQP-h2K, Specifically Expressed in the Kidney of the Tree Frog, *Hyla japonica*. **Endocrinology** 148 (12), 5891-5901.
- Oliveira-Filho, O. and Fontes M. A. L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil, and the influence of climate. **Biotropica** 32: 793-810.
- Orce, G., Castillo, G., Chanampa, Y., Bellomio, A., 2004. Permeability to water in a tight epithelium: possible modulating action of gap junctions. **Can. J. Physiol. Pharm.** 82, 417–421.
- Orme, C. D. L., R. G. Davies, M. Burgess, F. Eigenbrod, N. Pickup, V. A. Olson, A. J. Webster, T. Ding, P. C. Rasmussen, R. S. Ridgely, A. J. Stattersfield, P. M. Bennett, T. M. Blackburn, K. J. Gaston & I. P. F. Owens. 2005. Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. **Nature** 436:1016-1019.
- Pagel, M. D. 1992. A method for the analysis of comparative data. **J. Theor. Biol.** 156:431-442.
- Parsons, P.A. 1983. **The evolutionary biology of colonizing species**. Cambridge University Press, New York.
- Parsons, R.H.; V. McDevitt; V. Aggerwal; T. Le Blang; K. Manley; N. Kim; J. Lopez; A.A. Kenedy. 1993. Regulation of pelvic patch water flow in *Bufo marinus*: Role of bladder volume and ANG II. **Am. J. Physiol.** 264:R1260-R1265.
- Pinder A. W, K. B. Storey, and G. R. Ultsch. 1992. Estivation and Hibernation. In: Feder, M. E., Burggren, W. W. (eds) *Environmental Physiology of the Amphibians*, University of Chicago Press, Chicago, pp. 250-274.
- Pizo, M. A. and Oliveira, P. S. 2000. The Use of Fruits and Seeds by Ants in the Atlantic Forest of Southeast Brazil. **Biotropica** 32(4b): 851–861.
- Pough, F.H., W.E. Magnusson, M.J. Ryan, K.D. Wells, T.L. Taigen. 1992. **Behavioral energetics**. In: Feder, M. E., Burggren, W. W. (eds) **Environmental Physiology of the Amphibians**, University of Chicago Press, Chicago, pp. 395-436.
- Prates, I. and C.A. Navas. 2009. Cutaneous resistance to evaporative water loss in Brazilian *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from contrasting environments. **Copeia** 2009:618-622.

- Preest, M.R. and F.H. Pough. 1989. Interaction of temperature and hydration on locomotion of toads. **Funct. Ecol.** 3:693-699.
- Ratter, J.A., Ribeiro, J.F. & Bridgewater, S. 1998. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Ann. Bot.** 80:223-230.
- Ray, C. 1958. Vital limits and rates of desiccation in salamanders. **Ecology** 39:75-83.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In Cerrado Ambiente e Flora (S.M. Sano, & S.P. de Almeida, eds.). **EMBRAPA/CPAC**, Planaltina, D.F., p.89-186.
- Ribeiro, J.F. 1983. **Comparação da concentração de nutrientes na vegetação arbórea e nos solos de um cerrado e um cerradão no Distrito Federal, Brasil.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília - DF.
- Rogowitz, G. L., M. Cortes-Rivera, K. Nieves-Puigdoller. 1999. Water loss, cutaneous resistance, and effects of dehydration on locomotion of *Eleutherodactylus* frogs. **J. Comp. Physiol. B** 169: 179–186.
- Roth J.J. 1973. Vascular supply to the ventral pelvic region of anurans as related to water balance. **J. Morphol.** 140:443–460.
- Ruibal, R. and Hillman, S. S. 1981. Cocoon structure and function in the burrowing hylid frog, *Pternohyla fodiens*. **J. Herpetol.** 15, 403-408.
- Ruibal, R. and Shoemaker, V. H. 1984. Osteoderms in anurans. **J. Herpetol.** 18, 313-328.
- Seibert, E. A., Lillywhite, H. B. and Wassersug, R. J. 1974. Cranial ossification in frogs: relationship to rate of evaporative water loss. **Physiol. Zool.** 47, 261-265.
- Shwenk, K. & G.P. Wagner. 2001. Function and the evolution of phenotypic stability: Connecting patterns to process. **Am. Zool.** 41:552-563.
- Silva, J.M. & J.M. Bates, 2002. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a Tropical savanna hotspot. **BioScience.** 52:225-233.
- SOS Mata Atlântica & INPE. 1993. **Evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica.** Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo, Brasil.
- SOS Mata Atlântica. 1998. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1990-1995.** Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, Brasil.
- Spotila J.R., E.N. Berman. 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.

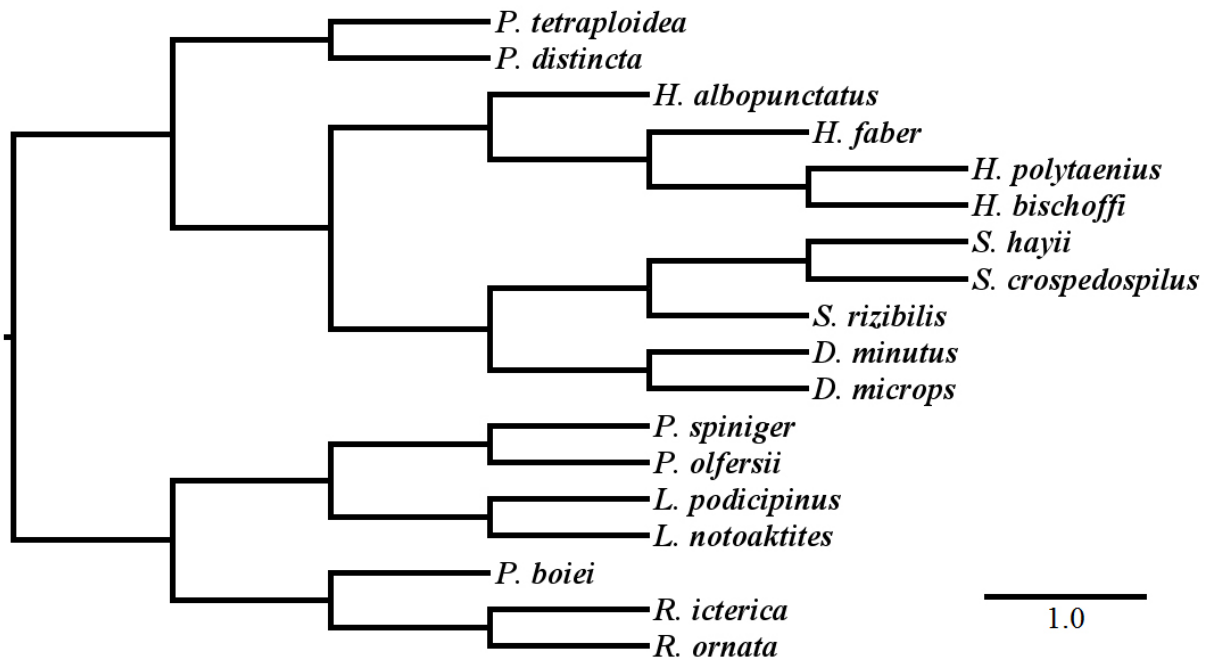
- Stefanski, M., R. E. Gatten Jr., and F. H. Pough. 1989. Activity metabolism of salamanders: tolerance to dehydration. **J. Herpetol.** 23:45-50.
- Strüssmann, C. 2000. **Herpetofauna.** In: **Fauna Silvestre da região do Rio Manso- MT.** Alho, C.J.R, ed. Edições Ibama, Brasília, DF. p-153-189.
- Stuart, 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.
- Suzuki M, Hasegawa T, Ogushi Y, Tanaka S. 2007. Amphibian aquaporins and adaptation to terrestrial environments: A Review. **Comp. Biochem. Physiol.** A148,72–81.
- Takata, K., Matsuzaki, T., Tajika, Y., 2004. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. **Prog. Histochem. Cytochem.** 39, 1–83.
- Tanii H, Hasegawa T., Hirakawa N., Suzuki M., Tanaka S. 2002 Molecular and Cellular Characterization of Water-Channel Protein, AQP-h3, Specifically Expressed in Frog Pelvic Skin. **J. Memb. Biol.** 188, 43-53.
- Thorson, T. B. & A. Svihla. 1943. Correlation of the habitats of amphibians with their ability to survive the loss of body water. **Ecology.** 24:374-381.
- Thorson, T.B. 1955. The relationship of water economy to terrestrial life in amphibians. **Physiol. Zool.** 36,100-116
- Titon Jr. B., C. A. Navas, J. Jim, and F. R. Gomes. 2010. Water balance and locomotor performance in three species of neotropical toads that differ in geographical distribution. **Comp. Biochem. Physiol.** A156:129–135.
- Toledo, R. C., C. Jared. 1993. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. **Comp. Biochem. Physiol.** A105:593–608.
- Viborg A. L. & P. Rosenkilde. 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. and S.D. Hillyard. 2005. Cutaneous blood flow and water absorption by dehydrated toads. **Physiol. Biochem. Zool.** 78, 394–404.
- Viborg, A.L., T. Wang, and S.D. Hillyard. 2006. Cardiovascular and behavioural changes during water absorption in toads, *Bufo alvarius* and *Bufo marinus*. **J. Exp. Biol.** 209, 834–844.
- Wagner, G.P. 1996. Homologies, natural kinds and the evolution of modularity. **Am. Zool.** 36:36-43.
- Walsh, R. P. D. 1996. **The climate.** In P. W. Richards (Ed.). **The tropical rain forest: an ecological study**, pp. 159–205. Cambridge University Press, Cambridge, England.

- Warburg M. R. 1965. Studies on the water economy of some Australian frogs. **Aust. J. Zool.** 13:317-330.
- Warburg, M.R. 1972. Water economy and thermal balance of Israeli and Australian amphibia from xeric habitats. **Symp. Zool. Sot. Lond.** 31:79-111.
- Whittaker, R. J., Nogues-Bravo, D. & Araujo, M. B. 2007. Geographical gradients of species richness: a test of the water-energy conjecture of Hawkins et al. (2003) using European data for five taxa. **Glob. Ecol. Biogeogr.** 16:76–89.
- Withers P.C., S.S. Hillman, R.C. Drewes, and O.M. Sokal. 1982a. Water loss and nitrogen excretion in sharpnosed reed frogs (*Hyperolius nasutus*. Anura, Hyperoliidae). **J. Exp. Biol.** 97:335-343.
- Withers, P. C. 1995. Cocoon formation and the structure in the aestivating Australian desert frogs, *Neobatrachus* and *Cyclorana*. **Aust. J. Zool.** 43:429-441.
- Withers, P. C. 1998. Evaporative water loss and the role of cocoon formation in Australian frogs. **Aust. J. Zool.** 46, 405-418.
- Withers, P.C. and Hillman, S.S. 1988. A steady-state model of maximal oxygen and carbon dioxide transport in anuran amphibians **J. Appl. Physiol.** 64:860-868.
- Withers, P.C. and Hillman, S.S. 2001. Allometric and ecological relationships of ventricle and liver mass in anuran amphibians. **Funct. Ecol.** 15:60-69.
- Withers, P.C., S.S. Hillman, R.C. Drewes. 1984. Evaporative water loss and skin lipids of anuran amphibians. **J. Exp. Zool.** 232:11-17.
- Word, J. M. and Hillman, S. S. 2005. Osmotically Absorbed Water Preferentially Enters the Cutaneous Capillaries of the Pelvic Patch in the Toad *Bufo marinus*. **Physiol. Biochem. Zool.** 78(1):40–47
- Wygoda M.L. 1984. Low cutaneous evaporative water loss in arboreal frogs. **Physiol Zool** 57:329–337.
- Wygoda M.L. 1988. Adaptive control of water loss resistance in na arboreal frog. **Herpetol** 44: 251-257
- Young, J. E., K. A. Christian, S. Donnellan, C. R. Tracy, D. Parry. (2005). Comparative Analysis of Cutaneous Evaporative Water Loss in Frogs Demonstrates Correlation with Ecological Habits. **Physiol. Biochem. Zool.** 78(5):847–856.
- Zimmerman, B.L. & B.L. Birregaard. 1986. Relevance of the equilibrium theory of island biogeography and species-area relations to conservation with a case from Amazonia. **J. Biogeogr.** 13:133-143.

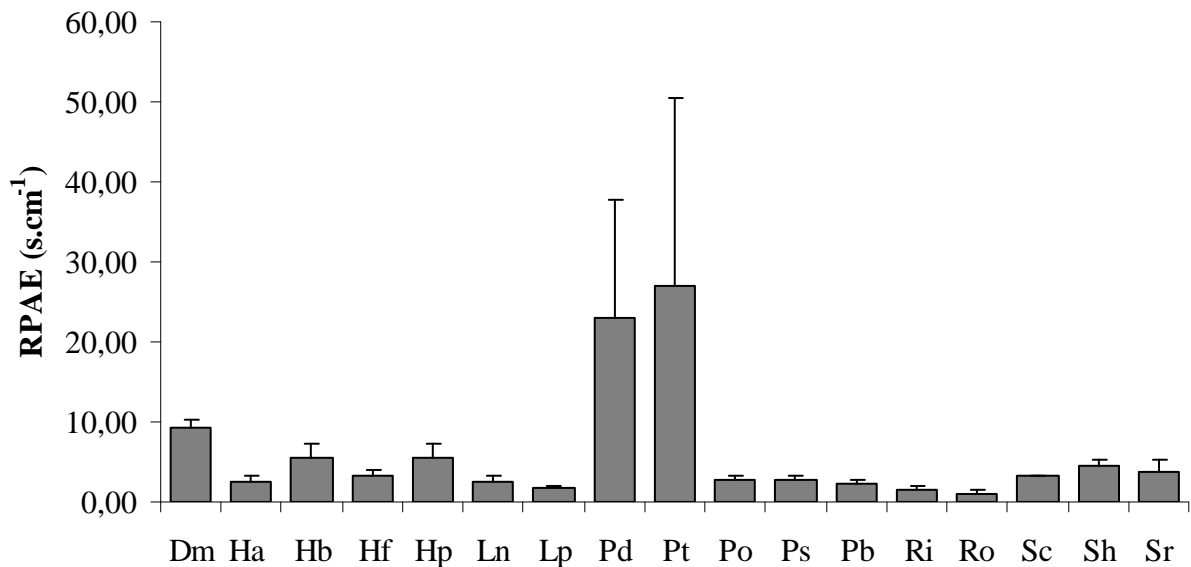


## *VI - Figuras e Tabelas*

---

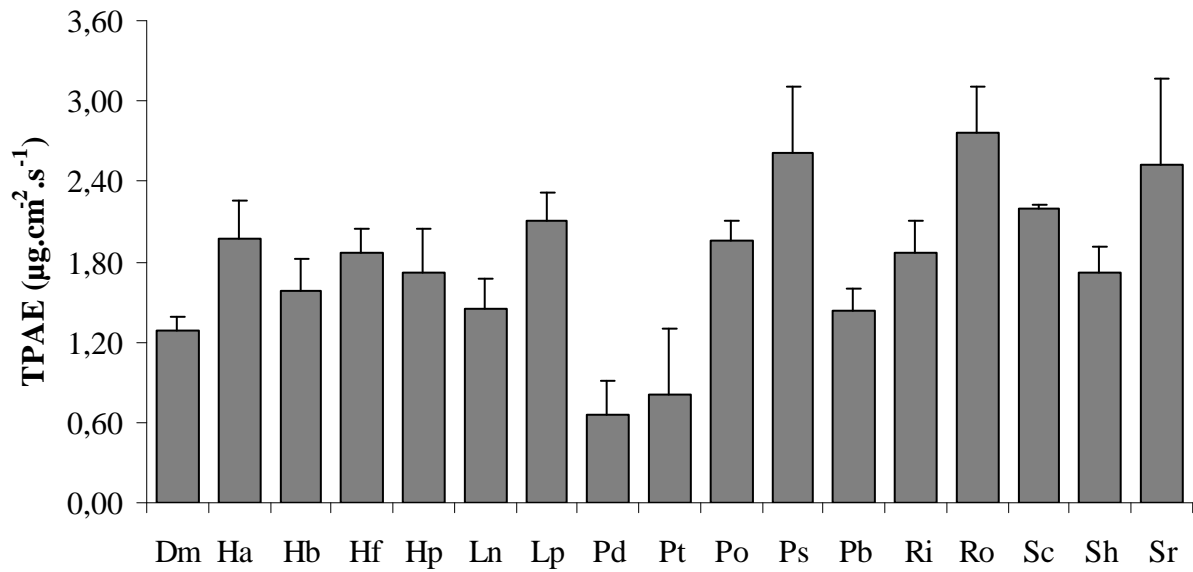


**Figura 1:** Topologia obtida a partir de hipóteses disponíveis na literatura (Faivovich 2002; Faivovich *et al.* 2005; Frost *et al.* 2006) e utilizada para o cálculo do sinal filogenético, contrastes independentes e simulações da evolução das variáveis estudadas por movimento Browniano. Os braços da filogenia foram arbitrariamente estabelecidos com comprimento constante.

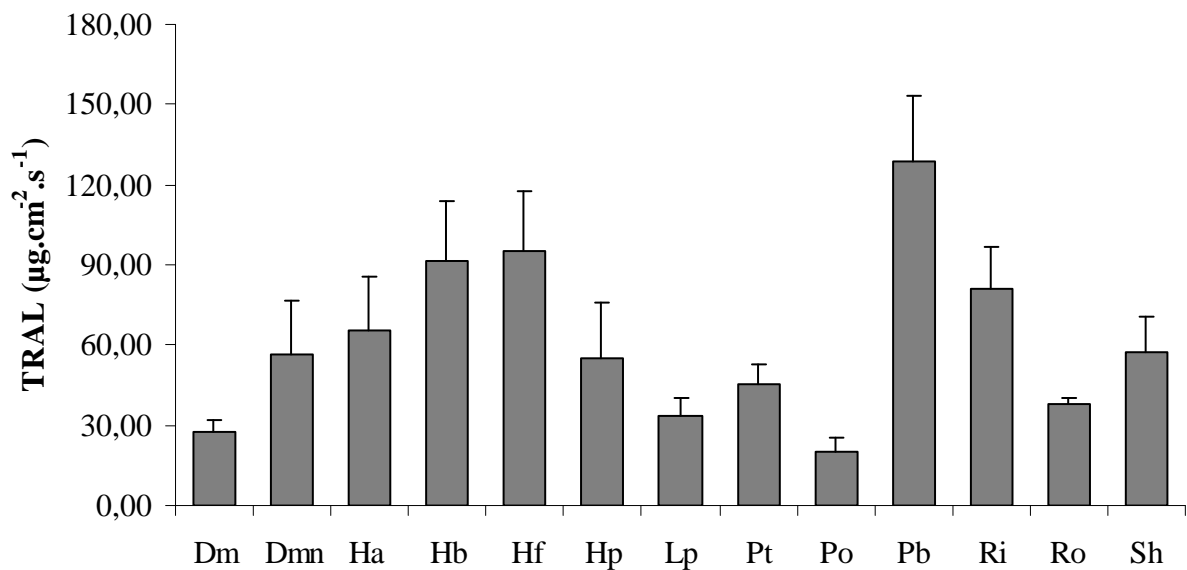


**Figura 2:** Média  $\pm$  desvio padrão das resistências à perda de água por evaporação para Dm: *Dendropsophus microps*, Ha: *Hypsiboas albopuctatus*, Hb: *Hypsiboas bischoffi*, Hf: *Hypsiboas faber*, Hp: *Hypsiboas polytaenius*, Ln: *Leptodactylus notoaktites*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Pd: *Phyllomedusa distincta*, Pt: *Phyllomedusa tetraploidea*, Po: *Physalaemus olfersii*, Ps: *Physalaemus spiniger*, Pb: *Proceratophrys boiei*, Ri: *Rhinella icterica*, Ro: *Rhinella ornata*, Sc: *Scinax crosopedospilus*, Sh: *Scinax hayii*, Sr: *Scinax rizibilis*.

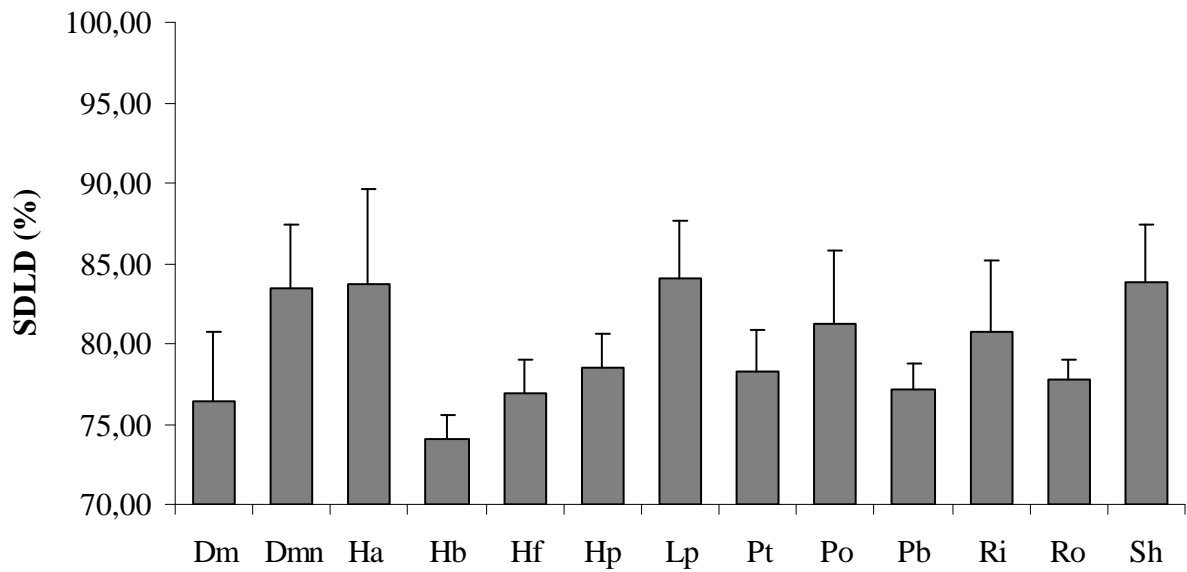




**Figura 3:** Média ± desvio padrão das taxas de perda de água por evaporação para Dm: *Dendropsophus microps*, Ha: *Hypsiboas albopunctatus*, Hb: *Hypsiboas bischoffi*, Hf: *Hypsiboas faber*, Hp: *Hypsiboas polytaenius*, Ln: *Leptodactylus notoaktites*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Pd: *Phyllomedusa distincta*, Pt: *Phyllomedusa tetraploidea*, Po: *Physalaemus olfersii*, Ps: *Physalaemus spiniger*, Pb: *Proceratophrys boiei*, Ri: *Rhinella icterica*, Ro: *Rhinella ornata*, Sc: *Scinax crospedospilus*, Sh: *Scinax hayii*, Sr: *Scinax rizibilis*.



**Figura 4:** Média ± desvio padrão das taxas de reidratação a partir de água livre para Dm: *Dendropsophus microps*, Dmn: *Dendropsophus minutus*, Ha: *Hypsiboas albopunctatus*, Hb: *Hypsiboas bischoffi*, Hf: *Hypsiboas faber*, Hp: *Hypsiboas polytaenius*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Pt: *Phyllomedusa tetraploidea*, Po: *Physalaemus olfersii*, Pb: *Proceratophrys boiei*, Ri: *Rhinella icterica*, Ro: *Rhinella ornata*, Sh: *Scinax hayii*.



**Figura 5:** Média  $\pm$  desvio padrão da sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, definido como nível de hidratação cujo desempenho locomotor atinge 70% do máximo, para Dm: *Dendropsophus microps*, Dmn: *Dendropsophus minutus*, Ha: *Hypsiboas albopunctatus*, Hb: *Hypsiboas bischoffi*, Hf: *Hypsiboas faber*, Hp: *Hypsiboas polytaenius*, Lp: *Leptodactylus podicipinus*, Pt: *Phyllomedusa tetraploidea*, Po: *Physalaemus olfersii*, Pb: *Proceratophrys boiei*, Ri: *Rhinella icterica*, Ro: *Rhinella ornata*, Sh: *Scinax hayii*.

**Tabela 1:** Estatística descritiva trazendo média  $\pm$  desvio padrão da massa corpórea, resistência à perda de água por evaporação, taxa de perda de água por evaporação, taxa de reidratação a partir de água livre e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação para cada espécie, bem como as famílias às quais pertencem.

Família	Espécie	Massa (g)	RPAE (s.cm <sup>-1</sup> )	TPAE (µg.cm <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	TRAL (µg.cm <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	SDLD
Bufonidae	<i>Rhinella icterica</i>	156,10 $\pm$ 31,24	1,46 $\pm$ 0,46	1,87 $\pm$ 0,23	80,80 $\pm$ 15,94	80,70 $\pm$ 4,53
Bufonidae	<i>Rhinella ornata</i>	20,24 $\pm$ 4,01	1,07 $\pm$ 0,36	2,77 $\pm$ 0,33	38,14 $\pm$ 1,80	77,80 $\pm$ 1,27
Cycloramphidae	<i>Proceratophrys boiei</i>	11,96 $\pm$ 1,87	2,35 $\pm$ 0,39	1,43 $\pm$ 0,17	128,36 $\pm$ 25,17	77,10 $\pm$ 1,65
Hylidae	<i>Dendropsophus microps</i>	0,55 $\pm$ 0,03	9,23 $\pm$ 0,93	1,28 $\pm$ 0,11	27,80 $\pm$ 4,38	76,46 $\pm$ 4,29
Hylidae	<i>Dendropsophus minutus</i>	0,50 $\pm$ 0,03			56,59 $\pm$ 19,82	83,49 $\pm$ 3,95
Hylidae	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	5,86 $\pm$ 0,91	2,54 $\pm$ 0,72	1,97 $\pm$ 0,29	65,62 $\pm$ 20,04	83,73 $\pm$ 5,84
Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	3,50 $\pm$ 0,49	5,60 $\pm$ 1,57	1,58 $\pm$ 0,24	91,61 $\pm$ 22,10	74,03 $\pm$ 1,56
Hylidae	<i>Hypsiboas faber</i>	38,25 $\pm$ 5,09	3,34 $\pm$ 0,63	1,87 $\pm$ 0,18	95,42 $\pm$ 22,10	76,88 $\pm$ 2,09
Hylidae	<i>Hypsiboas polytaeniatus</i>	1,12 $\pm$ 0,11	5,46 $\pm$ 1,86	1,72 $\pm$ 0,33	55,23 $\pm$ 20,50	78,54 $\pm$ 2,09
Hylidae	<i>Phyllomedusa distincta</i>	7,45 $\pm$ 1,55	23,04 $\pm$ 14,66	0,65 $\pm$ 0,26		
Hylidae	<i>Phyllomedusa tetraploidea</i>	14,36 $\pm$ 1,40	26,89 $\pm$ 23,58	0,80 $\pm$ 0,50	45,51 $\pm$ 7,52	78,33 $\pm$ 2,48
Hylidae	<i>Scinax crospedospilus</i>	1,25 $\pm$ 0,01	3,13 $\pm$ 0,01	2,19 $\pm$ 0,04		
Hylidae	<i>Scinax hayii</i>	3,51 $\pm$ 0,41	4,42 $\pm$ 0,74	1,72 $\pm$ 0,19	57,45 $\pm$ 12,84	83,82 $\pm$ 3,56
Hylidae	<i>Scinax rizibilis</i>	0,72 $\pm$ 0,07	3,76 $\pm$ 1,44	2,53 $\pm$ 0,64		
Leiuperidae	<i>Phyllomedusa olfersii</i>	2,96 $\pm$ 0,65	2,85 $\pm$ 0,46	1,95 $\pm$ 0,16	20,41 $\pm$ 4,70	81,18 $\pm$ 4,60
Leiuperidae	<i>Phyllomedusa spiniger</i>	0,50 $\pm$ 0,08	2,63 $\pm$ 0,62	2,61 $\pm$ 0,50		
Leptodactylidae	<i>Leptodactylus notoaktites</i>	12,09 $\pm$ 1,13	2,53 $\pm$ 0,60	1,45 $\pm$ 0,22		
Leptodactylidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	4,46 $\pm$ 1,57	1,70 $\pm$ 0,35	2,11 $\pm$ 0,20	33,26 $\pm$ 6,74	84,08 $\pm$ 3,52

**RPAE:** Resistência à perda de água por evaporação; **TPAE:** Taxa de perda de água por evaporação; **TRAL:** Taxa de reidratação à partir de água livre; **SDLD:** Sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação, definido como nível de hidratação cujo desempenho locomotor atinge 70% do máximo.

**Tabela 2:** Probabilidade de presença de sinal filogenético e resultado da estatística *K* para as variáveis estudadas.

Variável	N	K	P
Massa corpórea	18	0,826	<b>0,010</b>
Resistência à perda de água por evaporação	17	1,223	<b>0,001</b>
Taxa de perda de água por evaporação	17	1,035	<b>0,017</b>
Taxa de reidratação a partir de água livre	13	0,542	0,237
Sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação	13	0,457	0,437

**N:** Número de espécies utilizadas na elaboração de cada árvore; **K:** valores da estatística *K* aplicada; **P:** Probabilidade de sinal filogenético, onde resultados estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ) estão discriminados em negrito.

**Tabela 3:** Fatores retidos na análise de componentes principais das características associadas ao balanço hídrico de espécies de anuros do Estado de São Paulo.

Variáveis	Componente 1	Componente 2
Massa corpórea	0	0,534
Resistência à perda de água por evaporação	-0,372	-0,11
Taxa de perda de água por evaporação	0,385	-0,089
Taxa de reidratação a partir de água livre	-0,052	0,546
Sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação	0,34	-0,055
% Total da variância	49,77	33,21

**Tabela 4:** Valores de *F* obtidos da ANOVA e percentil 95.º dos valores de *F* de mil simulações de evolução Browniana ao longo da filogenia das variáveis: massa corpórea, resistência à perda de água por evaporação e taxa de perda de água por evaporação para três categorias de hábito (arborícola, terrícola e criptozóico) e duas categorias de habitat (Mata Atlântica e Cerrado).

	Hábito			Hábitat		
	Massa	RPAE	TPAE	Massa	RPAE	TPAE
<b><i>F</i> (95.º percentil)</b>	19,548	20,333	19,611	3,885	3,802	4,019
<b><i>F</i> (real)</b>	3,71	6,577	1,185	1,429	0,13	0,153

**RPAE:** Resistência à perda de água por evaporação; **TPAE:** Taxa de perda de água por evaporação.

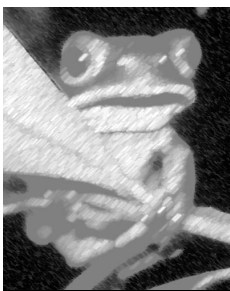
**Tabela 5:** Resultados da ANOVA das variáveis: taxa de reidratação a partir de água livre e sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação para três categorias de hábito (arborícola, terrícola e criptozóico) e duas categorias de habitat (Mata Atlântica e Cerrado).

Fonte da variação	Variável	SQ	GL	QM	F	P
Hábito	TRAL	0,051	2	0,026	0,422	0,668
	SDLD	0,000	2	0,000	0,276	0,765
Hábitat	TRAL	0,006	1	0,006	0,099	0,759
	SDLD	0,001	1	0,001	2,217	0,167

**TRAL:** Taxa de reidratação a partir de água livre; **SDLD:** Sensibilidade do desempenho locomotor à desidratação; **SQ:** soma dos quadrados; **GL:** Graus de liberdade **QM:** Quadrado médio.

**Tabela 6:** Hábitat, hábito e resistência à perda de água por evaporação de espécies consideradas à prova de água e espécies com resistência moderada.

Espécie	Hábitat	Hábito	Resistência (s.cm <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Agalychnis annae</i>	México	Arborícola	10	Wygoda 1984
<i>Litoria bicolor</i>		Arborícola	47,6 - 79,7	Young <i>et al.</i> 2005
<i>L. caerulea</i>		Arborícola	13,2 - 15,2	Young <i>et al.</i> 2005
<i>L. coplandi</i>		Terrícola	9,6	Young <i>et al.</i> 2005
<i>L. gracilentia</i>	México	Arborícola	118	Withers <i>et al.</i> 1984
<i>L. gilleni</i>		Arborícola	11,5	Young <i>et al.</i> 2005
<i>L. rothi</i>		Arborícola	15,8 - 16,4	Young <i>et al.</i> 2005
<i>L. rubella</i>		Arborícola	10,5 - 14,2	Young <i>et al.</i> 2005
<i>Pachymedusa dacnicolor</i>	Xérico	Arborícola	14	Wygoda 1984
<i>Phyllomedusa azurea</i>	Xérico	Arborícola	242	Withers <i>et al.</i> 1984
<i>P. hypochondriallis</i>	Xérico	Arborícola	364	Wygoda 1984
<i>P. iherengi</i>	Xérico	Arborícola	277	Wygoda 1984
<i>P. pailoma</i>	Xérico	Arborícola	336	Wygoda 1984
<i>P. sauvagei</i>	Xérico	Arborícola	206	Wygoda 1984
<i>Hyperolius argus</i>		Semi-Arborícola	24,5	Withers <i>et al.</i> 1984
<i>H. kivuensis</i>		Semi-Arborícola	73,5	Withers <i>et al.</i> 1984
<i>H. nasutus</i>	México	Semi-Arborícola	96 - 257	Withers <i>et al.</i> 1982
<i>H. pusillus</i>		Semi-Arborícola	34,2	Withers <i>et al.</i> 1984
<i>H. tuberilinguis</i>		Semi-Arborícola	29,2	Withers <i>et al.</i> 1984
<i>Chiromantis petersi</i>	Xérico	Arborícola	347	Withers <i>et al.</i> 1984
<i>C. rufescens</i>	México	Arborícola	404	Withers <i>et al.</i> 1984



## *VII - Anexos*

---



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **62/08-CEEA**, sobre "*Balanço hídrico e desempenho locomotor em espécies de anuros de mata atlântica e cerrado*", sob a responsabilidade de **FERNANDO RIBEIRO GOMES**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado em 11/11/2008 "*Ad referendum*" da **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA).

Botucatu, 27 de novembro de 2008.

  
Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**  
Presidente - CEEA

  
**NADIA JOVÊNCIO COTRIM**  
Secretária - CEEA

Instituto de Biociências – Diretoria Técnica Acadêmica  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil  
Tel 14 3811 6013/6014 fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibb.unesp.br

**Anexo1:** Certificado do comitê de ética do projeto: "Balanço hídrico e desempenho locomotor em espécies de anuros de Mata Atlântica e Cerrado."



**Universidade Estadual Paulista**  
**Instituto de Biociências**  
*CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA*  
*EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL*

Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP fone (014) 38116013 fax (014)38113744

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007/06-CEEA, sobre “*Fragmentação das florestas, distribuição geográfica e evolução fisiológica em anuros neotropicais*”, sob a responsabilidade de **FERNANDO RIBEIRO GOMES**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)*, em reunião de 06/04/06.

Botucatu, 07 de abril de 2006.

Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS GANEO DE MELLO  
Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM  
Secretária - CEEA

**Anexo2:** Certificado do comitê de ética do projeto Jovem Pesquisador: “Fragmentação das florestas, distribuição geográfica e evolução fisiológica em anuros neotropicais.”