

4.7 TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS TERMO-FISIOLÓGICOS EN ANFIBIOS

Eduardo Sanabria^{1,2,4}, Lorena Quiroga^{1,4}, Luciana Gordillo^{1,4}, M. Gabriela Perotti^{3,4} & Marcelo Bonino^{3,4}

¹ Instituto de Ciencias Básicas, Facultad de Filosofía Humanidades y Artes, Universidad Nacional de San Juan, San Juan, Argentina.

² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo, San Juan, Argentina.

³ Laboratorio de Ecología, Biología Evolutiva y Comportamiento de Herpetozoos, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), CONICET-UNCOMA, Bariloche, Río Negro, Argentina.

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290 (C1425FQB), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

La importancia de medir la temperatura corporal

Los organismos ectotermos están fuertemente influenciados por su ambiente térmico, ya que la transferencia de calor entre el organismo y el medio se realiza a través de la superficie de la piel por mecanismos de radiación, convección, conducción y evaporación⁽¹⁻³⁾. Los primeros tres dependen del gradiente térmico que existe entre la piel y el ambiente, en cambio la pérdida de calor por evapotranspiración sólo depende de la presión de vapor que existe entre la piel y el ambiente⁽⁴⁾. La regulación de la temperatura en animales ectotermos, como así también la amplitud de su rango térmico⁽⁵⁾, limitan y modifican sus funciones fisiológicas y comportamentales.

Para aquellos animales que presentan como estrategia principal de ganancia energética la heliotermia, tiene especial importancia el patrón y diseño de colores que estos poseen, ya que son capaces de intercambiar calor con el medio, absorbiendo y reflejando la luz solar, manteniendo así el balance térmico requerido^(5,6). Por otro lado, muchos ectotermos termorregulan moviéndose entre distintos tipos de microhábitats durante el día y la noche, ajustando de esta manera su temperatura corporal y manteniéndose en un rango óptimo de temperatura^(5,7-10). Por ejemplo, la rana *Lithobates catesbeiana*, presenta un mecanismo termorregulador en el cual modifica su posición dentro de los cuerpos de agua, moviéndose desde las orillas (aguas poco profundas) hacia el centro de la laguna (aguas de mayor profundidad), a medida que transcurre la noche y la temperatura disminuye⁽¹¹⁾. Este comportamiento, se debe a que el recurso energético varía en cantidad y calidad continuamente en el tiempo y espacio⁽¹²⁾. Asimismo, el beneficio de mantener una temperatura óptima está limitado por los costos metabólicos que demandaría seleccionar los diferentes ambientes térmicos⁽¹³⁾.

La intensidad de la termorregulación puede conceptualizarse como un continuo de estrategias que van desde la regulación activa de la temperatura corporal dentro un rango preciso (especies termorreguladoras), hasta especies que obtienen pasivamente la temperatura del ambiente (termoconformes). La diferencia entre ambas estrategias radica en los costos y beneficios que demanda la termorregulación⁽¹⁴⁾, donde el costo más evidente es el tiempo invertido. La estimación del grado en que las especies termorregulan se realiza mediante el cálculo de índices que integran distintas variables, como las temperaturas ofrecidas por el ambiente, el rango de temperaturas corporales en el campo y el rango de temperaturas preferidas por los individuos⁽¹⁵⁾.

Las temperaturas ofrecidas por un ambiente a microescala corresponden a la distribución nula de las temperaturas que los animales no termorreguladores podrían experimentar, y suelen tomarse con modelos que imitan las

características físicas (como tamaño y conductividad) de la especie en estudio⁽¹⁶⁾. Por otra parte, la temperatura selecta o temperatura preferida⁽¹⁷⁾, la cual se obtiene bajo condiciones de laboratorio, es aquella que los individuos seleccionan sin que existan las restricciones impuestas por el ambiente, y que en muchos casos no se aproxima a la que se obtiene en los registros de campo. La diferencia entre las temperaturas selectas en el laboratorio y las temperaturas registradas en el campo, pueden deberse a que en el laboratorio los costos externos que limitan la termorregulación no están presentes⁽¹⁸⁾. Además, los animales de vida nocturna poseen temperaturas de actividad más bajas que las que se obtienen generalmente en el laboratorio. Este desbalance entre las temperaturas selectas y de campo puede afectar potencialmente el escape de predadores, alimentación, entre otros^(5,10).

En anfibios, la termorregulación es principalmente conductual ya que hasta el momento no se ha demostrado la existencia de mecanismos fisiológicos que les permiten generar calor suficiente para elevar su temperatura corporal por encima de la del ambiente⁽¹⁹⁾. Desde el punto de vista ecológico, la selección del microhábitat puede influir en los procesos fisiológicos y en la dinámica de las poblaciones⁽²⁰⁾. Por lo tanto, uno de los factores ecológicos más importantes que modulan la termorregulación en anfibios es la selección del microhábitat, ya que todo hábitat está formado por un mosaico espacial y temporal de factores bióticos y abióticos en estrecha relación; y debido a esta heterogeneidad ambiental, la ubicación exacta de un organismo determina su eficacia biológica inmediata⁽²¹⁾. En general, se considera que los ambientes terrestres son térmicamente más heterogéneos^(22,23). Los anfibios, según las etapas de su ciclo de vida, se encuentran ocupando/habitando, tanto ambientes terrestres como acuáticos. Estos ambientes difieren, por ejemplo, los ambientes acuáticos presentan menor heterogeneidad térmica a escalas espaciales pequeñas, respecto a los ambientes terrestres⁽²⁴⁾, lo cual puede limitar la capacidad de termorregular de los organismos que allí viven. Por un lado, los animales pueden evitar activamente las temperaturas extremas (por ejemplo buscando refugios térmicos), incluyendo en esta categoría a gran número de pequeños mamíferos, reptiles, anfibios e insectos. Por otro lado, los animales pueden resistir las temperaturas impuestas por el ambiente a través de distintos mecanismos, tales como la dormancia diaria o estacional que permite resistir temperaturas adversas y disminuir la tasa de deshidratación⁽²⁵⁾. En este marco, las preguntas que podemos abordar desde la fisiología térmica son muy amplias, por lo tanto, en el presente compendio intentaremos mostrar las técnicas metodológicas más utilizadas para responder algunas preguntas.

Técnicas comúnmente usadas para determinar parámetros termo-fisiológicos:

- Medición de la temperatura corporal de las especies en estudio
- Relevamiento de la temperatura ambiental a microescala (temperaturas operativas)
- Registro de los extremos térmicos de las especies en estudio
- Determinación de la temperatura seleccionada de las especies en estudio
- Técnicas para conocer la temperatura óptima y sus diferentes parámetros

4.7.1 Técnicas utilizadas para la medición de la temperatura corporal

4.7.1a Obtención de la temperatura corporal de manera directa

Muchos estudios clásicos tienen como denominador común la obtención de la temperatura corporal de los anfibios durante su actividad^(26,27). Los instrumentos utilizados son los termómetros de mercurio (**Figura 4.6.1A**), sin embargo, en la actualidad es más común el empleo de los termómetros electrónicos con una termocupla (**Figura 4.7.1B**). En algunos casos, también se pueden utilizar termómetros infrarrojos (**Figura 4.7.1C**), que no son de contacto directo.

Cuando se trata de anfibios adultos, para la obtención de temperatura corporal durante el periodo de actividad debemos tener en cuenta varias consideraciones. Que el proceso debe realizarse de manera rápida, tomando a los animales por la cabeza, minimizando de este modo el contacto y la transferencia de calor desde el operador al individuo, y descartando las mediciones de animales pequeños y de animales manipulados de manera prolongada. Se debe insertar el bulbo del termómetro de mercurio o la termocupla del termómetro electrónico en el interior de la cloaca del animal, lo cual varía de acuerdo al tamaño del animal y por convención se introduce una porción de la termocupla correspondiente a un 10% del largo hocico-cloaca. Luego debemos esperar que la lectura se estabilice y registrar la temperatura corporal. Este dato, es considerado la temperatura corporal de actividad⁽²⁸⁻³¹⁾.

Las mediciones con termómetros infrarrojos (de no contacto), son comúnmente usadas en investigaciones de laboratorio y campo^(30,32,33). Es importante recalcar que antes de tomar los datos con termómetros infrarrojos debemos calibrar la medición, ya que lo que deseamos medir es la temperatura del cuerpo y no la de la piel. Para ello, se debe realizar un modelo lineal entre los valores de la temperatura de la cloaca y los de la piel para luego corregir



Figura 4.7.1. Termómetros comúnmente usados para registrar la temperatura corporal. A) Termómetro clásico de mercurio o alcohol. B) termómetro electrónico con termocupla, y C) termómetro infrarrojo el cual no necesita hacer contacto directo con el individuo para registrar la temperatura. Foto: E. Sanabria.

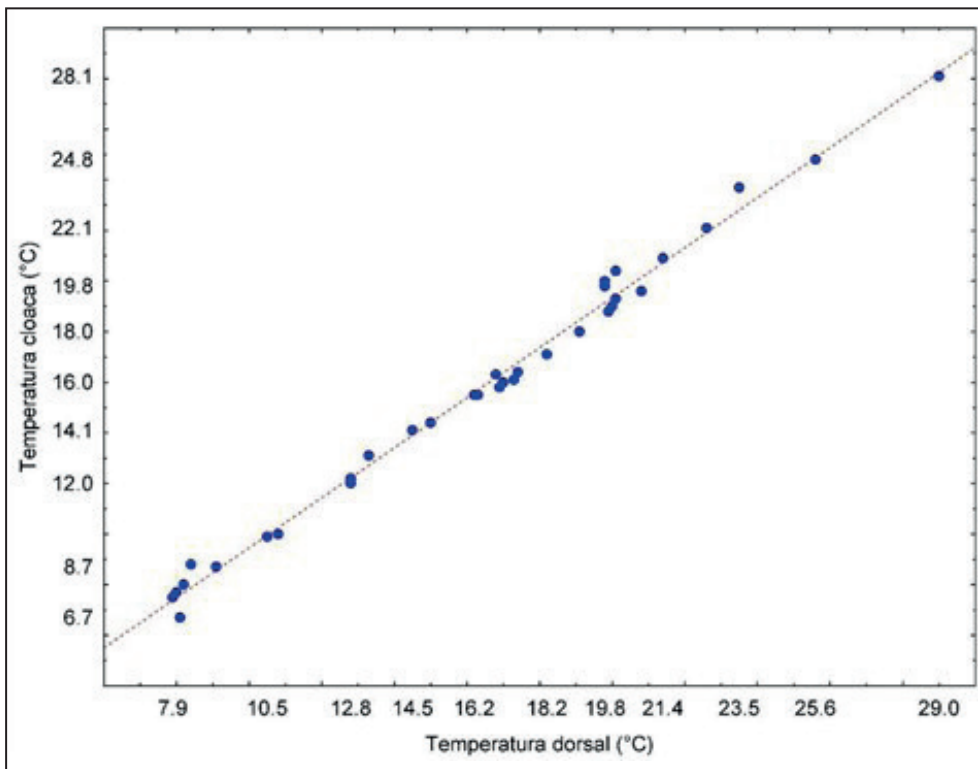


Figura 4.7.2. Calibración clásica de un termómetro infrarrojo de no contacto para estimar la temperatura de la cloaca de los sapos estudiados. El modelo matemático resultante es $\text{Temperatura de cloaca} = -0.42 + 0.98 \times \text{temperatura dorsal}^{(34)}$.

las mediciones (**Figura 4.7.2**). Deben seleccionarse algunos individuos de la especie a estudiar y medirse en ellos, simultáneamente la temperatura de la piel dorsal con un termómetro infrarrojo y la temperatura de la cloaca con un termómetro de mercurio o electrónico con termocupla. Luego se repite la operación bajo diferentes condiciones: si la especie en estudio es diurna los individuos se exponen al sol y a la sombra, con viento y sin viento (éste puede ser artificial), en lugares húmedos y secos, etc. Con estos datos se construye una regresión lineal que ajustará los valores de la temperatura de la piel a la de la cloaca⁽³⁴⁾. Este método es menos invasivo y apropiado para animales pequeños ya que evita el contacto y manipulación por parte del investigador, disminuyendo el error en las lecturas por efecto de transferencia de calor⁽³⁵⁾.

Es importante tener en cuenta que los termómetros infrarrojos tienen una relación distancia-superficie que debemos considerar al momento de medir la temperatura. Estos termómetros no establecen una medida lineal, es decir, mientras más alejamos el termómetro de la superficie a la cual deseamos medir la temperatura, la lectura obtenida será mayor (**Figura 4.7.3**).

Por último, existen cámaras térmicas, que pueden ser de video o fotográficas. Las más conocidas son de la marca comercial FLIR®, que nos brindan una imagen con escalas de colores donde a cada pixel de la imagen se le asigna un valor de temperatura (**Figura 4.7.4**). Es importante tener en cuenta que, dependiendo del objetivo de nuestro estudio, tenemos que elegir el número adecuado de pixeles que posee la cámara térmica, ya que esto nos dará una mejor resolución de los datos a la hora de analizarlos. Es evidente que a medida que las características del equipo implican un incremento en el número de pixeles, el coste de estos instrumentos aumenta exponencialmente.

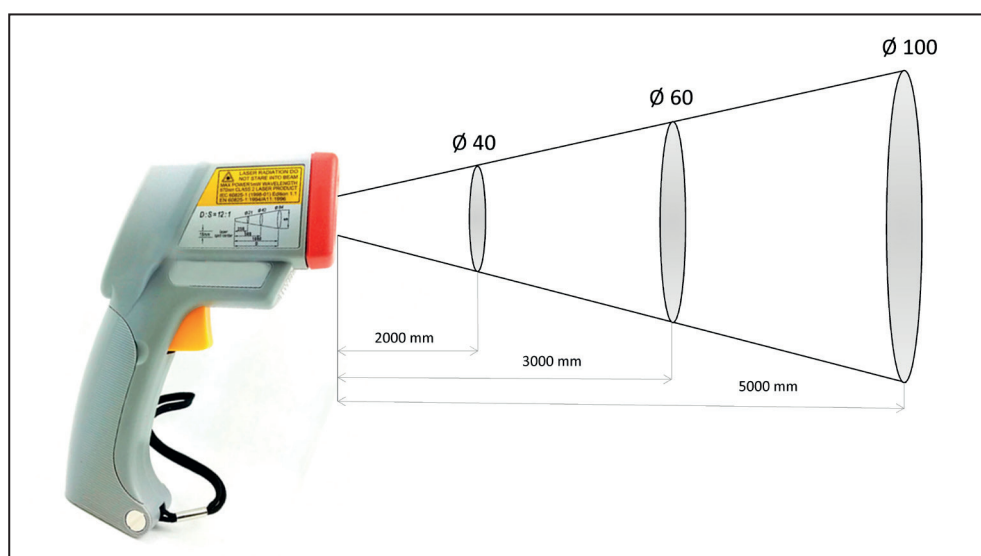


Figura 4.7.3. En esta figura podemos observar la relación entre la superficie de medición y la distancia al objeto a medir. Cada equipo tiene en sus especificaciones la relación de medición en sus características de fábrica. Las más típicas son 6:1 y 12:1. Gráfico: E. Sanabria.

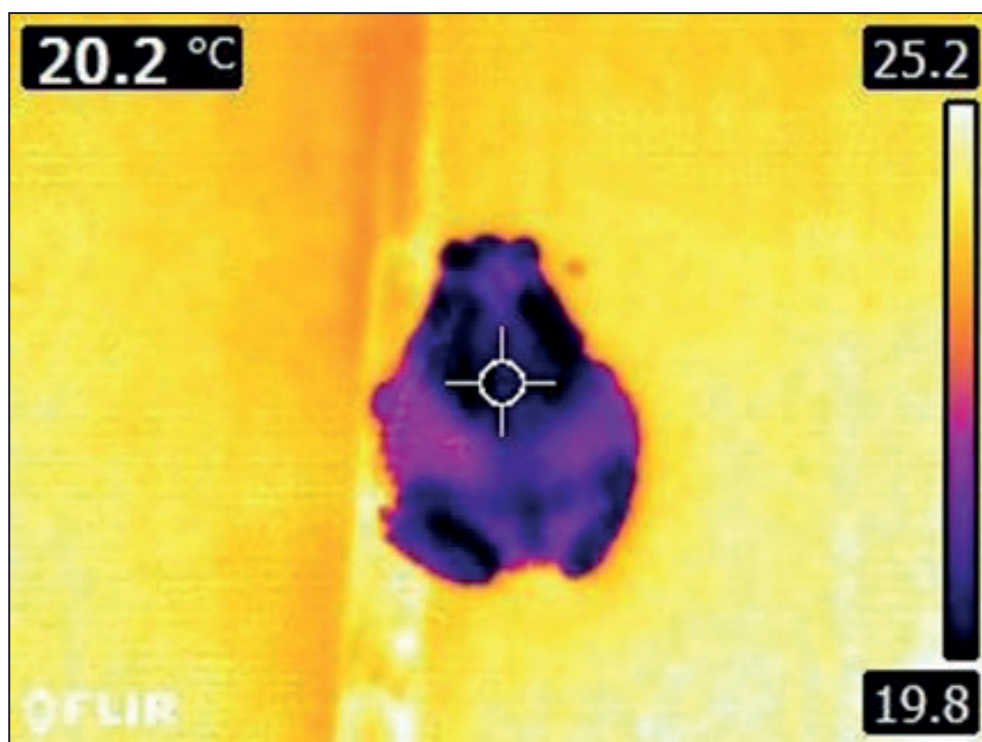


Figura 4.7.4. Ejemplo de una imagen térmica tomada con una cámara térmica FLIR®. Individuo de *Rhinella arenarum* durante la actividad nocturna, donde se puede observar que está notablemente más frío que el sustrato donde se encuentra. La barra a la derecha de la imagen muestra el rango de temperaturas que se observa en la foto (25.2 a 19.8°C). Foto: E. Sanabria.

En el caso particular que trabajemos con renacuajos, debido a su pequeño tamaño y su fragilidad, resulta virtualmente imposible su manipulación para tomar la temperatura con termómetros de bulbo o digitales provistos de termocupla. Debido a que las larvas de anuros en general tienen pequeño tamaño y a que el agua posee alta conductancia térmica, se comportan de manera isoterma respecto a su ambiente circundante⁽³⁶⁾. Entonces, la temperatura del agua alrededor de los renacuajos puede considerarse un buen predictor de su temperatura corporal^(36,37). En este sentido para estimar la temperatura corporal de larvas, pueden utilizarse termómetros de bulbo o termómetros digitales provistos de termocupla, midiendo la temperatura en el sitio en el que se localiza el ejemplar a monitorear, para ello debe asegurarse la identificación del sitio preciso donde se encuentra el mismo antes de generar un eventual comportamiento de escape.

4.7.1b Determinación de la temperatura corporal de manera indirecta (radio telemetría)

A pesar de que esta técnica nos permite obtener la temperatura corporal de los ejemplares estudiados, sin manipulación y durante largos periodos de tiempo, es poco común que se emplee debido a los altos costos que implica.

En primer lugar, se debe seleccionar el equipamiento adecuado para realizar el trabajo, el cual consta de dos grupos: el equipo receptor y el emisor. El primero se compone de una antena direccional tipo *Yagi* y una base receptora que nos permite decodificar la información recibida (**Figura 4.7.5A**). Las unidades emisoras (**Figura 4.7.5B**) emiten señales en muy alta frecuencia (VHF), que corresponden a una serie de pulsos que cambian su frecuencia en el tiempo dependiendo de la temperatura corporal. Las emisoras presentan en su interior el circuito emisor, una antena y una batería. La vida útil de una emisora depende del tamaño de la batería que posea, y por ende, esto determinará en cierto modo la duración de nuestro estudio. El peso de la emisora no debe superar el 10% del peso del animal en el que se colocará. Es importante aclarar que existe una relación entre el tamaño de la emisora y el tamaño del animal seleccionado, que durante el estudio debe respetarse⁽³⁸⁾.

Mediante un procedimiento quirúrgico se colocan las emisoras en el interior del animal, y luego de la cicatrización y recuperación el individuo es liberado para comenzar el estudio (para más detalles ver³⁹).

Los equipos son adquiridos en diferentes tipos de compañías que ofrecen soporte técnico y múltiples opciones de programas para análisis de datos. A continuación, se nombran algunas de empresas que comercializan estos equipamientos:



Figura 4.7.5. A) Equipo de radio telemetría estándar con el que se puede estimar la locación de los individuos y la temperatura corporal de los mismos. B) Unidad emisora con la cual se puede obtener, además, la temperatura corporal de los animales. Foto: E. Sanabria.

- Advanced Telemetry Systems <<http://www.atstrack.com/>>, Estados Unidos.
- Argos <[http://www.argos-system.org/?nocache= 0.31222286930643306](http://www.argos-system.org/?nocache=0.31222286930643306)>, Francia.
- AVM Instrument Company Inc. <<http://www.avminstrument.com/>>, Estados Unidos.
- Holohill <<http://www.holohil.com/>>, Canadá.
- Lotek Engineering, Inc. <<http://www.lotek.com/>>, Canadá.
- Telenax <<http://www.telenax.com/>>, México.
- Telonics <<http://www.telonics.com/>>, Estados Unidos.
- Wildlife Materials <<http://wildlifematerials.com/>>, Estados Unidos.

4.7.2 Técnicas de relevamiento de la temperatura ambiental

Los factores ambientales tienen un rol preponderante en la fisiología de los animales ectotermos. En los anfibios adultos terrestres hay dos variables (temperatura y humedad) que definen las estrategias que estos animales poseen en los diferentes ambientes que colonizan. Las variaciones entre la temperatura y la humedad colocan a los organismos en diferentes escenarios, donde el compromiso entre la termoregulación y la hidrorregulación debe mantenerse balanceado. En el caso particular de las larvas, las variables que dominan su desarrollo y supervivencia son la temperatura y el hidroperiodo (ver apartado sobre **Hidroperiodo**) de los sitios en los que se desarrollan. Dependiendo del objeto y escala de nuestro estudio debemos seleccionar cuidadosamente la técnica para medir la temperatura ambiental. Además, es muy importante la elección adecuada de la técnica para evitar errores de interpretación, o variaciones falsas en nuestros análisis estadísticos.

4.7.2a Medición clásica de la temperatura ambiental

Cuando investigamos acerca de la ecofisiología de los organismos y la relación que estos poseen con el medio ambiente, es importante saber que la temperatura ambiental tiene un rol preponderante. Los métodos clásicos para medir la temperatura ambiente son varios y se utilizan una serie de instrumentos manuales o automáticos, detallados a continuación.

i. Medición directa de la temperatura ambiental

Consiste en medir directamente la temperatura ambiente donde se encuentra el animal con un termómetro de mercurio o un termómetro electrónico. En muchos estudios se discriminan dos tipos de medidas de temperatura ambiental. Una de ellas es la temperatura del aire, que generalmente se toma sobre el sustrato en el que se encuentra el animal (suelo desnudo, vegetación, roca). Para realizar esta medición se debe colocar el termómetro a 2 cm por encima del sustrato, aproximadamente; y cuando se estabiliza el lector de temperatura, se procede a tomar el dato.

Otra medida complementaria a la temperatura del aire, es la temperatura del sustrato, la cual se mide por contacto directo del termómetro o la termocupla con la superficie en la que se encuentra el animal. Estos datos ambientales son buenos predictores de las temperaturas corporales y sirven para realizar una aproximación de la estrategia termorreguladora de las especies/poblaciones estudiadas. Por otro lado, son buenos predictores de la situación térmica a microescala, siendo utilizadas como covariables en los análisis estadísticos cuando se quiere desestimar el efecto de las mismas.

ii. Medición indirecta de la temperatura micro-ambiental

En este caso se utilizan una serie de equipos que registran de manera automática las temperaturas ambientales, y generalmente se obtienen series de datos que nos permiten crear perfiles térmicos de los sitios estudiados.

Estos equipos comúnmente llamados “Data loggers” o “registradores de datos”, son pequeños termómetros automáticos que guardan los datos en una memoria interna. Las marcas comerciales más conocidas de estos equipos son Hobo®, iButton®, entre otros (**Figura 4.7.6A**).

Suele recomendarse colocar este tipo de equipos de a pares, por cada locación monitoreada, debido a que existe una alta probabilidad de perder la secuencia de datos. Muchas veces, los sellos de fábrica no son lo suficientemente buenos para sobrevivir a las inclemencias del tiempo, otras veces las baterías se desgastan antes de lo esperado debido a días fríos y las memorias electrónicas EPROM se borran debido a la falta de energía. Dado lo mencionado, una opción para garantizar la hermeticidad (crucial, si lo que se desea es tomar la temperatura dentro de cuerpos de agua) es colocar los mismos dentro de compartimentos estancos diseñados para ello. Alternativamente se pueden utilizar para tal fin receptáculos herméticos, como tubos de plástico con tapa, comercialmente denominados “envases pet preformados” (**Figura 4.7.6B**). Estos son de bajo costo, y han sido utilizados con éxito con iButton®, permaneciendo éstos intactos por más de un año en lagunas

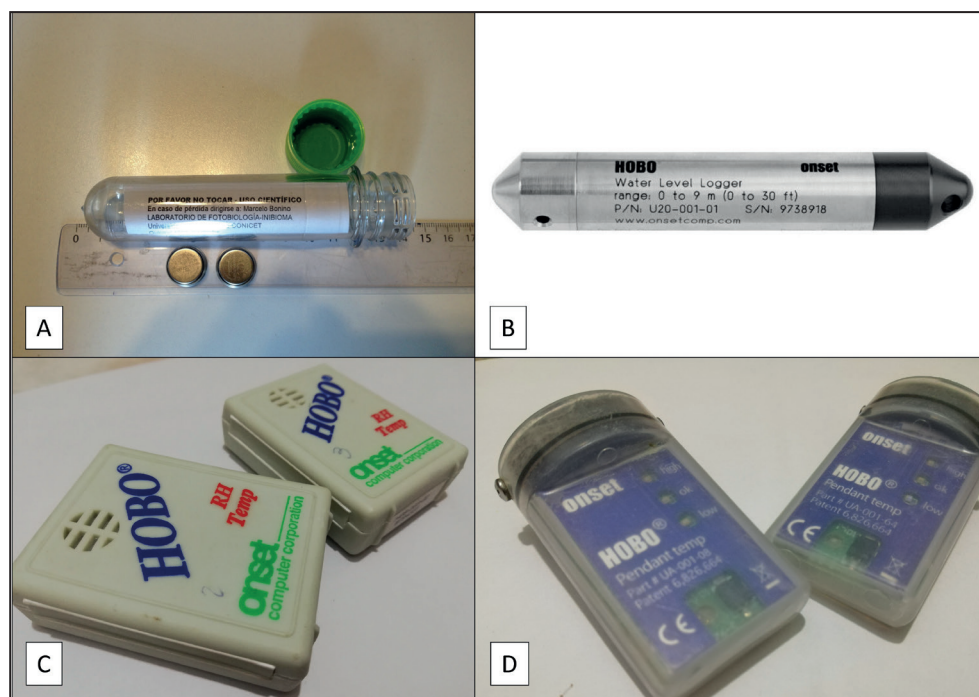


Figura 4.7.6. A) Registradores de temperatura y su correspondiente receptáculo hermético (Foto. M. Bonino). B) registrador de nivel de agua (Foto. M. Bonino). C y D) Diferentes tipos de registradores utilizados para la colección de datos térmicos y de humedad en los sitios de muestreo. Fotos: E. Sanabria.

de alta montaña, incluso bajo el hielo⁽⁴⁰⁾. Otros casos particulares para tener en cuenta son el vandalismo o eventos naturales atípicos, como aluviones que pueden ocasionar la pérdida del equipo. Una buena recomendación que puede disminuir la probabilidad de pérdida es, la utilización de etiquetas en las que figure la institución, y al menos un contacto para la devolución del dispositivo.

iii. Hidroperiodo

Si bien este capítulo se centra en estudios térmicos, y debido a la importancia del hidroperiodo en estudios de campo en los que se censa la temperatura de humedales, hacemos una breve mención de su monitoreo. Además de la temperatura, el hidroperiodo es una variable que condiciona la supervivencia de las larvas y reclutamiento de juveniles de los anfibios en ambientes estacionales⁽⁴¹⁾, y puede influir fuertemente en otros aspectos importantes de su fenología, como la intensidad y duración de los eventos reproductivos^(42,43). Por ello esta variable suele ser de sumo interés para estudios que abordan distintos aspectos de la biología de los anfibios. El monitoreo del hidroperiodo puede ser costoso, en términos de esfuerzo, particularmente en lugares remotos y/o de difícil acceso. Por ejemplo, la opción de monitoreo remoto a través de imágenes satelitales no es posible cuando los humedales son de pequeño tamaño. Por ello, la utilización de dispositivos que pueden medir de modo automático la duración del hidroperiodo, podrían considerarse como la mejor opción. En este sentido, existen data loggers diseñados

para tal fin (**Figura 4.7.6C**), que pueden ser programados y depositados en los sitios de interés. Estos sensores estiman la profundidad del agua a través de la diferencia de presión que genera el pelo (o la columna) de agua respecto a la presión atmosférica. Por ello debe considerarse que lo óptimo es colocar estos dispositivos de a pares. Esto es, uno se deposita en la parte más profunda del cuerpo de agua, y otro expuesto al aire en la misma área. Cuando no se cuenta con pares, o solo se cuenta con un data logger de estas características, una alternativa consiste en colocar el dispositivo disponible en el cuerpo de agua, y obtener la presión atmosférica de una estación meteorológica cercana a la ubicación de estudio. En este caso debe procurarse que las lecturas sean geográficamente cercanas, sincrónicas y que no haya errores de calibración entre dispositivos.

4.7.2 Modelos físicos nulos en termofisiología

Los modelos físicos son una alternativa para mapear la heterogeneidad térmica de un ambiente a escala muy pequeña. Los mismos copian las características conductivas, convectivas y de radiación de un organismo en ausencia de funciones fisiológicas⁽¹⁸⁾. Los modelos de temperatura operativa se han utilizado para medir el ambiente térmico en múltiples organismos como insectos⁽⁴⁴⁾, anfibios^(9,45,46), reptiles^(47, 48), aves⁽⁴⁹⁾ y mamíferos⁽⁵⁰⁾.

Los anfibios son organismos puramente ectotérmicos que dependen de la temperatura ambiental para elevar la temperatura del cuerpo⁽⁵⁾, y en el caso de los individuos adultos también dependen de la humedad relativa del ambiente para mantener el balance hídrico corporal⁽⁵¹⁾. En consecuencia, diversos aspectos de la fisiología, desarrollo y comportamiento de los anfibios dependen de la temperatura corporal. De este modo, los modelos físicos se convierten en una herramienta para entender el compromiso que existe entre las temperaturas ambientales y la termorregulación de anfibios, ya que las variaciones regionales en la topografía, velocidad del viento, cobertura de nubes y densidad vegetal, crean a nivel local heterogeneidad en las temperaturas operativas⁽¹⁸⁾.

La evaporación o pérdida de agua a través de la piel es un parámetro que modela la temperatura corporal de los anfibios⁽⁵²⁾. Por este motivo se han propuesto diversos modelos nulos para medir la temperatura operativa en anfibios⁽⁵³⁻⁵⁵⁾; los mismos poseen como característica común la evaporación del agua a través del material del cual están contruidos (**Figura 4.7.7**). La construcción y calibración de los modelos nulos (**Figura 4.7.8**) es un paso fundamental en el estudio de las variaciones térmicas, ya que la temperatura operativa se define como “la temperatura obtenida de un objeto que no

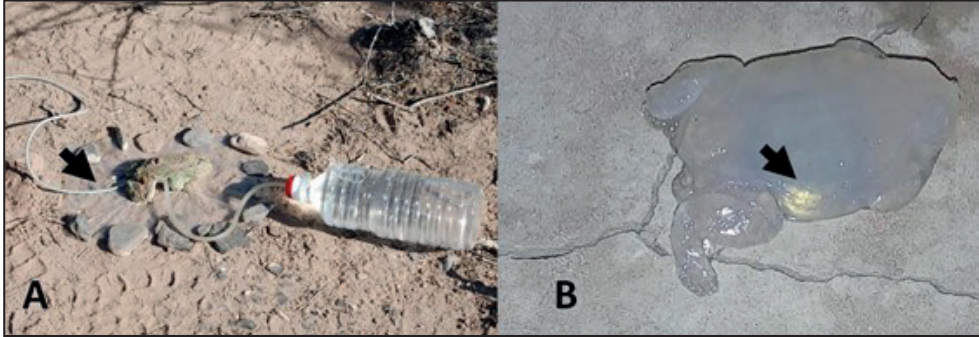


Figura 4.7.7. Modelos físicos nulos de dos especies de ranas del Desierto del Monte, **A)** Modelo de yeso de *Rhinella arenarum* con alimentación de agua para mantenerlo con humedad constante y conexión mediante sonda térmica conectada a registrador de datos externo tipo Hobo®⁽⁹⁾. **B)** Modelos de Agar-Agar, de la especie *Pleurodema nebulosum*, en el interior se puede ver el registrador de datos automático iButton® (Flecha). Foto: E. Sanabria.

posee capacidad para generar calor y que posee la forma, tamaño y propiedades térmicas de un animal”⁽⁵⁶⁾. De este modo, es posible tener un panorama a escala muy pequeña de las variaciones térmicas ambientales desde la perspectiva del animal modelado⁽¹⁸⁾.

4.7.3 Técnicas para conocer los extremos térmicos de las especies en estudio

Los extremos térmicos están definidos como “los valores de temperatura a los cuales la actividad locomotora se altera y el animal pierde la habilidad de escape y si esta condición prevalece el animal muere”⁽⁵⁷⁾. Existe una defini-

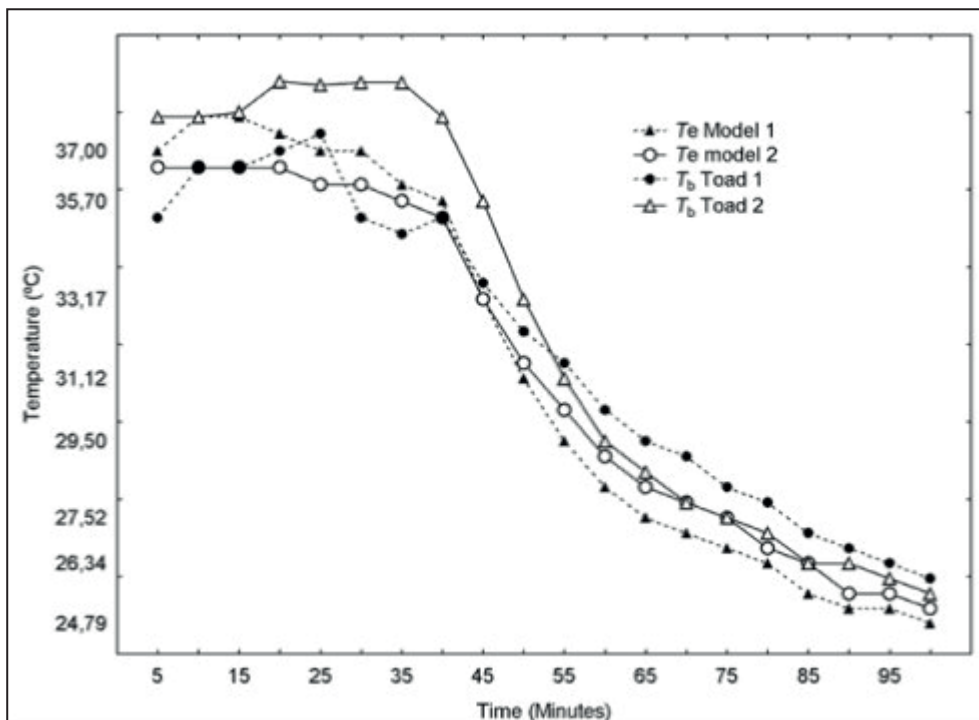


Figura 4.7.8. Calibración de los modelos de yeso con evaporación continua en *Odontophrynus occidentalis* del Desierto del Monte⁽¹⁰⁾. En la gráfica se observan las temperaturas de los animales utilizados para la calibración (T_b) y la temperatura registrada en los modelos (T_e).

ción alternativa, en la cual se considera que un animal está ecológicamente muerto, es decir que se define el extremo térmico como el valor de temperatura en el que un animal manifiesta espasmos o simplemente la incapacidad de recuperar su postura normal luego de perderla al voltearse⁽³⁾.

Las temperaturas críticas máximas ($TC_{m\acute{a}x}$) y mínimas ($TC_{m\acute{i}n}$) son parámetros utilizados en numerosos estudios para definir el rango de tolerancia térmica de los animales^(7,58). Estos límites se relacionan con los rangos de distribución de las especies, disminuyendo conjuntamente con el aumento de la latitud como así también con la altitud⁽¹⁹⁾. Además, existen diversos estudios que han demostrado que los extremos térmicos están influenciados por factores tales como: el nivel de hidratación de los animales estudiados^(59,60), el estado nutricional⁽⁶¹⁾, el fotoperiodo⁽⁶²⁻⁶⁵⁾, la presencia de hormonas en sangre, como la melatonina que disminuye los valores de la $TC_{m\acute{a}x}$ ⁽⁶⁶⁾, el estado reproductivo⁽⁶⁷⁾, la presencia de contaminantes⁽⁶⁸⁾ y la presencia de depredadores^(69,70).

En general se espera una correspondencia entre los límites de tolerancia y las condiciones térmicas locales, observándose por ejemplo en especies de zonas frías $TC_{m\acute{i}n}$ incluso por debajo de 0 °C, como es el caso de *Rana sylvatica*⁽⁷¹⁾. Esto es posible gracias a que estos animales poseen una serie de estrategias adaptativas para sobrevivir: 1) la generación metabólica de anticoagulantes (glucosa y glicerol), los cuales permiten disminuir el punto de congelamiento de los fluidos corporales; 2) la alteración de la calidad y la cantidad de agentes nucleantes de hielo en sus cuerpos, logrando disminuir el punto de congelamiento en especies que experimentan súper-enfriamiento, y 3) la tolerancia al congelamiento en especies que poseen la capacidad de sobrevivir con el 60-80% de los líquidos corporales en forma de hielo⁽⁷²⁾.

Las $TC_{m\acute{a}x}$ suelen ser menos variables geográficamente que las $TC_{m\acute{i}n}$, y su límite suele estar impuesto por el fuerte efecto que las altas temperaturas (cerca de 45 °C) tienen sobre la estabilidad de las proteínas y membranas biológicas⁽¹⁸⁾.

Entre la batería de técnicas disponibles, el método dinámico de Hutchinson^(36,62) es considerado el más adecuado para la obtención de los límites de tolerancia térmica. En el mismo, los animales son expuestos a una rampa térmica, esto es calentamiento / enfriamiento gradual a una tasa constante. Los equipos utilizados son baños termostáticos que tienen la capacidad de calentar y enfriar los líquidos que se encuentran en él, brindando estabilidad y precisión en el control de la temperatura (**Figura 4.7.9**).

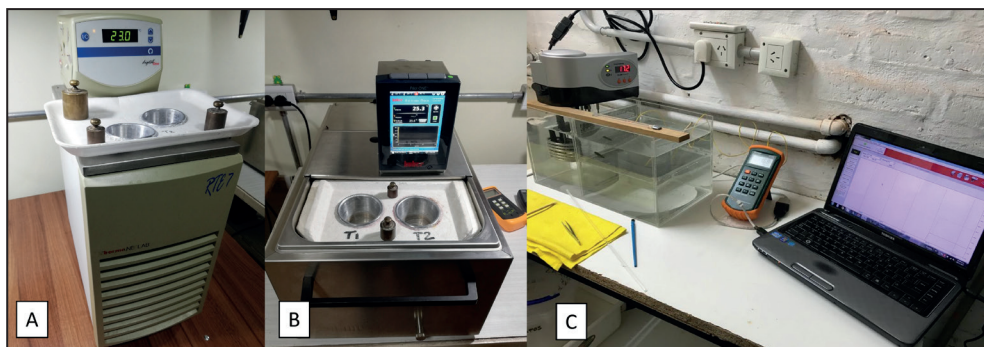


Figura 4.7.9. Diferentes tipos de baños termostáticos utilizados para medir la temperatura crítica máxima y mínima. **A y B)** son baños termostáticos frío - calor (Thermo Neslab -USA y Huber - Alemania) con un rango de temperaturas que varía entre los -16°C a los 100°C . **C)** Termocirculador (Techné TE-10) incluido en pecera y en proceso de calentamiento de temperatura del agua (a una tasa fija de $^{\circ}\text{C}/\text{tiempo}$), donde se aloja a un renacuajo de *Pleurodema thaul*⁽⁷⁰⁾. La determinación de la tasa de cambio de temperatura y el registro de TC_{max} es posible mediante el uso del software en computadora asociada al termocirculador. Fotos A y B): E. Sanabria; C): M. G. Perotti.

A continuación, resumimos y describimos las técnicas y procedimientos comúnmente utilizadas para determinar las $\text{TC}_{\text{máx}}$ y $\text{TC}_{\text{mín}}$ en animales adultos y en larvas.

4.7.3a Determinación de la temperatura crítica máxima ($\text{TC}_{\text{máx}}$)

El procedimiento comienza colocando los individuos dentro de los baños termostáticos que se encontrarán a la temperatura de incubación seleccionada por el investigador. Posteriormente comienza el incremento de temperatura a la tasa seleccionada (ver apartado 4.7.3c) hasta que los animales muestran espasmos musculares o en su defecto no pueden volcarse sobre sí mismos para incorporarse y tomar su posición normal, natural. En el caso particular de los renacuajos se considera que los individuos han alcanzado la $\text{CT}_{\text{máx}}$ cuando éstos manifiestan espasmos musculares o nado desorganizado; en ese momento se registra la temperatura del agua ya que los renacuajos se comportan de manera isoterma respecto a su ambiente circundante (ver título 4.7.1a sobre la estimación de temperatura en renacuajos). En el caso de la obtención de la $\text{TC}_{\text{máx}}$, es posible el empleo de baños termostáticos (ej. Techné TE-10D; Figura 4.7.9), que nos permiten establecer las tasas de calentamiento del agua (incremento de temperatura de manera constante) y presentan la posibilidad de llevar un registro continuo de los cambios de la temperatura a través de un software (ThechneWorks PC software) que trabaja con el equipo conectado a una computadora. De este modo se puede controlar la tasa de cambio deseada en la temperatura, y registrar las temperaturas en tiempo real, y determinar $\text{TC}_{\text{máx}}$, es decir cuando el organismo registra descoordinación en sus movimientos. Este procedimiento es relativamente sencillo, pero hay que tener especial precaución y estar atentos a los signos que muestran los animales, ya que la $\text{TC}_{\text{máx}}$ se encuentra a unos pocos grados de la temperatura letal⁽¹⁸⁾. Una vez determinada la $\text{TC}_{\text{máx}}$ es necesario cerciorarse que los animales se recuperen, ya que si estos mueren posteriormente a la determinación de este parámetro, los valores deben ser descartados.

4.7.3b Determinación de la temperatura crítica mínima (TC_{\min})

Este método es similar al anterior, debemos prestar especial atención cuando testeamos especies que viven en latitudes altas o en alta montaña, ya que éstas poseen generalmente valores de TC_{\min} cercanos a 0°C . Igualmente que en la determinación de TC_{\max} , se considera que los ejemplares llegan a la TC_{\min} cuando no pueden volcarse sobre sí mismos cuando son colocados sobre sus espaldas (posición supina) o tomar su posición natural de nado en el caso de los renacuajos.

Esto es técnicamente complejo de determinar ya que los animales pueden mostrar superenfriamiento, y para ello se deben tener en cuenta los siguientes pasos. En el caso de trabajar con ejemplares de anfibios adultos se les debe vaciar la vejiga mediante la utilización de una sonda de silicona. Este procedimiento evita que el líquido almacenado en la vejiga urinaria se congele. La termocupla debe ser fijada al abdomen de los ejemplares mediante pegamento líquido (La gotita®, Poxipol, Argentina; **Figura 4.7.10A**). Es necesario que el monitoreo de la temperatura de los ejemplares sea constante. Para ello se emplean registradores de temperatura que permiten tomar la temperatura corporal de los ejemplares cada 1 segundo, una vez que los mismos se colocan en una cámara a una temperatura inicial que es igual a la temperatura de incubación (**Figura 4.7.10B**). En este tipo de estudios la tasa de disminución de la temperatura es menor que la clásicamente usada y son recomendadas tasas de $0,5^{\circ}\text{C}/30\text{min}$ o menores⁽⁷³⁾. Posteriormente, se comienza a monitorear las curvas de descenso de la temperatura de los ejemplares, hasta que aparece la curva exotérmica que se observa en los líquidos súper enfriados (**Figura 4.7.11**). La temperatura más baja justo antes de este fenómeno se denomina temperatura de cristalización⁽⁷⁴⁾.

Para el caso particular de los renacuajos, una manera de obtener este parámetro, es montar el experimento en un freezer estándar (-18 a -20°C). Para ello, los renacuajos deben ser colocados en recipientes individuales, (idealmente de vidrio para facilitar la observación de los mismos; **Figura 4.7.12**), con un volumen de agua tal que al colocarlo dentro del freezer se logre la rampa de descenso de temperatura deseada. Mediante un termómetro digital con termocupla, se puede chequear la temperatura con el freezer cerrado. Asimismo, es sumamente importante revisar cada 15 segundos el estado del renacuajo durante la última fase del experimento para garantizar la identificación precisa de la TC_{\min} . Este método es sencillo y factible, ya que muchos termómetros electrónicos cuentan con la posibilidad de incluir hasta 4 termocuplas a la vez, por lo que se pueden medir varios individuos al mismo tiempo, tomando los recaudos de seguimiento a temperaturas cercanas a la temperatura crítica.



Figura 4.7.10. Equipamiento utilizado para determinar las temperaturas críticas mínimas y punto de cristalización. **A)** Forma de anclar la termocupla para evitar gérmenes de cristalización. **B)** Cámaras para la disminución de la temperaturas. Las mismas permiten ver los ejemplares a medida que la temperatura disminuye y evaluar su condición⁽³⁹⁾. Foto: E. Sanabria.

4.7.3c Selección de la rampa térmica (tasa de calentamiento-enfriamiento)

Es importante tener en cuenta, además de la temperatura inicial de la rampa, la tasa de enfriamiento y calentamiento seleccionadas. En general, en el método dinámico de Hutchinson^(36,62), la tasa de cambio se suele ajustar en

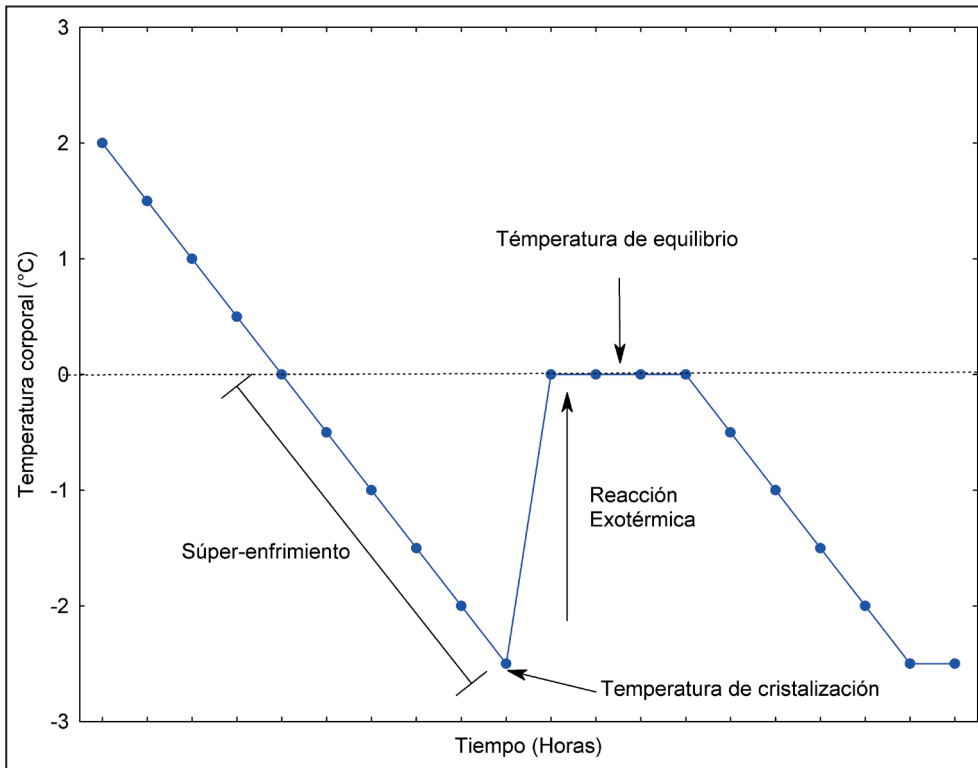


Figura 4.7.11. Esquema de la secuencia de disminución de la temperatura, donde se puede observar la temperatura de cristalización (T_{cr}), el ascenso brusco de la temperatura que se acerca a 0°C debido a la aparición de hielo en el organismo, la liberación de calor por este fenómeno (reacción exotérmica) y posteriormente una meseta que se denomina temperatura de equilibrio.

valores muy rápidos (entre $0,5$ y $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), lo cual se justifica para evitar introducir sesgos en las estimaciones por mecanismos de aclimatación rápida (“hardening”), que puede generar $TC_{\text{máx}}$ y $TC_{\text{mín}}$ sobre o sub estimadas respectivamente^(36,75). Por otro lado, el empleo de tasas de calentamiento lentas tiene la ventaja de que puede simular un escenario natural de cambio de temperatura, y las estimaciones podrían ser generalizadas en un contexto más ecológico. Asimismo, tasas lentas, simulando las tasas de cambio térmico naturales, implican una mayor duración de los ensayos, lo que puede

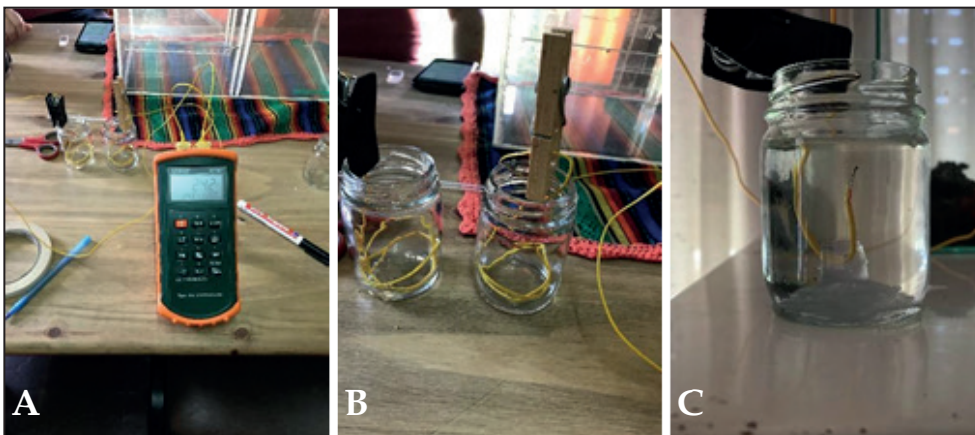


Figura 4.7.12. A) Termómetro digital, B) termocuplas y C) recipiente empleado para registro de $TC_{\text{mín}}$ en renacuajos. Fotos: M. G. Perotti.

introducir efectos colaterales (como estrés térmico acumulado, deshidratación, etc.) que inducirían respuestas muy heterogéneas y más difíciles de estandarizar⁽⁷⁵⁾. En este sentido, la elección de un protocolo de tasas de calentamiento rápidas, que evite estos efectos distorsionadores y difíciles de controlar, se considera más adecuado en estudios con fines comparativos; de lo contrario, si nuestro interés se centra en conocer el efecto de la temperatura en poblaciones en condiciones naturales (que incluyan estos efectos), podríamos optar por una tasa lenta más realista.

4.7.4 Técnica para determinar la temperatura seleccionada

Como ya se mencionó, muchos anfibios termorregulan moviéndose entre distintos tipos de microhábitats durante el día y la noche, ajustando de esta manera su temperatura corporal y manteniendo un rango óptimo^(5,7,8,11). Asimismo, el beneficio de mantener una temperatura óptima está limitado por los costos metabólicos que demanda seleccionar los diferentes ambientes térmicos⁽¹³⁾, como así también los riesgos de predación y la pérdida de oportunidades, ya que si un animal gasta mucho tiempo en termorregular, no tendrá tiempo para otras actividades como la alimentación, reproducción, el balance hídrico, entre otras^(5,18). Por lo tanto, la principal diferencia entre poseer como estrategia la termorregulación o la termoconformidad son los costos y beneficios que demanda a cada una de las especies. Ser termorregulador o termoconforme son los extremos de un continuo de estrategias, ya que a menudo las especies poseen combinaciones de estas que varían con las estaciones o hábitat utilizados, riesgo de predación, balance hídrico, entre otros^(14,76,77).

Con el fin de conocer la temperatura seleccionada o preferida de los anfibios en ausencia de las presiones de predación e interacciones con otros individuos, sumado a un ambiente térmico que brinde todo el espectro térmico que la especie pueda requerir, se utiliza la técnica de gradientes térmicos (**Figura 4.7.13**).

En principio podemos definir a un gradiente térmico lineal, como toda superficie que posibilite un degradé de temperaturas entre dos extremos (caliente y frío). Las temperaturas que se encuentran en los extremos son temperaturas cercanas a las temperaturas críticas máximas y mínimas.

Los gradientes para organismos terrestres generalmente son cajas de madera, vidrio, yeso, entre otros materiales; esto depende del tamaño de la especie a estudiar. Para anfibios anuros de mediano tamaño y no saltadores, los gradientes rondan los 2 metros de largo. Es esencial colocar carriles longitudinales dentro del terrario (gradiente) para individualizar los ejemplares,

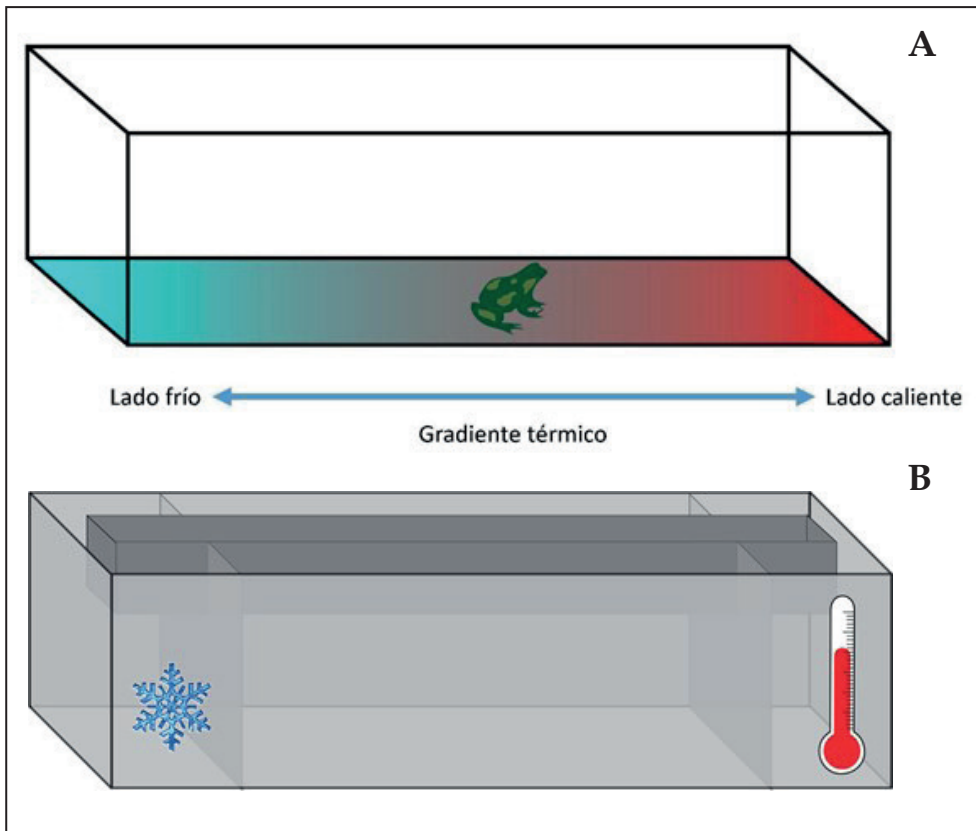


Figura 4.7.13. A) Esquema de un gradiente térmico lineal en medio terrestre de un solo carril. En los extremos, encontramos las temperaturas mínimas máximas del gradiente y entre estas se produce un gradiente lineal de temperaturas donde el animal selecciona. B) Esquema de un gradiente térmico en medio acuático. Esquema: E. Sanabria.

evitando de ese modo las interacciones entre los individuos. Una precaución que es importante tener en cuenta, es mantener el suelo húmedo para evitar la desecación de los animales, ya que esto puede variar la selección térmica. Para el caso de organismos acuáticos, como el caso de las larvas, la construcción de un gradiente lineal suele ser más complicado, dado que cualquier turbulencia o movimiento en el medio acuático puede modificar rápidamente la temperatura en dicho gradiente. Existen distintos diseños de construcción de gradientes acuáticos, como los sistemas de contracorriente, que suelen tener varios metros de longitud. En este apartado nos referiremos a un diseño simple que funciona para organismos de pequeño tamaño como son los renacuajos. El diseño básico consiste en una canaleta de aproximadamente 1 m de largo (metálica para que sea buena conductora de la temperatura) colocada en un baño térmico compartimentado (**Figura 4.7.13B**). En un extremo del baño se coloca hielo, y en el otro, calefactores de acuario; de este modo se generan los extremos de temperatura en el baño, y dentro de la canaleta metálica se establece un gradiente por conducción.

Una vez colocados los animales en el gradiente y previo a un tiempo de aclimatación en él, se inicia con la toma de los datos térmicos. Estos pue-

den hacerse de la manera clásica con termómetro de mercurio o electrónico (véase apartado 4.7.1a), o de manera automática. Es ideal que las temperaturas seleccionadas se registren en el mismo periodo de actividad en que los animales están activos en la naturaleza para evitar cambios en la selección térmica debido a los ciclos circadianos. Por otro lado, es vital que, si los animales son nocturnos, estos registros se hagan en total oscuridad para evitar perturbaciones. En el caso de trabajar en plena oscuridad se ha documentado que el empleo de la luz roja o la utilización de cámaras de visión nocturna, colocadas sobre los gradientes, serían las más adecuadas para este fin (Sañabria, E. datos no publicados).

4.7.5 Técnicas para conocer la temperatura óptima y sus diferentes parámetros

La sensibilidad térmica es el grado en que capacidades biológicas determinadas (velocidad, resistencia, digestión, crecimiento) están influenciadas por la variación de la temperatura⁽⁷⁸⁻⁸¹⁾. La sensibilidad térmica se describe frecuentemente con una curva, conocida como curva de rendimiento o desempeño de un organismo en función de la temperatura⁽⁸²⁻⁸⁴⁾. Estas curvas tienen una forma asimétrica, con tendencia a tener su centro desplazado hacia la derecha, donde el rendimiento evaluado cae rápidamente (Figura 4.7.14).

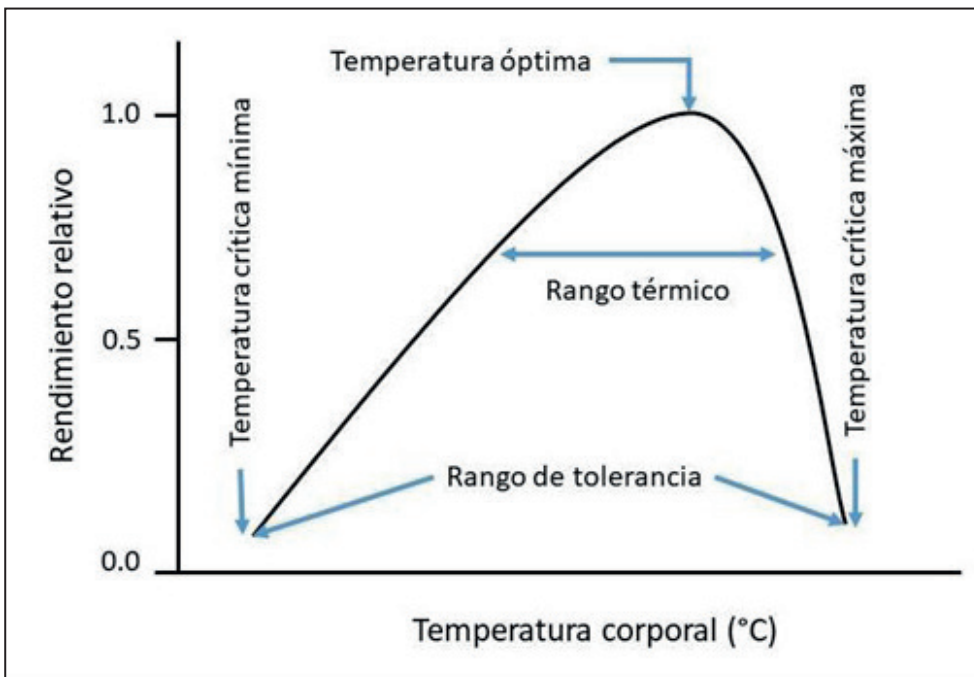


Figura 4.7.14. Curva teórica del rendimiento locomotor de un organismo. Temperatura crítica mínima (TC_{\min}), Temperatura crítica máxima (TC_{\max}), Rango de tolerancia térmica, amplitud del rendimiento térmico (Rango térmico), temperatura óptima (Top), temperatura a la cual el rendimiento medido para dicho organismo es máximo.

Para construir estas curvas generalmente se mide una misma función biológica, por ejemplo la locomoción, a diferentes temperaturas. Generalmente, como punto de partida, se colocan los individuos a la temperatura blanco del ensayo (pudiendo emplearse incubadoras) y se los mantiene a dicha temperatura aproximadamente 1 hora.

Si nuestro objetivo es crear curvas de rendimiento locomotor en adultos, utilizamos un terrario de forma circular (**Figura 4.7.15**), que nos permite mantener la base a la misma temperatura a la que vamos a realizar el ensayo. Posteriormente colocamos el ejemplar en él, y lo ayudamos a caminar dando suaves toques con un pincel en la zona posterior y contamos el número de vueltas que da el individuo en un determinado tiempo. Estos pasos se repiten con todos los individuos y en todas las temperaturas que hemos seleccionado para construir la curva de rendimiento locomotor. Esta técnica conocida como locomoción forzada es comúnmente usada en los estudios de Titon y colaboradores⁽⁸⁵⁾, para determinar cómo afecta la deshidratación a las capacidades locomotoras de los anfibios estudiados.

Para evaluar el rendimiento locomotor y construir las curvas con renacuajos, debemos realizar estos ensayos en acuarios, que pueden ser lineales o circulares, en los que se inducirá la natación de los individuos. Un diseño simple consiste en una canaleta de acrílico que constituye “la pista”, inmersa en un acuario de mayor tamaño, que funciona como baño térmico (ver **Figura 4.7.16A**). La temperatura de cada ensayo estará dada por la temperatura del agua, pudiendo utilizarse calefactores de acuario u otros dispositivos provistos con un termostato para mantener la temperatura constante. Para la obtención de la velocidad de natación puede o bien, utilizarse una pista que contenga sensores led y un circuito temporizador conectado a una computadora⁽³⁷⁾, o realizarse filmaciones en plano cenital y luego obtener las velocidades mediante algún programa de videoanálisis. Para esta última alternativa existen varios software de acceso libre, por ejemplo Tracker© (**Figura 4.7.16B**, <https://physlets.org/tracker/>). Es importante tomar algunos recaudos, ya que facilitarán luego el procesamiento de los videos para obtener la estimación de las velocidades de natación. En primer lugar, debe procurarse una buena iluminación homogénea evitando la proyección de sombras y reflejos. Otro aspecto importante es utilizar un fondo que contraste con el color de los ejemplares, lo que facilitará que el software logre identificar a los mismos. Finalmente, debe procurarse que, en el campo de imagen, dentro de la pista, no haya objetos que puedan confundir e interferir con el seguimiento del individuo por parte del software.

De este seguimiento se obtendrán una serie de puntos de los que se puede extraer la velocidad de natación máxima alcanzada a cada temperatura, los cuales serán utilizados para ajustar una curva de rendimiento o desempe-

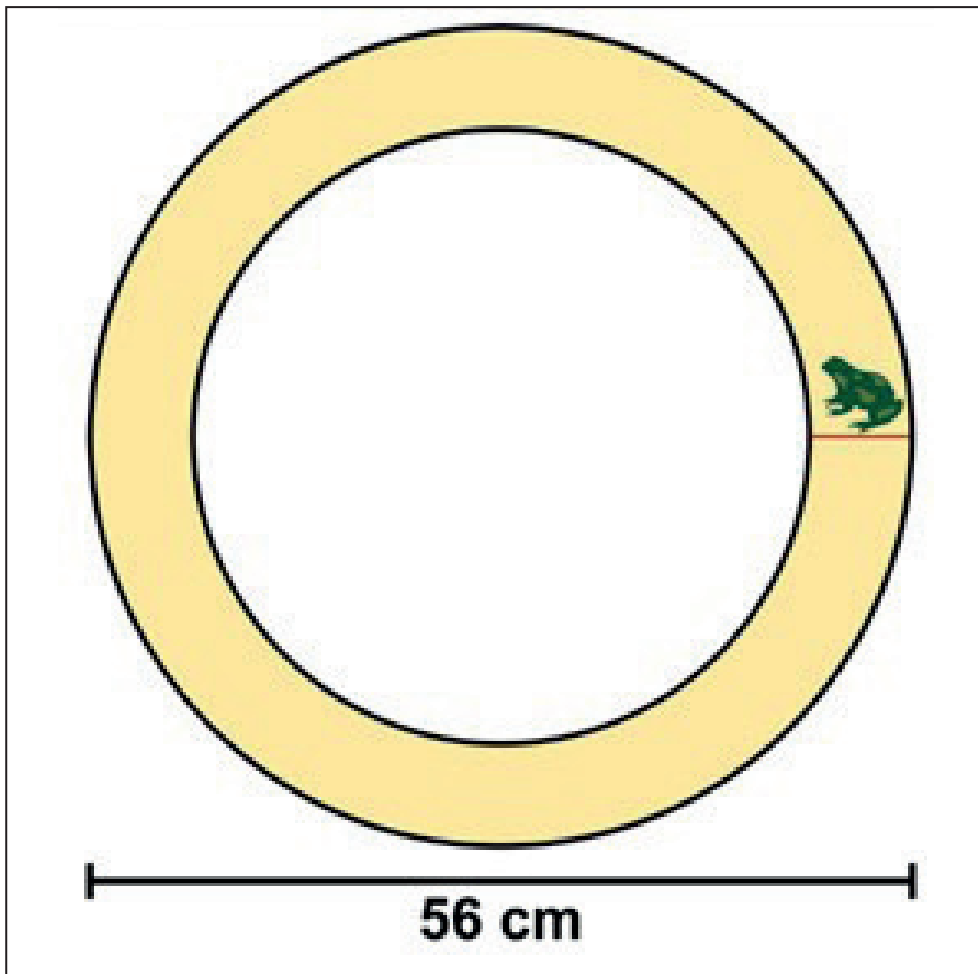


Figura 4.7.15. Ejemplo de un terrario circular para la determinación del rendimiento locomotor en anfibios de tamaño medio (~10 cm LHC). Esquema: E. Sanabria.

ño. Las $TC_{\text{máx}}$ y $TC_{\text{mín}}$ serán las temperaturas utilizadas como extremos para la construcción de dichas curvas, en las que la velocidad de locomoción es igual a 0 cm/s.

También, podemos crear curvas de rendimiento a través de otras funciones biológicas como el crecimiento (M. Tejedo y colaboradores, datos no publicados) la carga parasitaria (Piñeiro y colaboradores, datos no publicados), entre otros.

Es importante destacar que las curvas de rendimiento nos dan mucha información, ya que no solo nos permiten conocer la temperatura óptima para una determinada función biológica, sino también variables como la amplitud del rendimiento estudiado, pudiendo definir, de esta manera, si la especie en estudio es especialista o generalista en esta función biológica⁽⁸⁶⁾.



Figura 4.7.16. Arriba (A), set de filmación para evaluar el rendimiento locomotor en renacuajos. Se puede observar una cámara filmadora en posición cenital, el baño térmico constituido por un receptáculo, o “acuario” de mayor tamaño, conteniendo la canaleta de acrílico, que constituye la “pista” (detalle en recuadro superior). Abajo (B), captura de imagen de la interface del software para videoanálisis Tracker©, en el mismo se puede observar (vista cenital) el dispositivo para el ensayo de locomoción de renacuajos, compuesto por: 1) la pista donde se estimula la natación de los ejemplares (marcada en línea punteada), la misma se encuentra inmersa en 2), el acuario que funciona como baño térmico en el que se controla la temperatura del ensayo, y 3) paneles del software que muestran una curva del seguimiento de la velocidad en tiempo real y los valores tabulados de tiempo y velocidad^(37,40). Fotos: M. Bonino.

Bibliografía

1. Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. Biology of Amphibians. McGraw-Hill Publication Co. Baltimore, M. D.
2. Labra, A. & Vidal, M. 2003. Termorregulación en reptiles: un pasado veloz y un futuro lento: 207-224. En: Bozinovic, F. (ed.). Fisiología Ecológica y Evolutiva. Teoría y casos de estudios en animales. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
3. Hillman, S.; Withers, P.; Drewes, R. & Hollyard, D. 2009. Ecological and Environmental Physiology of Amphibians. Oxford University Press. United States of America.
4. Gisolfi, C.V. & Teruel, F.M. 1999. Control y regulación de la temperatura: 1073-1084. En: Tresguerres, J.A.F.; de Lugo, E.A.; Cachofeiro, M.V.; Cardiani, D.; Loyzaga, P.G.; Lahera, V.J.; Martínez, J.A.; Teruel, F.M.; Roisin, R.R.; Pardo, M.R.; Menéndez, J.T. & Gutiérrez, P.Z. (eds.). Fisiología Humana. Segunda Edición, Editorial Mc. Graw Hill.
5. Zug, G.R.; Vitt, L.G. & Caldwell, J.P. 2001. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Academy Press. USA.
6. Sanabria, E.A.; Vaira, M.; Quiroga, L.B.; Akmentins, M.S. & Pereyra, L.C. 2014. Variation of thermal parameters in two different color morphs of a diurnal poison toad, *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae). *Journal of Thermal Biology* 41: 1-5.
7. Stebbins, R.C. & Cohen, N.W. 1995. A Natural History of Amphibians. Princeton University Press. USA.
8. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Acosta J.C. 2005. Termorregulación de adultos de *Bufo arenarum* (Hensel, 1867) (Anura: Bufonidae) en diferentes microhábitat de los humedales de Zonda, San Juan, Argentina. *Revista Española de Herpetología* 19: 127-132.
9. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Martino, A.L. 2011. Seasonal changes in the thermoregulatory strategies of *Rhinella arenarum* in the Monte desert, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 36: 23-28.
10. Sanabria, EA, Quiroga, LB & Martino, AL. 2012. Variation in the thermal parameters of *odontophrynus occidentalis* in the Monte desert, Argentina: response to the environmental constraints. *Journal of Experimental Zoology* 317: 185-193
11. Lillywhite, B.H. 1970. Behavioral temperature regulation in the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 40A: 213-227.
12. Tracy, R.C. & Christian, K. 1986. Ecological relations among space, time, and thermal niche axes. *Ecology* 67: 609-615.
13. Lillywhite, B.H.; Licht, P. & Chelgren, P. 1973. The role of behavioral thermoregulation in the growth energetics of the toad, *Bufo boreas*. *Ecology* 54: 375-383.
14. Huey, R.B. & Slatkin, M. 1976. Cost and benefits of lizard thermoregulation. *The Quarterly Review of Biology* 51: 363-384.
15. Hertz, P.E.; Huey, R.B. & Stevenson, R.D. 1993. Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question. *The American Naturalist* 142: 796-818.
16. Bakken, G.S. 1992. Measurement and application of operative and standard operative temperatures in ecology. *American Zoologist* 32: 194-216.
17. Somero, G.N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and Comparative Biology* 42: 780-789.
18. Angilletta Jr., M.J. 2009. Thermal Adaptation a Theoretical and Empirical Synthesis. Oxford University Press. USA.
19. Brattstrom, B.H. 1968. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comparative Biochemistry and Physiology* 24: 93-111.
20. Smith, G.R. & Ballinger, R.E. 2001. The ecological consequences of habitat and microhabitat use in lizards: A review. *Contemporary Herpetology* 3: 1-37.
21. Pianka, E.P. 1982. Ecología Evolutiva. Editorial Omega, S.A. Universidad de Texas, Austin.
22. Spellerberg, I.F. 1972. Temperature tolerances of southwest Australian reptiles examined in relation to reptile thermoregulatory behavior and distribution. *Oecologia* 9: 23-46.
23. Gunderson, A.R. & Stillman, J.H. 2015. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282: 20150401.

24. Sunday, J.M.; Bates, A.E. & Dulvy, N.K. 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 1823-30.
25. Ward, D. 2009. *The Biology of Desert*. Oxford University Press Inc. New York.
26. Brattstrom, B.H. 1963. A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecology* 44: 238-255.
27. Lillywhite, H.B.; Mittal, A.J.; Garg, T.K. & Das, I. 1998. Basking behavior, sweating and thermal ecology of the indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *Journal of Herpetology* 32: 169-175.
28. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Acosta, J.C. 2003. Ecología térmica de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) en los bañados de Zonda, San Juan, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 17: 121-123.
29. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B. & Acosta, J.C. 2003. Ecología térmica de una población de *Bufo arenarum* (Anura: Bufonidae) en un humedal del centro-oeste de argentina. *Boletín de la Sociedad Herpetológica Mexicana* 11: 33-41.
30. Navas, C.A.; Carvajalino-Fernández, J.M.; Saboyá-Acosta, L.P.; Rueda-Solano, L.A. & Carvajalino-Fernández, M.A. 2013. The body temperature of active amphibians along a tropical elevation gradient: patterns of mean and variance and inference from environmental data. *Functional Ecology* 27: 1145-1154.
31. Sanabria, E.A. & Quiroga, L.B. 2019. The body temperature of active desert anurans from hyper-arid environment of South America: The reliability of WorldClim for predicted body temperatures in anurans. *Journal of Thermal Biology* 85: 102-398.
32. Solano, L.A.R.; Navas, C.A.; Carvajalino-Fernández, J.M. & Amézquita, A. 2016. Thermal ecology of montane *Atelopus* (Anura: Bufonidae): A study of intrageneric diversity. *Journal of Thermal Biology* 58: 91-98.
33. Sanabria, E.A.; Quiroga, L.B.; Gonzalez, E.; Moreno, D. & Cataldo, A. 2013. Thermal parameters and locomotor performance in juvenile of *Pleurodema nebulosum* (Anura: Leptodactylidae) from the Monte Desert. *Journal of Thermal Biology* 38: 390-395.
34. Sanabria, E.A.; Rodríguez, C.Y.; Vergara, C.; Ontivero, E.; Banchig, M.; Navas, A.L.; Herrera-Morata, M.A. & Quiroga, L.B. 2015. Thermal ecology of the post—metamorphic Andean toad (*Rhinella spinulosa*) at elevation in the monte desert, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 52: 52-57.
35. Rowley, J.J.L. & Alford, R.A. 2007. Non-contact infrared thermometers can accurately measure amphibian body temperatures. *Herpetological Review* 38: 308-316.
36. Lutterschmidt, W.I. & Hutchison, V.H. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1561-1574.
37. Perotti, M.G.; Bonino, M.F.; Ferraro, D. & Cruz, F.B. 2018. How sensible are cold temperate tadpoles to climate change? Combining thermal physiology and niche models. *Zoology* 127: 95-105.
38. Gallina Tessaro, S. & López González, C. 2011. *Manual de Técnicas para el Estudio de la Fauna*. Universidad Autónoma de Querétaro e Instituto de Ecología. AC México.
39. Sinsch, U. & Leskovar, C. 2011. Does thermoregulatory behaviour of green toads (*Bufo viridis*) constrain geographical range in the west? A comparison with the performance of syntopic natterjacks (*Bufo calamita*). *Journal of Thermal Biology* 36: 346-354.
40. Bonino, M.F.; Cruz, F.B. & Perotti, M.G. 2020. Does temperature at local scale explain thermal biology patterns of temperate tadpoles? *Journal of Thermal Biology* 94: 102744. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102744>.
41. Perotti, M.G.; Jara, F.G. & Úbeda, C.A. 2011. Adaptive plasticity of life-history traits to pond drying in three species of Patagonian anurans. *Evolutionary Ecology Research* 13: 415-429.
42. Rowe, C.L. & Dunson, W.A. 1995. Impacts of hydroperiod on growth and survival of larval amphibians in temporary ponds of Central Pennsylvania, USA. *Oecologia* 102: 397-403.
43. Amburgey, S.; Funk, W.C.; Murphy, M. & Muths, E. 2012. Effects of hydroperiod duration on survival, developmental rate, and size at metamorphosis in Boreal Chorus Frog tadpoles (*Pseudacris maculata*). *Herpetologica* 68: 456-467.
44. O'Neill, K.M.; Street, D. & O'Neill, R.P. 1994. Scavenging behavior of grasshoppers (Orthoptera: Acrididae): feeding and thermal response to newly available resources. *Physiological and Chemical Ecology* 23: 1260-1268.

45. Navas, C.A. 1996. Thermal dependency of field locomotor and vocal performance of high-elevation anuran in the tropical Andes. *Journal of Herpetology* 30: 478-487.
46. Rodríguez, C.Y.; Bustos, D.A. & Sanabria, E.A. 2019. Adaptation of the Andean Toad *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) at low temperatures: The role of glucose as cryoprotectant. *Physiological and Biochemical Zoology* 92: 473-480.
47. Medina, M.; Gutierrez, J.; Scolari, A. & Ibargüengoytia, N. 2009. Thermal response to environmental constraint in two populations of the oviparous lizard *Liolaemus bibronii* in Patagonia, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 34: 32-40.
48. Ibargüengoytia, N.; Medina, M.; Fernández, J.B.; Gutiérrez, J. A.; Tappari, F. & Scolari, A. 2010. Thermal biology of the southernmost lizard in the world: *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus* from Patagonia, Argentina. *Journal of Thermal Biology* 35: 21-27.
49. Weathers, W.W. & Sullivan, K.A. 1993. Seasonal patterns of time and energy allocation by birds. *Physiological Zoology* 66: 511-536.
50. Bozinovic, F.; Lagos, J.A.; Vasquez, R.A. & Kenagy, G.J. 2000. Time and energy use under thermoregulatory constraints in diurnal rodent. *Journal of Thermal Biology* 25: 251-256.
51. Tracy, R.C. 1976. A model of the dynamic exchange of water and energy between a terrestrial amphibian and its environment. *Ecological Monographs* 46: 293-326.
52. Tracy, R. 1976. A model of the dynamic exchange of water and energy between a terrestrial amphibian and its environment. *Ecological Monographs* 46: 293-326.
53. Navas, C.A. & Araujo, C. 2000. The use of agar models to study amphibian thermal ecology. *Journal of Herpetology* 32: 330-334.
54. Bartelt, P.E. & Peterson, C.R. 2005. Physically modeling operative temperatures and evaporation rates in amphibians. *Journal of Thermal Biology* 30: 93-102.
55. Tracy, R.C.; Betts, G.; Tracy, R.C. & Christian, K.A. 2007. Plaster models to measure operative temperature and evaporative water loss of amphibians. *Journal of Herpetology* 41: 597-603.
56. Dzialowski, E.M. 2005. Use of operative temperature and standard operative temperature models in thermal biology. *Journal of Thermal Biology* 30: 317-334.
57. Cowles, R.B. & Bogert, C.M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Iguana* 83: 261-296.
58. Huey, R.B. & Stevenson, R.D. 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A discussion of approaches. *American Zoology* 19: 357-366.
59. Pough, F.H. & Wilson, R.E. 1970. Natural daily temperature stress, dehydration, and acclimation in juvenile *Ambystoma maculatum* (Shaw) (Amphibia: Caudata). *Physiology and Zoology* 43: 194-205.
60. Claussen, D. 1969. Thermal acclimation in ambystomatid salamanders. *Comparative Biochemistry and Physiology* 58A: 333-340.
61. Cupp, P. 1980. Thermal tolerance of five salientian amphibians during development and metamorphosis. *Herpetologica* 36: 234-244.
62. Hutchinson, V.H. 1961. Critical thermal maxima in salamanders. *Physiological Zoology* 2: 92-125.
63. Hutchinson, V.H. & Kosh, R.J. 1964. The effect of photoperiod on the critical thermal maxima of painted turtles (*Chrysemys picta*). *Herpetologica* 20: 233-238.
64. Hutchinson, V.H. & Ferrance, M.R. 1970. Thermal tolerances of *Rana pipiens* acclimated to daily temperature cycles. *Herpetologica* 23: 1-8.
65. Sanabria, E.A. & Quiroga, L.B. 2011. Change in the thermal biology of tadpoles of *Odontophrynus occidentalis* from the Monte desert, Argentina: Responses to photoperiod. *Journal of Thermal Biology* 36: 288-291.
66. Erskine, D.J. & Hutchinson, V.H. 1982. Reduced thermal tolerance in an amphibian treated with melatonin. *Journal of Thermal Biology* 7: 121-123.
67. Sanabria, E.A. & Quiroga, L.B. 2011a. Thermal parameters changes in males of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) related to reproductive periods. *Revista de Biología Tropical* 59: 347-353.
68. Quiroga, L.B.; Sanabria, E.A.; Fornés, M.W.; Bustos, D.A. & Tejedo, M. 2019. Sublethal concentrations of chlorpyrifos induce changes in the thermal sensitivity and tolerance of anuran tadpoles in the toad *Rhinella arenarum*? *Chemosphere* 219: 671-677.
69. Katzenberger, M.; Hammond, J.; Duarte, H.; Tejedo, M.; Calabuig, C.; Relyea, R.A.; 2014.

Swimming with predators and pesticides: how environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. *PlosOne* 9: e98265.

70. Miloch, D.; Leynaud, G.C.; Bonino, M.; Lescano, J.N.; Cruz, F.B.; Perotti, M.G. 2019. Los depredadores afectan la fisiología térmica de larvas de anuros? Estudio experimental en dos especies del género *Pleurodema*. XX Congreso Argentino de Herpetología. 15-18 de octubre de 2019, San Juan, Argentina.
71. Manis, M.L. & D.L.; Claussen. 1986. Environmental and genetic influences on the thermal physiology of *Rana sylvatica*. *Journal of Thermal Biology* 11: 31-36.
72. Hill, R.; Wyse, G. & Anderson, M. 2006. Fisiología Animal. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
73. Costanzo, J.P.; Lee, R.E. & Wright, M.F. 1991. Effect of cooling rate on the survival of frozen wood frogs. *Journal of Comparative Physiology B* 161: 225-229.
74. Costanzo, J.P. & Lee, R.E. 2013. Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates. *Journal of Experimental Biology* 216: 1961-1967.
75. Tejedo, M.; Duarte, H.; Guiérrez-Pesquera, L.M.; Beltran, J.F.; Katzenberger, M.; Marangoni, F.; Navas, C.A.; Nicieza, A.G.; Relyea, R.A.; Rezende, E.L.; Richter-Boix, A.; Santo, M.; Simon, M. & Solé, M. 2012. El estudio de las tolerancias térmicas para el examen de hipótesis biogeográficas y de la vulnerabilidad de los organismos ante el calentamiento global. Ejemplos en anfibios. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española* 23: 2-27
76. Tracy, R.C.; Christian, K.A.; O'Connor, M.P. & Tracy, C.E. 1993. Behavioral thermoregulation by *Bufo americanus*: The importance of the hydric environment. *Herpetologica* 49: 375-382.
77. Herczeg, G.; Herrero, A.; Saarikivi, J.; Gonda, A.; Jäntti, M. & Merilä, J. 2008. Experimental support for the cost-benefit model of lizard thermoregulation: the effects of predation risk and food supply. *Oecologia* 155: 1-10.
78. Crowley, S.R. 1985. Thermal sensitivity of sprint-running in the lizard *Sceloporus undulatus*: support for a conservative view of thermal physiology. *Oecologia* 66: 219-225.
79. van Berkum, F.H.; 1986. Evolutionary patterns of the thermal sensitivity of sprint speed in *Anolis* lizards. *Evolution* 40: 594-604.
80. Hochachka, P.W. & Somero, G.N. 1973. Strategies of Biochemical Adaptation. WB Saunders, Philadelphia.
81. Pörtner, H.O. 2012. Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Marine Ecology Progress Series* 470: 273-290.
82. Huey, R.B. & Stevenson, R.D. 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. *American Zoologist* 19: 357-366.
83. Huey, R.B. & Hertz, P.E. 1984. Is a jack-of-all-temperatures a master of none? *Evolution* 38: 441-444.
84. Marvin, G.A. 2003. Aquatic and terrestrial locomotor performance in a semiaquatic plethodontid salamander (*Pseudotriton ruber*): influence of acute temperature, thermal acclimation, and body size. *Copeia* 2003: 704-713.
85. Titon Jr., B. ; Navas, C.A.; Jim, J. & Gomes, F.R. 2010. Balance hídrico y rendimiento locomotor en tres especies de sapos neotropicales que difieren en distribución geográfica. *Bioquímica Comparativa y Fisiología A: Fisiología molecular e integrativa* 156: 129-135.
86. Gilchrist, G.W. 1995. Specialist and generalist in changing environments. 1. Fitness landscapes of thermal sensitivity. *American Naturalist* 146: 252-270.