



Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da

Biodiversidade – PPGE CB

GABRIELA ALVES FERREIRA

IMPACTOS DE ESTRESSORES ANTROPOGÊNICOS: AVALIANDO O
EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO E DO HERBICIDA GLIFOSATO
SOBRE LARVAS DE ANFÍBIOS

Ilhéus, Bahia

Abril de 2021

GABRIELA ALVES FERREIRA

IMPACTOS DE ESTRESSORES ANTROPOGÊNICOS: AVALIANDO O
EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO E DO HERBICIDA GLIFOSATO
SOBRE LARVAS DE ANFÍBIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ecologia e Conservação da Biodiversidade da
Universidade Estadual de Santa Cruz para obtenção do
título de Mestra em Ecologia e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Mirco Solé

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Katzenberger

Ilhéus, Bahia

Abril de 2021

F383

Ferreira, Gabriela Alves.

Impactos de estressores antropogênicos: avaliando o efeito do estresse térmico e do herbicida glifosato sobre larvas de anfíbios / Gabriela Alves Ferreira. – Ilhéus, BA: UESC, 2021.

106 f. : il.

Orientador: Mirco Solé.

Coorientador: Marco Katzenberger

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade.

Inclui referências.

1. Toxicologia ambiental. 2. Morfologia (Animais). 3. Girinos. 4. Mudanças climáticas. I. Título.

CDD 571.95

GABRIELA ALVES FERREIRA

**IMPACTOS DE ESTRESSORES ANTROPOGÊNICOS: AVALIANDO O
EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO E DO HERBICIDA GLIFOSATO
SOBRE LARVAS DE ANFÍBIOS**

Dr. Caio Vinícius Mira-Mendes

Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC

Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Dr. Iuri Ribeiro Dias

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC

Dr. Márcio Borba da Silva

Universidade Federal da Bahia -UFBA

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido realizado sem a colaboração de diversas pessoas que os mistérios do planeta me levaram a conhecer ao longo deste trajeto. Todas as coincidências e pessoas que surgiram neste caminho me fazem pensar em uma frase do Carl Sagan: "Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir uma época e um planeta com vocês." Penso nessa frase como um modo de agradecer a todas e todos que estiveram presentes neste processo e auxiliaram na construção deste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

Agradeço ao PPG em Ecologia e Conservação da Biodiversidade pelo acolhimento e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento concedido através de uma bolsa de estudos que permitiu dedicação exclusiva à minha pesquisa. Desejo, que mesmo em meio aos desmontes que a ciência vem sofrendo no atual governo, muitos outros estudantes ainda tenham acesso a bolsas de estudos e à educação pública de qualidade.

Agradeço a minha mãe, Suelene Alves Pio, e aos meus avós, Zuleica Alves Pio e Benedito Alves Pio, que sempre fizeram o possível e o impossível para propiciar acesso a estudo, livros e educação a mim e à minha irmã. Por falar nela, gostaria de agradecer a Daniela Alves Ferreira, por sempre estar ao meu lado e por ser essa pessoa incrível que transmite paz apenas pela presença e ao meu primo, Bruno Alves Lacerda, que está sempre a postos para arrancar um sorriso. Agradeço também ao meu pai, Vagner José Ferreira, que infelizmente partiu para outro plano durante o meu mestrado em outubro de 2020 e que de alguma forma contribuiu para a pessoa que sou hoje. Obrigada por me apoiarem nesta jornada e sempre me incentivarem a seguir em frente. Vocês são minha maior motivação para o empenho que dedico a todas as coisas.

Agradeço ao meu orientador da graduação, o professor Dr. Fausto Nomura, por ter me iniciado no caminho da ciência e por me guiar na incrível jornada do cientista. Também gostaria de deixar um agradecimento especial ao meu orientador do mestrado, o professor Dr. Mirco Solé, por ter me acolhido de braços abertos na Bahia e por ter me guiado no desenvolvimento de minha autonomia como pesquisadora. Aproveito também para agradecer ao meu co-orientador, o professor Dr. Marco Katzenberger, por sempre estar aberto a ouvir ideias e por me auxiliar no desenvolvimento das mesmas. Muito obrigada por confiarem em meu trabalho e por me darem oportunidade de explorar minhas curiosidades científicas. Minha enorme e eterna gratidão a vocês! Vocês são pessoas admiráveis.

Agradeço especialmente aos meus “mentores” do mestrado: Dr. Danilo Fortunato, Dr. Renan Nunes Costa e ao Dr. Iuri Dias que sempre estiveram dispostos a ouvir e ajudar no que fosse preciso. Esse incentivo é muito importante para nós que estamos iniciando o caminho da ciência. Gostaria de dedicar algumas palavras especialmente ao Danilo. Dan, seus conselhos e puxões de orelha me tornam uma pesquisadora melhor. Obrigada por me ajudar durante todo o mestrado, auxiliando no planejamento de projetos, nas minhas dúvidas estatísticas (que são muitas), por ter paciência (quase sempre rrsrs) para me ajudar em análises no R e por me ajudar a melhorar minha escrita. Obrigada por tudo meu irmão/amigo/mentor!

Não posso deixar de agradecer aos queridos amigos e colegas que o Programa de Pós Graduação em Ecologia e o Tropical Herpetology Lab me trouxeram. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de conhecer e conviver com todos vocês. Não citarei nomes pelo risco de esquecer alguém, dada a minha “incrível” capacidade de memorizar coisas. Para vocês amigos, o meu muito obrigado.

Paula Caetano, você merece um parágrafo exclusivo. Obrigada por ter sido minha companhia em todos os momentos deste mestrado, por me suportar emocionalmente e alegrar meus dias, você foi um presente da Bahia em minha vida. Juntas enfrentamos tantas aventuras,

que tenho certeza que não seriam tão emocionantes se não fosse com você. Que essa parceria/irmandade ainda renda muitas boas histórias.

Também quero agradecer a minha amiga Fernanda Guimarães Fava, que também foi um presente do universo. Fer, eu aprendi e cresci muito com você, tanto como pesquisadora quanto como pessoa. As nossas parcerias acadêmicas e discussões ecológicas e científicas me ensinaram muito e me ajudaram a entender de forma mais clara o processo de fazer ciência. Obrigada por tudo! Que a vida pós pandemia nos propicie muitos bons encontros.

Aproveito também para agradecer ao meu querido amigo, Omar Rojas- Padilla, que esteve ao meu lado me apoiando antes mesmo de entrar no mestrado e foi um grande incentivador para que eu permanecesse no caminho da ciência. Omar, obrigada por ter me aconselhado nos momentos de desespero, por ter segurado minha mão e não ter me deixado desistir. Você é uma pessoa super incrível! Lhe admiro imensamente.

Agradeço aos colegas que não mediram esforços para me ajudar em campo na procura pelos girinos: Fernanda, Neto, Marcelo, Will, entre outros. Em especial, gostaria de agradecer ao Teco (Wallace Carvalho), um amigo querido que nos acompanhou em diversas coletas e esteve sempre muito disposto a ajudar na caça aos sapos.

Agradeço às professoras e aos professores que tive ao longo de toda minha vida e que com certeza contribuíram imensamente para minha formação. Vocês foram fundamentais para minha construção pessoal e intelectual. Obrigada por despertar minha curiosidade e me mostrar que existe todo um universo de conhecimento a ser explorado. Tenho muito orgulho de ter cursado toda a minha educação em escolas e universidades públicas e sou muito grata pela oportunidade de ter tido acesso a um ensino de qualidade.

Agradeço a todos aqueles que auxiliaram na construção da pessoa que sou hoje e que tornaram possível a realização deste trabalho, mas que não estão aqui citados.

Agradeço a todos os profissionais de saúde que estão a postos dia e noite para tentar conter a terrível crise sanitária que estamos vivendo no Brasil, em meio a epidemia do Coronavírus.

Por fim, agradeço a oportunidade de cursar um mestrado, chance concedida pela primeira vez à minha família. Agradeço ao ensino público de qualidade ao qual temos acesso no Brasil, mesmo sendo esse um país no qual a desigualdade nos salta aos olhos. Agradeço a toda a população brasileira que mantém as Universidades públicas com seu suor, trabalho duro e impostos. Espero, por meio deste trabalho, poder retribuir o privilégio de cursar uma pós graduação em uma universidade pública.

“The third meaning of magic is the one I mean in my title: poetic magic. We are moved to tears by a beautiful piece of music and we describe the performance as magical. We gaze up at the stars on a dark night with no moon and no city lights and, breathless with joy, we say the sight is ‘pure magic’. We might use the same word to describe a gorgeous sunset, or an alpine landscape, or a rainbow against a dark sky. In this sense, ‘magical’ simply means deeply moving, exhilarating: something that gives us goose bumps, something that makes us feel more fully alive. What I hope to show you is that reality - the facts of the real world as understood through the methods of science - are magical in this third sense, the poetic sense, the good-to-be-alive sense.”

The Magic of Reality: How We Know What's Really True

— Richard Dawkins

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

— Carl Sagan

Dedicado a minha família.

Sumário

Agradecimentos	4
Resumo	13
Abstract	15
Introdução geral	17
Referências bibliográficas	21
Capítulo 1. Efeitos da temperatura no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de anfíbios: padrões macroecológicos e evolutivos	26
Resumo	28
Abstract	29
Introdução	30
Material e métodos	33
Resultados	37
Discussão	40
Conclusão	43
Referências bibliográficas	44
Figuras e tabelas	56
Material suplementar	64
Código R para meta-análise e análises filogenéticas	72
Capítulo 2. Como o glifosato e o estresse térmico afetam a sobrevivência, desenvolvimento e tolerância térmica em girinos de <i>Boana faber</i> (Hylidae, Anura)?	77
Resumo	79
	11

Abstract	80
Introdução	81
Material e Métodos	84
Resultados	89
Discussão	90
Conclusão	93
Referências bibliográficas	94
Figuras e tabelas	101
Conclusão geral	105

RESUMO

Estressores antropogênicos como mudanças climáticas e poluição dos ambientes aquáticos têm afetado negativamente a persistência das espécies. No entanto, para lidar com os ambientes estressantes, os organismos podem exibir diversas respostas adaptativas, sendo capazes de regular seu comportamento e funções fisiológicas para se ajustar à gama de condições ambientais que podem encontrar na natureza. Para as larvas de anfíbios, por exemplo, espera-se que exista grande potencial para exibir plasticidade fenotípica em características como taxa de crescimento e tempo até a metamorfose em resposta a ambientes estressantes. Neste contexto, esta dissertação teve o objetivo principal de avaliar os efeitos letais e subletais da exposição ao herbicida Glifosato (Roundup Original DI) e ao estresse térmico em larvas de anfíbios. No capítulo 1, exploramos os padrões gerais do efeito de temperaturas mais altas na sobrevivência e desenvolvimento de girinos utilizando técnicas meta-analíticas. No capítulo 2, avaliamos como a sobrevivência, crescimento, morfologia e tolerância térmica de girinos de sapo martelo (*Boana faber*) são afetados pela exposição ao herbicida glifosato e a temperaturas constantes mais altas. Os resultados mostram que espécies que habitam locais mais variáveis climaticamente (e.g. região temperada) são menos afetadas pelas mudanças climáticas do que espécies tropicais. Também observamos que embora os traços avaliados (crescimento, taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento) sejam lábeis e tenham potencial para responder adaptativamente, o tempo necessário para sua evolução é relativamente extenso. Nossos achados indicam que parece haver um efeito aditivo da temperatura junto ao herbicida Roundup sobre a sobrevivência das larvas. Também observamos efeitos pronunciados da exposição ao Roundup no crescimento e na forma de girinos de *Boana faber*. A compreensão de como as alterações antrópicas afetam a persistência dos anuros é fundamental para o manejo e conservação das espécies e pode ser considerado um

passo inicial para orientar medidas que mitiguem parte do efeito de estressores antropogênicos sobre a biodiversidade.

Palavras- chave: ecotoxicologia, ecomorfologia, girinos, mudanças climáticas.

ABSTRACT

Anthropogenic stressors such as climate change and pollution of aquatic environments have negatively affected the species' persistence. However, to cope with stressful environments, organisms can exhibit various adaptive responses, being able to regulate their behavior and physiological functions to adjust to the range of environmental conditions they may encounter in nature. For amphibian larvae, for example, it is expected that there is great potential for exhibiting phenotypic plasticity in characteristics such as growth rate and time to metamorphosis in response to stressful environments. In this context, this dissertation had the main objective of evaluating the lethal and sublethal effects of exposure to the herbicide Glyphosate (Roundup Original DI) and to thermal stress in amphibian larvae. In chapter 1, we explored the general patterns of the effect of higher temperatures on tadpole survival and development using meta-analytical techniques. In chapter 2, we assessed how the survival, growth, morphology and thermal tolerance of hammerhead frog (*Boana faber*) tadpoles are affected by exposure to the herbicide glyphosate and at constant higher temperatures. The results show that species that inhabit more climatically variable locations (e.g. temperate region) are less affected by climate change than tropical species. We also observed that although the traits evaluated (growth, growth rate and development time) are labile and have the potential to respond adaptively, the time required for their evolution is relatively long. Our findings indicate that there appears to be an additive effect of temperature with the herbicide Roundup on larvae survival. We also observed pronounced effects of exposure to Roundup on the growth and shape of *Boana faber* tadpoles. Understanding how anthropogenic changes affect the anurans' persistence is fundamental for the management and conservation of species and can be considered an initial step to guide measures that mitigate part of the effect of anthropogenic stressors on biodiversity.

Keywords. ecotoxicology, ecomorphology, tadpoles, climate change.

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos paleoclimáticos mostram que mudanças no clima já foram registradas repetidas vezes ao longo da história geológica da Terra, resultado dos ciclos de resfriamento e aquecimento (Ciclos de Milankovitch) que ocorreram em amplas escalas de tempo (Alley et al. 2003, Hof et al. 2011). A partir do período pré-industrial, no entanto, atividades humanas como queima de combustíveis fósseis e alteração no uso e ocupação do solo, interferiram no equilíbrio do sistema climático da Terra de modo abrupto, gerando um aumento acelerado e desenfreado na emissão de gases de efeito estufa e implicando no rápido aquecimento do planeta. Como consequência, um aumento de 0.6° C na temperatura média já foi registrado para o século 20 (IPCC 2013) e previsões recentes sugerem incrementos de 1.5 °C até 2100 (IPCC 2018).

O modo como as espécies responderam às alterações no clima no passado e no presente pode auxiliar na previsão de como as espécies irão responder às mudanças previstas para o futuro (Hof et al. 2011). Neste contexto, a comunidade científica tem reunido esforços para compreender esses impactos, mas devido a singularidade biológica de cada espécie e do efeito assimétrico das alterações climáticas em diferentes locais e regiões (Janzen 1967, Ghalambor et al. 2006, Bozinovic et al. 2011), prever os impactos das mudanças climáticas pode ser complexo.

O efeito da temperatura pode variar em função da distribuição geográfica e altitudinal das espécies (Freitas et al. 2010, Turriago et al. 2015). Vários trabalhos que analisam a variação de parâmetros fisiológicos com a latitude, mostram que espécies expostas a maiores variações sazonais de temperatura (e.g. latitudes mais altas) possuem maior potencial de se adaptar às mudanças climáticas futuras do que aquelas expostas a pequenas variações na temperatura ao

longo do ano (Janzen 1967, Ghalambor et al. 2006, Bozinovic et al. 2011, Sunday et al. 2011, 2012, 2014, Duarte et al. 2012, Gutiérrez-Pesquera et al. 2016). Assim, espera-se que a tolerância térmica das espécies esteja ligada à variação de temperatura que os organismos experimentam ao longo de sua evolução (Denny et al. 2009, Hoffmann 2009, Bozinovic et al. 2011, Kingsolver et al., 2011, Buckley e Huey 2016). Além disso, a susceptibilidade das espécies ao clima pode estar relacionada ao conservadorismo em características fisiológicas dependentes do clima, conseqüentemente, resultando em maior similaridade na resposta de espécies mais próximas filogeneticamente (Losos 2008, Araújo et al. 2013).

Devido à forte associação entre as características fisiológicas, comportamentais e de história de vida dos anfíbios com a temperatura, eles podem ser particularmente sensíveis ao aquecimento global (Blaustein et al. 2010, Hoffmann et al. 2010). Estima-se que o grupo possua mais de 40% das espécies em alguma categoria de ameaça (Hoffman et al. 2010) e que milhares já tenham sido extintas. As mudanças climáticas têm sido apontadas como possíveis causadores do declínio dos anfíbios (Wake e Vredenburg 2008), apesar de outras pressões antrópicas como perda e fragmentação de habitats, contaminação de ambientes e doenças emergentes possam estar atuando de forma conjunta com alterações climáticas nos declínios populacionais dos representantes do grupo (Blaustein et al. 2010). Portanto, prever a resposta dos anfíbios ao clima pode ser complexo porque os impactos induzidos pelo aumento da temperatura podem interagir com os efeitos advindos de outras mudanças ambientais (Pörtner e Farrell 2008), como a poluição dos habitats aquáticos por contaminantes químicos, por exemplo.

Estudos mostram que os contaminantes químicos, assim como a temperatura, também podem impactar os anfíbios, já que diversas espécies utilizam o ambiente aquático para deposição dos ovos e desenvolvimento das larvas, podendo ser expostas aos diversos tipos de herbicidas e pesticidas tanto pela pulverização direta quanto pelo escoamento superficial

(Moutinho et al. 2020). A exposição a esses contaminantes pode afetar diversos aspectos das larvas de anuros, como comportamento, desenvolvimento, crescimento, tempo até a metamorfose e níveis de atividade (e.g. Bridges 1999, Relyea 2005, Jones et al. 2010, Egea-Serrano et al. 2012, Costa e Nomura 2016, Bolis et al. 2020). Prever o impacto desse estressor, no entanto, pode ser complexo, porque interações com condições abióticas como, temperatura e pH podem alterar a sua toxicidade e seu modo de ação (Rand 1995).

As larvas de anfíbios são excelentes modelos para estudos que buscam investigar como estressores antrópicos afetam a morfologia e o desenvolvimento dos organismos. Isso acontece porque os girinos possuem capacidade de dispersão altamente limitada e restrita aos ambientes escolhidos pelos parentais, o que os obriga a se comportar como termoconformadores nos ambientes em que vivem (Balogová e Gvoždík 2015). Para lidar com os ambientes variáveis, no entanto, os girinos podem ser capazes de regular seu comportamento e funções fisiológicas para se ajustar à gama de condições ambientais que podem encontrar na natureza (McDiarmid e Altig 1999). Nesse sentido, características como tempo até a metamorfose e comprimento corporal podem ter grande potencial para exibir plasticidade fenotípica em resposta a ambientes em mudança (McDiarmid e Altig 1999). Larvas se desenvolvendo em ambientes estressantes (e.g. habitats contaminados por agrotóxicos ou poças rasas e aquecidas prestes a secar), por exemplo, tendem a se metamorfosear mais rápido para encontrar um microclima terrestre favorável (Navas et al. 2007). No entanto, atingem a metamorfose com menor comprimento do que coespecíficos criados a temperaturas mais baixas. Portanto, mesmo que a plasticidade possa ser uma forma de escapar de ambientes em mudança, também podem existir custos fisiológicos e morfológicos associados à mesma (Auld et al. 2010, Gomez- Mestre et al. 2013), como aumento de anormalidades morfológicas e mudanças no comportamento dos girinos (e.g. Bridges 1999, Chen et al. 2007, Costa e Nomura 2016, Bolis et al. 2020). A longo prazo, esses

custos podem acarretar na redução do fitness dos indivíduos levando a diminuição da população (Møller 1997).

Nesta dissertação exploramos os efeitos das mudanças climáticas em larvas de anfíbios através das lentes da plasticidade fenotípica, focando na respostas letais e subletais de girinos expostos a ambientes estressantes. No capítulo 1 intitulado **“Efeitos da temperatura no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de anfíbios: padrões macroecológicos e evolutivos”**, exploramos o efeito de temperaturas mais altas na sobrevivência e desenvolvimento de girinos utilizando técnicas meta-analíticas. Avaliamos também se a variabilidade climática no local onde a população ocorre pode explicar diferenças no efeito da temperatura entre estudos e se a resposta a temperatura é conservada filogeneticamente.

No capítulo 2, intitulado **“Como o glifosato e o estresse térmico afetam a sobrevivência, crescimento e tolerância térmica em girinos de *Boana faber* (Hylidae, Anura)?”** nosso objetivo foi avaliar como a sobrevivência, crescimento, morfologia e tolerância térmica de girinos de sapo-martelo (*Boana faber*) são afetados pela exposição ao herbicida Glifosato (Roundup Original DI) e a temperaturas constantes mais altas. A compreensão de como alterações antrópicas no ambiente afetam a persistência dos anuros é fundamental para o manejo e conservação das espécies. Para prever e tentar mitigar ao menos parte dos impactos dessas ameaças nos anfíbios, é preciso primeiro identificar quais espécies são mais sensíveis e como elas respondem a essas ameaças. Somente a partir da síntese entre estudos experimentais, história evolutiva e ecologia seremos capazes de fazer previsões mais realistas sobre o impacto destes estressores na biodiversidade.

REFERÊNCIAS

- Auld, J. R. et al. 2010. Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277: 503–511.
- Alley, R. B. et al. 2003. Abrupt climate change. - *Science* (80-.). 299: 2005–2010.
- Araújo, M. B. et al. 2013. Heat freezes niche evolution. - *Ecol. Lett.* 16: 1206–1219.
- Balogová, M. e Gvoždík, L. 2015. Can newts cope with the heat? Disparate thermoregulatory strategies of two sympatric species in water. - *PLoS One* 10: 1–12.
- Blaustein, A. R. et al. 2010. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations. - *Diversity* 2: 281–313.
- Bolis, A. et al. 2020. Exposure during embryonic development to Roundup® Power 2.0 affects lateralization, level of activity and growth, but not defensive behaviour of marsh frog tadpoles. - *Environ. Pollut.* 263: 114395.
- Bozinovic, F. et al. 2011. Physiological correlates of geographic range in animals. - *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* in press.
- Bridges, C. M. 1999. Effects of a Pesticide on Tadpole Activity and Predator Avoidance Behavior. - *J. Herpetol.* 33: 303–306.
- Buckley, L. B. e Huey, R. B. 2016. How extreme temperatures impact organisms and the evolution of their thermal tolerance. - *Integr. Comp. Biol.* 56: 98–109.
- Chen, T. H. et al. 2007. Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern leopard frogs (*Rana pipiens*). - *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 1470–1475.

- Costa, R. N. e Nomura, F. 2016. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. - *Hydrobiologia* 765: 85–96.
- Denny, M. W. et al. 2009. On the prediction of extreme ecological events. - *Ecol. Monogr.* 79: 397–421.
- Duarte, H. et al. 2012. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. - *Glob. Chang. Biol.* 18: 412–421.
- Egea-Serrano, A. et al. 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: A meta-analytic review. - *Ecol. Evol.* 2: 1382–1397.
- Freitas, V. et al. 2010. Temperature tolerance and energetics: A dynamic energy budget-based comparison of North Atlantic marine species. - *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365: 3553–3565.
- Ghalambor, C. K. et al. 2006. Are mountain passes higher in the tropics? Janzen's hypothesis revisited. - *Integr. Comp. Biol.* 46: 5–17.
- Gomez-Mestre, I. et al. 2013. Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. - *PLoS One* 8: 1–12.
- Gutiérrez-Pesquera, L. M. et al. 2016. Testing the climate variability hypothesis in thermal tolerance limits of tropical and temperate tadpoles. - *J. Biogeogr.* 43: 1166–1178.
- Hof, C. et al. 2011. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. - *Nature* 480: 516–519.

- Hoffmann, A. A. 2009. Physiological climatic limits in *Drosophila*: Patterns and implications. - *J. Exp. Biol.* 213: 870–880.
- Hoffmann, M. et al. 2010. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. - *Science* (80-). 330: 1503–1509.
- IPCC. 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* (T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P. M. Midgley, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY.
- IPCC. 2018. *Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty* [V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.)].
- Janzen, D. H. 1967. Why mountain passes are higher in the tropics. - *Am. Nat.* 101: 233–249.
- Jones, D. K. et al. 2010. Roundup® and amphibians: The importance of concentration, application time, and stratification. - *Environ. Toxicol. Chem.* 29: 2016–2025.
- Kingsolver, J. G. et al. 2011. Complex life cycles and the responses of insects to climate change. - *Integr. Comp. Biol.* 51: 719–732.

- Losos, J. B. 2008. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. - *Ecol. Lett.* 11: 995–1003.
- McDiarmid, R. W. e Altig, R. 1999. Tadpoles: the biology of anuran larvae.
- Moutinho, M. F. et al. 2020. Herbicides employed in sugarcane plantations have lethal and sublethal effects to larval *Boana pardalis* (Amphibia, Hylidae). - *Ecotoxicology* 29: 1043–1051.
- Møller, A. P. 1997. Developmental Stability and Fitness : A Review. - *Am. Nat.* 149: 916–932.
- Navas, C. A. et al. 2007. Physiological basis for diurnal activity in dispersing juvenile *Bufo granulosus* in the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. - *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 147: 647–657.
- Pörtner, H. O. e Farrell, A. P. 2008. Physiology and Climate Change. - *Science* (80-.). 322: 690–692.
- Rand, G. 1995. Fundamentos de toxicología acuática: efectos, destino ambiental y evaluación de riesgos.
- Relyea, R. A. 2005. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. - *Ecol. Appl.* 15: 1118–1124.
- Sunday, J. M. et al. 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278: 1823–1830.
- Sunday, J. M. et al. 2012. Thermal tolerance and the global redistribution of animals. - *Nat. Clim. Chang.* 2: 686–690.

Sunday, J. M. et al. 2014. Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 5610–5615.

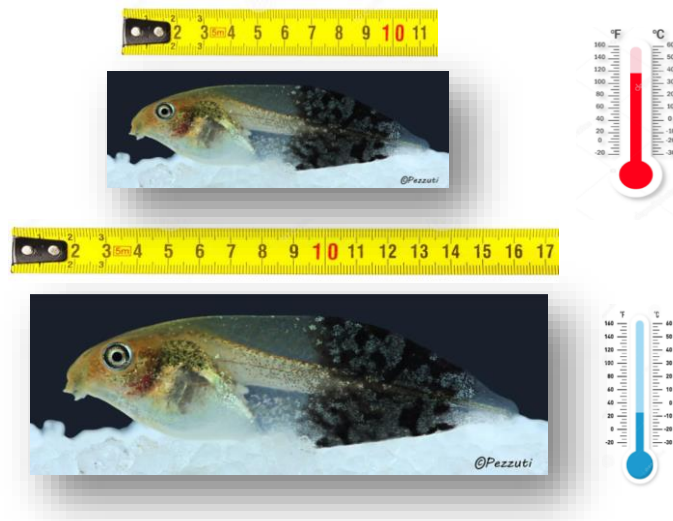
Turriago, J. L. et al. 2015. Upper thermal tolerance in anuran embryos and tadpoles at constant and variable peak temperatures. - *Can. J. Zool.* 93: 267–272.

Wake, D. B. e Vredenburg, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2: 27–44.

CAPÍTULO 1

Efeitos da temperatura no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de anfíbios: padrões macroecológicos e evolutivos

Gabriela Alves Ferreira, Danilo de Siqueira Fortunato, Fernanda Guimarães Fava, Marco Katzenberger
e Mirco Solé



Manuscrito a ser submetido no periódico Journal of Thermal Biology

**Efeitos da temperatura no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de anfíbios:
padrões macroecológicos e evolutivos**

Gabriela Alves Ferreira ^{1,2*}, Danilo de Siqueira Fortunato ³, Fernanda Guimarães Fava ¹, Marco Katzenberger ⁴ e Mirco Solé ^{1,5}

1. Tropical Herpetology Lab, Programa de Pós- Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade. Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brazil.

2. Kunhã Asé Network of Women in Science, Salvador, Brazil.

3. Departamento de Ecologia, ICB, Universidade Federal de Goiás. Campus II (Samambaia), 74690-900. Goiânia, Goiás, Brazil.

4. Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva, Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

5. Herpetology Section, Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig, Adenauerallee 160, 53113 Bonn, North Rhine-Westphalia, Germany.

**Autora correspondente: Gabriela Alves Ferreira, e-mail: gabriela-alves77@hotmail.com*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5661-3381>

Resumo. A temperatura dita o ritmo de diversos processos bioquímicos e fisiológicos nos anfíbios, afetando por exemplo, o tempo até a metamorfose e o comprimento total de girinos. O efeito da temperatura é assimétrico entre as espécies, e parte desta variação pode estar relacionada às suas distribuições geográficas. Por outro lado, a variação na resposta à temperatura pode estar ligada à relação de parentesco entre as espécies. Aqui, exploramos os padrões gerais do efeito de temperaturas constantes mais altas na sobrevivência e desenvolvimento de girinos, utilizando técnicas meta-analíticas. Avaliamos também se a variabilidade climática no local de coleta de desova pode explicar diferenças no efeito da temperatura entre os estudos e se a resposta à temperatura é conservada filogeneticamente. Nossos resultados mostram que girinos e embriões que se desenvolvem em temperaturas relativamente mais altas atingem a metamorfose e a eclosão mais cedo e que espécies tropicais são mais afetadas pelas temperaturas mais altas. O valor de K de Blomberg indica que ao menos parte dos traços avaliados podem ser considerados lábeis em resposta ao aumento da temperatura, sugerindo que essas características evoluem rápido e se adaptam a ambientes instáveis. No entanto, nossos resultados mostram que apesar das espécies conseguirem se adaptar, o tempo necessário para que a evolução dos atributos ocorra é extenso, de aproximadamente 6 mil anos para o crescimento, por exemplo. Portanto, em uma escala filogenética a evolução dos atributos pode ser considerada relativamente rápida, mas considerando a escala de mudanças climáticas, as espécies poderão não conseguir responder rápido o bastante. Somente a partir da integração adequada entre resultados experimentais, ecologia e evolução, seremos capazes de realizar previsões mais precisas de como os organismos irão responder às alterações climáticas.

Palavras-chave. Estresse térmico, metamorfose, girinos, taxa de crescimento, temperature size-rule, mudanças climáticas.

Abstract. Temperature dictates the rhythm of various biochemical and physiological processes in amphibians, affecting, for example, the time to metamorphosis and the body size of tadpoles. The temperature effect is asymmetric between species, and part of this variation may be related to their geographic distributions. On the other hand, the variation in response to temperature may be linked to phylogenetic relationship between species. Here, we explore the effect of higher constant temperatures on tadpole survival and development, using meta-analytical techniques. We also evaluated whether the climatic variability in the spawn collection site can explain differences in the effect of temperature between studies and whether the response to temperature is conserved phylogenetically. Our results show that tadpoles and embryos that develop at relatively higher temperatures reach metamorphosis and hatch earlier and that tropical species are more affected by higher temperatures. Blomberg's K value indicates that at least part of the traits evaluated can be considered labile in response to the increase in temperature, suggesting that these characteristics evolve quickly and adapt to unstable environments. However, our results show that despite the species being able to adapt, the time required for the evolution of the attributes to occur is extensive, of approximately 6 thousand years for growth, for example. Therefore, on a phylogenetic scale, the evolution of attributes can be considered relatively fast, but considering the scale of climate change, species may not be able to respond quickly enough. Only from the proper integration between experimental results, ecology and evolution, will we be able to make more accurate predictions of how organisms will respond to climate change.

Keywords. Thermal stress, metamorphosis, tadpoles, growth rate, temperature size-rule, climate change.

1. Introdução

A temperatura tem potencial de afetar dramaticamente os processos fisiológicos, ecológicos e comportamentais dos ectotérmicos, com efeitos conhecidos na distribuição geográfica, reprodução, e nas taxas de desenvolvimento e crescimento (Huey e Kingsolver, 1993; Angilletta, 2009). O efeito da temperatura varia entre as espécies, e parte desta variação pode estar relacionada às suas distribuições geográficas e altitudinais (Freitas et al., 2010; Turriago et al., 2015). Espera-se que as respostas das espécies ao clima estejam relacionadas à amplitude da sua faixa de tolerância térmica (Freitas et al., 2010), resultado de um possível processo de seleção natural e de adaptação às temperaturas extremas que os organismos experienciaram ao longo de sua evolução (Denny et al., 2009; Hoffmann, 2009; Bozinovic et al., 2011; Kingsolver et al., 2011; Buckley e Huey, 2016). Desse modo, faz sentido esperar que espécies expostas a maiores variações anuais de temperatura tenham faixas de tolerância térmica mais amplas e possuam maior capacidade de adaptação às mudanças climáticas. Por exemplo, espécies de regiões temperadas experimentam variações térmicas sazonais relativamente mais altas e, conseqüentemente, devem possuir maiores amplitudes térmicas fisiológicas quando comparadas às espécies de regiões tropicais (Janzen, 1967; Ghalambor et al., 2006; Bozinovic et al., 2011).

Por outro lado, a magnitude e direção da resposta das espécies ao clima pode estar mais relacionada ao conservadorismo em características fisiológicas e de história de vida dependentes de temperatura, resultando em similaridade de nicho entre espécies filogeneticamente aparentadas (Losos, 2008; Araújo et al., 2013). Nesse caso, espera-se que quanto maior o grau de parentesco entre as espécies, menor serão as diferenças fenotípicas, ecológicas e fisiológicas esperadas entre elas (Blomberg et al., 2003; Losos, 2008). Para ectotérmicos de baixa latitude, as respostas evolutivas parecem ser relativamente mais

improváveis (Stillman e Somero, 2000; Deutsch et al., 2008; Tewksbury et al., 2008; Huey et al., 2009). Isto acontece porque, para esses organismos, as características fisiológicas térmicas devem evoluir mais lentamente do que a temperatura ambiental, conseqüentemente, diminuindo o potencial de respostas evolutivas para organismos adaptados ao calor, como as larvas de anfíbios tropicais (Duarte et al., 2012).

Contudo, em contraste com a suposição de conservadorismo de nicho, espécies submetidas a ambientes estressantes podem apresentar respostas adaptativas em traços fisiológicos, morfológicos, comportamentais e de história de vida que, em escalas de tempo mais longas, podem representar a evolução do nicho climático das espécies (Wiens et al., 2010; Rangel et al., 2018; Diniz-Filho et al., 2019). Para as larvas de anfíbios, por exemplo, características como taxa de desenvolvimento e crescimento podem ter potencial adaptativo para exibir plasticidade fenotípica frente às condições de mudança (Tejedo et al., 2010; Kulkarni et al., 2011), conferindo um meio para aumentar a aptidão em fases posteriores da vida (Boorse e Denver, 2004). Uma das possíveis explicações para a plasticidade no comprimento total e no desenvolvimento dos anfíbios está associada à regra temperatura-tamanho (TSR, Atkinson, 1994). Essa regra prediz que ectotérmicos criados em temperaturas relativamente mais altas tendem a apresentar taxas de crescimento mais rápidas e tempo de desenvolvimento mais curto, mas um menor comprimento total. Enquanto coespecíficos submetidos a baixas temperaturas tendem a apresentar tempo de desenvolvimento mais longo e taxas de crescimento mais lentas, resultando em maior comprimento total (Atkinson, 1994; Angilletta e Dunham, 2003; Angilletta et al., 2004).

O termo “janela térmica” delimita uma gama de temperaturas adequadas para o crescimento e desenvolvimento dos taxas aquáticos (Pörtner et al., 2006), incluindo os girinos (Ruthsatz et al., 2018). A plasticidade no desenvolvimento e no crescimento permite que o indivíduo

consiga “rastrear”, por meio de informações presentes no ambiente, condições ambientais estressantes e ajustar sua alocação de recursos para promover mudanças fenotípicas em seus traços metamórficos (Atkinson e Thompson, 1987). Essa plasticidade, no entanto, pode se manifestar tanto de forma adaptativa quanto não adaptativa (Ghalambor et al., 2007). Nos casos em que mudanças fenotípicas aumentam a aptidão dos organismos e a chance de persistência em um novo ambiente, ela pode ser considerada adaptativa e, em escalas de tempo ecológicas, podem representar a evolução das espécies em direção a um novo fenótipo ótimo (Ghalambor et al., 2007; Angilletta, 2009). Assim, faz sentido esperar que as temperaturas locais extremas as quais os organismos são expostos possam impulsionar a evolução dos seus limites térmicos e janelas térmicas específicas e, por fim, resultar em adaptação térmica (Angilletta, 2009; Bozinovic et al., 2011).

Apesar dessas considerações, o tempo necessário para adaptação térmica ainda foi pouco explorado (Losos, 2008). Avaliar se a adaptação térmica atual das espécies está mais relacionada aos extremos térmicos locais experimentados no passado recente (e.g. período pré industrial) ou no passado profundo (e.g. Holoceno médio) pode fornecer suporte para avaliar o seu potencial adaptativo e sua vulnerabilidade às mudanças climáticas. Por exemplo, espécies com rápida evolução de nicho, parecem precisar de relativamente poucas gerações para conseguir se ajustar e persistir às mudanças climáticas, como demonstrado para *Rhinella diptycha* (Diniz-Filho et al., 2019). Por outro lado, se a espécie tem lenta taxa de evolução de nicho, as respostas evolutivas e a adaptação térmica devem estar acontecendo sob taxas mais lentas do que as mudanças ambientais (Duarte et al., 2012), de modo que essas respostas não seriam rápidas o bastante para que a espécie persista no novo ambiente.

Como o ambiente térmico das larvas de anfíbios varia no espaço e no tempo, elas podem ser excelentes modelos para o estudo da adaptação térmica (McDiarmid e Altig, 1999;

Gutiérrez-Pesquera et al., 2016). A baixa capacidade de dispersão e de seleção de habitat dos girinos muitas vezes os obriga agir como termoconformadores, tendo que se adaptar às temperaturas extremas as quais são expostos na poça até que completem a metamorfose (Balogová e Gvoždík, 2015; Gutiérrez-Pesquera et al., 2016). Aqui, exploramos os padrões gerais dos efeitos da temperatura do ambiente de desenvolvimento em larvas de anfíbios, através de uma meta-análise global, testando as seguintes hipóteses: i) o desenvolvimento e a sobrevivência dos girinos são afetados negativamente por temperaturas constantes mais altas, resultando em aumento na taxa de crescimento e redução no tempo até a metamorfose, no tempo para eclosão, no comprimento e peso total e na taxa de sobrevivência (Atkinson, 1994; Angilletta e Dunham, 2003; Angilletta et al., 2004); ii) a estabilidade climática dos locais de coleta das populações pode explicar parte da variação no efeito das temperaturas constantes mais altas sobre o desenvolvimento e a sobrevivência de larvas de anfíbios. Assim, esperamos que populações que ocorrem em áreas com menor variação climática sejam afetadas mais fortemente pelo aumento da temperatura do que populações que ocorrem em áreas mais climaticamente variáveis (Diamond, 2017); iii) existem diferenças interespecíficas no desenvolvimento e na sobrevivência das larvas de anfíbios em resposta a temperaturas constantes mais altas, de modo que espécies mais próximas filogeneticamente apresentam maior similaridade na resposta à temperatura do que espécies menos aparentadas (Blomberg et al., 2003; Losos, 2008), e por fim, iv) esperamos que existam relações negativas mais fortes para o tamanho de efeito da temperatura em larvas de anfíbios que ocorrem em latitudes baixas. Isso acontece porque esses organismos vivem em ambientes relativamente constantes climaticamente quando comparados a espécies de latitudes relativamente mais altas (Janzen, 1967; Ghalambor et al., 2006; Bozinovic et al., 2011).

2. Material e Métodos

2.1. Coleta dos dados

Realizamos buscas sistematizadas em três bases de dados (Google Scholar, Scopus e ISI Web of Science) durante o mês de junho e julho de 2020 utilizando combinações dos seguintes termos chave “larval development” AND “amphibians” AND “temperature” AND “growth” AND “survival”. Para a escolha dos estudos que seriam incluídos em nossa base de dados utilizamos os seguintes critérios de elegibilidade: 1) deviam testar o efeito da temperatura no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de anfíbios em laboratório, disponibilizando dados de pelo menos uma das seguintes variáveis: sobrevivência, tempo até a eclosão, tempo até a metamorfose, taxa de crescimento, massa e comprimento; 2) apresentar no mínimo duas temperaturas de criação, que representem dois tratamentos contrastantes; 3) manter as temperaturas constantes durante o experimento; 4) apresentar média, desvio padrão e tamanho amostral (*n amostral*) para os dois tratamentos.

Para cada estudo foram coletados dados de localidade (latitude, longitude); país; estágio coletado em campo (adulto/larva/desova); espécie; gênero; família; ordem; estágio utilizado para medição da variável resposta (embrionário/larval); temperatura utilizada no experimento; média, desvio padrão e *n amostral* para as variáveis resposta. Utilizamos os dados de tempo até a metamorfose e tempo até eclosão para compor uma única variável chamada de “tempo de desenvolvimento”. O mesmo foi realizado para os dados de massa corporal e comprimento total, que juntos compõem a variável “crescimento”. A taxa de crescimento obtida nos estudos foi estimada como a divisão do crescimento pelo tempo de desenvolvimento. Para estudos que avaliaram o efeito da temperatura juntamente com outros estressores (e.g. estudos fatoriais que combinavam temperatura com nível de alimento, poluentes), nós extraímos apenas os dados referentes a temperatura e excluimos as informações de média e desvio padrão referentes ao outro estressor.

A nomenclatura taxonômica das espécies seguiu Frost (2021). Estudos que apresentavam dados para mais de uma população, espécie ou localidade de coleta (35 dos 38 estudos incluídos na meta-análise) tiveram tais informações registradas como tamanhos de efeito independentes. Para artigos que apresentaram os dados em gráficos, utilizamos o software GetData Graph Digitizer (*version 2.26*). O software permite definir uma escala através de um sistema de coordenadas, indicando o valor máximo e mínimo para o eixo x e y. Após isso, poderá ser realizada a digitalização dos dados no gráfico de forma manual ou automática, permitindo estimar os valores.

2.2. Estabilidade climática histórica

Avaliamos como o desenvolvimento e sobrevivência dos girinos é afetado pelo clima atual e pela estabilidade climática histórica no local em que a população foi coletada utilizando dados paleoclimáticos com resolução de 0.5° obtidos na database Ecoclimate (<https://www.ecoclimate.org/> (Lima-Ribeiro et al., 2015)). Para considerar a alta variabilidade nas previsões paleoclimáticas geradas por diferentes Modelos de Circulação Global Atmosfera-Oceano (AOGCM), projetamos as variáveis climáticas utilizando três diferentes AOGCM: Community Climate System Model (CCSM); National Centre for Meteorological Research (CNRM) e Max Planck Institute for Meteorology (MPI). Avaliamos o efeito do clima atual (1999) através da amplitude térmica do trimestre mais chuvoso. Utilizamos a anomalia climática do trimestre mais chuvosos entre o clima atual (1999) e o clima pré industrial (~ 1760) como proxy da variação no passado recente. O efeito da variação climática no passado profundo foi avaliado através da anomalia climática no trimestre mais chuvoso entre o Holoceno médio (~ 6 kya) e o clima pré-industrial (~ 1760). Além disso, estimamos a temperatura máxima no trimestre mais chuvoso para o clima atual, para o passado recente e profundo. Calculamos uma matriz de correlação (coeficiente de correlação de Pearson, valor

de corte 75%) utilizando a latitude e as variáveis climáticas e escolhemos apenas as variáveis menos correlacionadas para os modelos de meta-regressão. Nós reconhecemos que dados macroclimáticos não traduzem precisamente a variação microclimática enfrentada pelos organismos em seus ambientes naturais e podem ter menor poder explicativo do que dados microclimáticos (Woods et al., 2015; Katzenberger et al., 2018; Sheu et al., 2020).

2.3. Tamanho de efeito

Para obter uma estimativa do tamanho de efeito e da variação de amostragem para cada estudo, utilizamos a diferença média padronizada (d de Cohen) para cada uma das quatro variáveis resposta. Em seguida, aplicamos uma correção para o viés de pequenas amostras (J; (Hedges, 1981)) e estimamos o tamanho de efeito através da diferença média padronizada corrigida (g de Hedges). Tamanhos de efeito negativos indicariam redução no tempo de desenvolvimento, no crescimento, na taxa de crescimento e na sobrevivência das larvas e embriões.

2.4. Modelo meta-analítico de efeitos aleatórios e análise de heterogeneidade

Para lidar com estudos que apresentavam mais de um tamanho de efeito, seja devido ao uso de mais de uma população, espécie ou do mesmo controle para vários tratamentos, ajustamos modelos meta-analíticos filogenéticos multinível utilizando a variação entre estudos, a relação de parentesco entre as espécies e o agrupamento de tamanhos de efeito no nível de estudo como efeitos aleatórios (Nakagawa e Santos, 2012). Estimamos uma matriz de variância-covariância por movimento Browniano para estimar as relações filogenéticas entre as espécies. A heterogeneidade nos tamanhos de efeito foi explorada por meio de meta regressões filogenéticas multinível utilizando a latitude e a variabilidade climática no presente, no passado recente e no passado profundo como variáveis moderadoras. As variáveis que apresentaram autocorrelação (Pearson >75%) foram excluídas dos modelos de meta regressão. Calculamos

o coeficiente de determinação (Pseudo R^2) de acordo com (Borenstein et al. 2009) para cada variável moderadora nas meta- regressões.

2.5. Sinal filogenético

Consideramos a árvore filogenética de Jetz e Pyron (2018) para os anfíbios. Utilizamos a estatística K de Blomberg et al., (2003) para calcular o sinal filogenético e inferir se os organismos estudados tendem a conservar sua resposta ao aumento da temperatura. Comparamos os valores de sinal filogenético (K de Blomberg) com a distribuição de valores esperados em um modelo de evolução aleatória por movimento Browniano utilizando a função fastBM do pacote Phytools e então, comparamos os valores de K observados com a distribuição de K Brownianos. Utilizamos os pacotes R (R core team 2021) picante (Kembel et al., 2010), ape (Paradis et al., 2004) e Phytools (Revell, 2012).

2.6. Viés de publicação

Evidências consideradas em estudos meta-analíticos podem não ser uma amostra representativa de todos os dados disponíveis sobre o assunto, levando a estimativas imprecisas nos tamanhos de efeito (Koricheva et al., 2013). Por exemplo, resultados significativos têm maiores probabilidades de serem publicados do que resultados não significativos (Møller e Jennions, 2001). Assim sendo, verificamos a existência de viés de publicação através do teste de Egger (Egger et al., 1997) e do método Trim e Fill (Duval e Tweedie, 2000). O teste de Egger foi utilizado para avaliar se havia simetria no gráfico de funil, no qual um p- valor significativo (i.e < 0.05) indica que o gráfico é assimétrico (Egger et al., 1997). O método Trim e Fill indica quantos estudos faltantes são necessários para que o gráfico de funil seja simétrico e se a inclusão desses estudos altera a significância do resultado (Duval e Tweedie, 2000). Utilizamos o pacote R Metafor (Viechtbauer, 2010; R core team 2021) para as análises.

3. Resultados

A pesquisa retornou 178 artigos no ISI Web of Science, 150 no Scopus Elsevier e 1.000 no Google Scholar. Após filtragem por título e resumo, obtivemos 45 artigos na Web of Science, 51 na Scopus e 67 no Scholar, totalizando 163 artigos possivelmente elegíveis para a meta-análise. Realizamos outra filtragem a partir do texto completo e obtivemos 38 artigos (Figura 1). Os 38 estudos incluídos na meta-análise resultaram em 219 comparações que avaliaram o efeito de temperaturas constantes mais altas na sobrevivência e desenvolvimento de larvas e embriões de 43 espécies de anfíbios (Material Suplementar- Figura S1), pertencentes a 17 famílias e distribuídas em 16 países (Figura 2), principalmente na região temperada (Material Suplementar - Tabela S1).

3.1. Efeitos gerais da temperatura

Nossos resultados mostraram que o tempo de desenvolvimento reduz sob temperaturas constantes mais elevadas (g de Hedges= -4.8481, [95% IC: -8.0329, -1.6633], enquanto o crescimento, representado pelo comprimento e peso das larvas e embriões, não foi afetado pelas temperaturas constantes elevadas (g de Hedges = -0.3475 [95% IC: -1.1386, 0.4435]), bem como a taxa de crescimento (g de Hedges= 0.836 [95% CI: -0.8022, 2.4790]). Para os estudos que avaliaram o efeito de temperaturas mais altas na sobrevivência das larvas não encontramos diferença significativa, no entanto, ao contrário dos demais traços, a resposta da sobrevivência as temperaturas mais altas tende a ser positiva, indicando que a sobrevivência deve aumentar sob temperaturas constantes mais elevadas (g de Hedges = 0.6200 [95% IC = -0.0347; 1.2747], Tabela 1, Figura 3). Encontramos heterogeneidade entre os tamanhos de efeito, com uma alta porcentagem desta variação atribuída à variação entre estudos, e uma pequena porção desta heterogeneidade relacionada ao agrupamento de comparações no nível de estudo e à relação filogenética entre espécies (Tabela 2).

A heterogeneidade entre os tamanhos de efeito foi explorada através de meta-regressões (Tabela 3, Figura 4). Nossos resultados mostram que parte da variação do efeito da temperatura no crescimento das larvas está relacionada à anomalia climática no passado profundo (Pseudo $R^2 = 0.13$, $p = 0.0225$, Figura 4a). Portanto, quanto maior a variação climática no passado profundo, maior e mais negativo será o efeito do aumento da temperatura sobre o crescimento das larvas.

A latitude absoluta na qual os estudos foram realizados explicou parte da variação do efeito da temperatura na sobrevivência das larvas (Pseudo $R^2 = -0.34$, $p = 0.0378$, Figura 4b). Os resultados mostram que espécies que ocorrem em latitudes relativamente mais altas (e.g. região temperada), sofrem aumentos na taxa de sobrevivência enquanto espécies de latitudes mais baixas (e.g. região tropical), reduzem sua sobrevivência sob temperaturas constantes mais altas. Para a taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento, as variáveis climáticas e a latitude tiveram baixo poder explicativo sobre a heterogeneidade do tamanho de efeito (Tabela 3).

3.2. Sinal filogenético

Através do valor de K de Blomberg, foi demonstrado que o crescimento ($K = 0.23$, $p = 0.01$), a taxa de crescimento ($K = 0.37$, $p = < 0.0001$) e o tempo de desenvolvimento ($K = 0.24$, $p = < 0.0001$) evoluem em taxas que diferem do movimento Browniano e, são assim considerados lábeis em resposta a temperaturas mais altas, indicando que essas características evoluem rápido e se adaptam ao ambiente. Para a sobrevivência ($K = 0.51$, $p = 0.15$), encontramos um valor de K menor que 1, no entanto, não encontramos evidências significativas de labilidade (Tabela 4, Figura 5).

3.3. Viés de publicação

O teste de Egger indicou que o gráfico de funil não é simétrico para os estudos que avaliaram o tempo de desenvolvimento ($t = 5.850$, $p = 1.75e-07$, $gl = 65$), a taxa de crescimento ($t = -2.543$, $p = 0.0170$, $gl = 27$) e o crescimento das larvas sob temperaturas experimentais ($t = 2.418$, $p = 0.017$, $gl = 91$), sugerindo potencial viés de publicação. No entanto, o método Trim and Fill demonstrou que para crescimento, 1 estudo seria necessário, para tempo de desenvolvimento, 3 estudos seriam necessários e para taxa de crescimento nenhum estudo seria necessário para tornar o gráfico de funil simétrico e que a inclusão dos mesmos não altera a significância do tamanho de efeito para o crescimento [95% IC = -1.1820, 0.5446], tempo de desenvolvimento [95% IC = -6.4990, -1.9837] e taxa de crescimento [95% IC = -0.8022, 2.4790]. Para os estudos que avaliaram a sobrevivência, o gráfico de funil foi simétrico ($t = -0.288$, $p = 0.775$, $gl = 28$, Material suplementar- Figura S2).

4. Discussão

Nossos resultados confirmam o padrão já conhecido da regra temperatura-tamanho em organismos aquáticos, mostrando que girinos e embriões que se desenvolvem em temperaturas relativamente mais altas, atingem a metamorfose e a eclosão mais cedo (Wilbur 1980; Rudolf e Rödel, 2007; Ruthsatz et al., 2018). Além disso, observamos efeitos pronunciados da variabilidade climática no passado profundo sob a heterogeneidade do efeito da temperatura no crescimento dos girinos, bem como um forte efeito da latitude na heterogeneidade do efeito da temperatura na sobrevivência das larvas. Esses resultados indicam que a adaptação térmica das características estudadas está relacionada mais fortemente ao clima passado do que ao clima atual, aspecto que deve ser levado em consideração ao avaliar o potencial impacto das mudanças climáticas globais sob essas espécies.

Como já é conhecido, a temperatura dita o ritmo de diversos processos bioquímicos e fisiológicos nos anfíbios, afetando por exemplo, o tempo até a metamorfose e o comprimento

total de girinos criados sob temperaturas variáveis (McDiarmid e Altig, 1999). Nossos resultados mostram que o tempo de desenvolvimento dos girinos está fortemente associado ao aumento da temperatura durante o estágio larval, resultando em diminuição no tempo de eclosão e no tempo até a metamorfose em temperaturas relativamente mais baixas (Atkinson, 1994). Para os girinos, o principal gatilho impulsor da metamorfose são os hormônios tireoidianos (HT) produzidos pela glândula tireoide (Tata, 2008; Laudet, 2011). Ao se desenvolver em um ambiente estressante (e.g. girinos se desenvolvendo em uma lagoa rasa e aquecida, prestes a secar), o eixo de estresse neuroendócrino é ativado aumentando a produção de hormônios do estresse (Denver, 2021). Esses hormônios interagem com HT, aumentando sua produção (Wilbur e Collins, 1973; Denver, 2009, Denver, 2021). Assim, o aumento da temperatura pode afetar a intensidade da produção de HT (Ceusters, 1978) e acelerar a chegada a metamorfose (Liu and Nusslock, 2018; Thayer et al., 2018; Fogelman and Canli, 2019;), como foi demonstrado para os estudos incluídos em nossa revisão. Apesar da plasticidade no tempo de metamorfose ser uma maneira de persistir sob um ambiente estressante, ela pode acarretar em custos fisiológicos e morfológicos para as larvas (Gomez-Mestre et al., 2013) reduzindo por exemplo, a taxa de sobrevivência de juvenis que metamorfoseiam em tamanhos menores e afetando a seleção sexual e o sucesso reprodutivo dos adultos (Hayes et al., 2010; Gomez-Mestre et al., 2013).

Em contraste com o tempo de desenvolvimento, não encontramos efeitos significativos do aumento da temperatura na sobrevivência, crescimento (massa e comprimento) e na taxa de crescimento dos girinos. Segundo (Hayes et al., 1993), a taxa de desenvolvimento é impactada mais fortemente pelo efeito da temperatura do que a taxa de crescimento. Isso provavelmente se deve ao fato de que as espécies precisam de um tamanho mínimo e um limiar específico de hormônios tireoidianos para atingir a metamorfose, no entanto, não existe um tempo larval mínimo ou máximo antes de uma larva se metamorfosear (Morey e Reznick, 2000; Buchholz,

2017), permitindo que o tempo até a metamorfose seja mais plástico em resposta a temperatura do que o comprimento total, por exemplo. Além disso, alguns autores destacam que a sensibilidade assimétrica na taxa de crescimento e desenvolvimento pode estar relacionada aos efeitos diferenciais da temperatura no anabolismo e no catabolismo, uma vez que afetam a taxa de desenvolvimento mais fortemente do que a taxa de crescimento (Angilletta e Dunham, 2003; Walters e Hassall, 2006; Gomez-Mestre et al., 2010).

Apesar de não observar efeitos estatisticamente significativos no crescimento e na sobrevivência das larvas sob temperaturas mais altas, os resultados mostram que a heterogeneidade no efeito da temperatura nessas características pode ser explicada, em parte, pela latitude e pela estabilidade histórica do clima no local em que a população ocorre. Para a sobrevivência, foi demonstrado que a direção do efeito da temperatura depende da latitude, indicando que larvas que ocorrem em latitudes mais altas (e.g. região temperada) apresentam aumento da sobrevivência com incrementos na temperatura, enquanto larvas que ocorrem em latitudes mais baixas (e.g. região tropical) reduzem sua sobrevivência em temperaturas mais altas. O efeito assimétrico do aumento da temperatura entre regiões pode estar relacionado à amplitude da faixa de tolerância térmica dos organismos (Freitas et al., 2010; Turriago et al., 2015). Espécies de regiões temperadas tiveram que se adaptar à alta sazonalidade climática ao longo da sua evolução (Buckley e Huey, 2016), e portanto, devem ter maior potencial adaptativo diante das mudanças climáticas, enquanto espécies de regiões tropicais são adaptadas a climas que variam relativamente pouco, reduzindo a probabilidade de resposta evolutiva (Janzen, 1967; Ghalambor et al., 2006; Bozinovic et al., 2011). Além disso, espécies tropicais estão adaptadas a temperaturas muito próximas ao seu limite máximo térmico crítico, o que torna a adaptação térmica muito mais improvável (Stillman, 2003; Tewksbury et al., 2008; Wright et al., 2009; Araújo et al., 2013).

O mesmo foi demonstrado para o crescimento, uma vez que observamos uma relação significativa entre a variação climática no Holoceno médio e a heterogeneidade no efeito da temperatura sob o crescimento das larvas, sugerindo que quanto maior a anomalia climática, maior o efeito negativo da temperatura sobre o crescimento. Esse padrão indica que as espécies não estão adaptadas à variação no clima atual e sim a variabilidade climática no passado profundo. Assim, faz sentido esperar que tais espécies apresentem lentas taxas de evolução em algumas de suas características fisiológicas térmicas, e que, portanto, esses caracteres possam estar sendo conservados evolutivamente (Bogert, 1949; Huey et al., 2003).

No entanto, a análise de sinal filogenético indicou que quase todos traços avaliados (crescimento, taxa de crescimento e tempo de desenvolvimento) podem ser considerados lábeis em resposta ao aumento da temperatura, sugerindo que essas características evoluem rápido com uma adaptação ecológica ao ambiente. Isso pode estar relacionado ao fato de testarmos o efeito de um passado não tão profundo (6 ky) comparado a longa história evolutiva dos anfíbios e, por isso, encontrar uma relação significativa entre algumas das características testadas e a variação climática no passado. Esse padrão pode ser relacionado teoricamente ao pensamento neo-Darwiniano que sugere que a adaptação ocorre lenta e gradualmente (Quintero e Wiens, 2013). Em face das rápidas mudanças climáticas essa informação pode ter importantes implicações, uma vez que um ponto chave para avaliar a vulnerabilidade das espécies ao clima está em sua capacidade adaptativa (Williams et al., 2008). Todavia, dada a discussão acima, uma questão primária a ser colocada na equação é a velocidade das mudanças climáticas. Diante do aumento na intensidade de eventos extremos e na diminuição da previsibilidade desses acontecimentos, devemos nos perguntar se os traços metamórficos e larvais dos anfíbios estão evoluindo rápido o bastante para que as espécies persistam às mudanças climáticas (Diniz-Filho et al., 2019; Souza et al., 2019).

5. Conclusão

Avaliar como a temperatura afeta o crescimento e desenvolvimento dos anfíbios têm sido o foco de muitos estudos ao longo do último século, dado que grande parte das espécies do grupo têm características fisiológicas e ecológicas altamente dependentes do clima. Os resultados obtidos confirmam o padrão já conhecido da Temperature size-rule sob organismos aquáticos, demonstrando que girinos e embriões que se desenvolvem em temperaturas relativamente mais altas atingem a metamorfose e a eclosão mais cedo. Nossos resultados também sugerem que as espécies tropicais podem ter sua sobrevivência e crescimento mais afetados pelas mudanças climáticas do que espécies temperadas. No entanto, essa é a região com menor concentração de estudos e conseqüentemente, com menor número de espécies estudadas. Em nossa revisão, por exemplo, a maioria dos estudos na região tropical avaliou espécies que habitam zonas de mata com climas estáveis. Mas o efeito da temperatura pode variar entre espécies de diferentes ambientes, como espécies que habitam savanas, vegetação xeromórfica e ambientes montanhosos. Portanto, muito ainda precisa ser explorado para que tenhamos evidências concretas que permitam delinear os padrões gerais do efeito da temperatura nesses organismos.

Apesar das espécies serem afetadas pela temperatura, parece existir alto potencial adaptativo para girinos expostos ao estresse térmico para quase todos os atributos avaliados, visto que o crescimento, tempo de desenvolvimento e a taxa de crescimento apresentam alta labilidade. No entanto, nossos resultados mostram que apesar das espécies conseguirem se adaptar, o tempo necessário para que a evolução dos atributos ocorra é extenso, de aproximadamente 6 mil anos para o crescimento, por exemplo. Portanto, em uma escala filogenética a evolução dos atributos pode ser considerada relativamente rápida, mas considerando a escala de mudanças climáticas, as espécies poderão não conseguir responder

rápido o bastante. Somente a partir da integração adequada entre resultados experimentais, ecologia e evolução poderemos prever com mais clareza os impactos das alterações climáticas sobre a biodiversidade e tentar mitigar parte deles.

Referências bibliográficas

Angilletta, M., 2009. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. Oxford Univ. Press Inc., New York 289.

Angilletta, M.J., Dunham, A.E., 2003. The Temperature-Size Rule in Ectotherms: Simple Evolutionary Explanations May Not Be General. *Am. Nat.* 162, 332–342. <https://doi.org/10.1086/377187>.

Angilletta, M.J., Steury, T.D., Sears, M.W., 2004. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: Fitting pieces of a life-history puzzle. *Integr. Comp. Biol.* 44, 498–509. <https://doi.org/10.1093/icb/44.6.498>

Araújo, M.B., Ferri-Yáñez, F., Bozinovic, F., Marquet, P.A., Valladares, F., Chown, S.L., 2013. Heat freezes niche evolution. *Ecol. Lett.* 16, 1206–1219. <https://doi.org/10.1111/ele.12155>

Atkinson, D., 1994. Temperature and Organism Size—A Biological Law for Ectotherms? *Adv. Ecol. Res.* 25, 1–58. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60212-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60212-3).

Atkinson, D., Thompson, D.B.A., 1987. Constraint and restraint in breeding birds. *Wader Study Group Bull.* 49, 18-19.

Balogová, M., Gvoždík, L., 2015. Can newts cope with the heat? Disparate thermoregulatory strategies of two sympatric species in water. *PLoS One* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128155>

- Blomberg, S.P., Garland, T., Ives, A.R., 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution* (N. Y). 57, 717–745. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x>
- Bogert, C.M., 1949. Thermoregulation in Reptiles, A Factor in Evolution. *Evolution* (N. Y). 3, 195. <https://doi.org/10.2307/2405558>
- Boorse, G.C., Denver, R.J., 2004. Expression and hypophysiotropic actions of corticotropin-releasing factor in *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137, 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.04.001>
- Bozinovic, F., Calosi, P., Spicer, J., 2011. Physiological correlates of geographic range in animals. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145055>
- Buchholz, D.R., 2017. *Xenopus* metamorphosis as a model to study thyroid hormone receptor function during vertebrate developmental transitions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 459, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.03.020>
- Buckley, L.B., Huey, R.B., 2016. How extreme temperatures impact organisms and the evolution of their thermal tolerance. *Integr. Comp. Biol.* 56, 98–109. <https://doi.org/10.1093/icb/icw004>
- Ceusters, R., 1978. Difference in Thyroid Function between Male and Female (*Rana temporaria* L.) with Increasing Temperature. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36, 598–603.
- Denny, M.W., Hunt, L.J.H., Miller, L.P., Harley, C.D.G., 2009. On the prediction of extreme ecological events. *Ecol. Monogr.* 79, 397–421. <https://doi.org/10.1890/08-0579.1>

- Denver, R.J., 2009. Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 164, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.04.016>
- Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C., Martin, P.R., 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6668–6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>
- Diamond, S.E., 2017. Evolutionary potential of upper thermal tolerance: biogeographic patterns and expectations under climate change. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1389, 5–19. <https://doi.org/10.1111/nyas.13223>
- Diniz-Filho, J.A.F., Souza, K.S., Bini, L.M., Loyola, R., Dobrovolski, R., Rodrigues, J.F.M., Lima-Ribeiro, S., Terribile, L.C., Rangel, T.F., Bione, I., Freitas, R., Machado, I.F., Rocha, T., Lorini, M.L., Vale, M.M., Navas, C.A., Maciel, N.M., Villalobos, F., Olalla-Tarraga, M.A., Gouveia, S., 2019. A macroecological approach to evolutionary rescue and adaptation to climate change. *Ecography (Cop.)*. 42, 1124–1141. <https://doi.org/10.1111/ecog.04264>
- Duarte, H., Tejedo, M., Katzenberger, M., Marangoni, F., Baldo, D., Beltrán, J.F., Martí, D.A., Richter-Boix, A., Gonzalez-Voyer, A., 2012. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Glob. Chang. Biol.* 18, 412–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02518.x>

- Duval, S., Tweedie, R., 2000. A Nonparametric “Trim and Fill” Method of Accounting for Publication Bias in Meta-Analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* 95, 89–98. <https://doi.org/10.1080/01621459.2000.10473905>
- Egger, M., Smith, G.D., Schneider, M., Minder, C., 1997. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *Br. Med. J.* 315, 629–634. <https://doi.org/10.1136/bmj.315.7109.629>
- Freitas, V., Cardoso, J.F.M.F., Lika, K., Peck, M.A., Campos, J., Kooijman, S.A.L.M., Van Der Veer, H.W., 2010. Temperature tolerance and energetics: A dynamic energy budget-based comparison of North Atlantic marine species. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 3553–3565. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0049>.
- Frost, D. R., 2021. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (acessado entre 25 de novembro de 2020 a 15 de janeiro de 2021). Banco de dados eletrônico acessível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001.
- Ghalambor, C.K., Huey, R.B., Martin, P.R., Tewksbury, J.J., Wang, G., 2006. Are mountain passes higher in the tropics? Janzen’s hypothesis revisited. *Integr. Comp. Biol.* 46, 5–17. <https://doi.org/10.1093/icb/icj003>
- Ghalambor, C.K., McKay, J.K., Carroll, S.P., Reznick, D.N., 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* 21, 394–407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x>

- Gomez-Mestre, I., Kulkarni, S., Buchholz, D.R., 2013. Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. *PLoS One* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084266>
- Gomez-Mestre, I., Saccoccio, V.L., Iijima, T., Collins, E.M., Rosenthal, G.G., Warkentin, K.M., 2010. The shape of things to come: linking developmental plasticity to post-metamorphic morphology in anurans. *J. Evol. Biol.* 23, 1364–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02016.x>
- Gutiérrez-Pesquera, L.M., Tejedo, M., Olalla-Tárraga, M.A., Duarte, H., Nicieza, A., Solé, M., 2016. Testing the climate variability hypothesis in thermal tolerance limits of tropical and temperate tadpoles. *J. Biogeogr.* 43, 1166–1178. <https://doi.org/10.1111/jbi.12700>
- Hayes, T., Chan, R., Licht, P., 1993. Interactions of temperature and steroids on larval growth, development, and metamorphosis in a toad (*Bufo boreas*). *J. Exp. Zool.* 266, 206–215. <https://doi.org/10.1002/jez.1402660306>
- Hayes, T.B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Parka, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S., 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4612–4617. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>
- Hedges, L. V., 1981. *Distribution Theory for Glass's Estimator of Effect Size and Related Estimators* Author (s): Larry V. Hedges Published by: American Educational Research Association and American Statistical Association Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1164588>. *J. Educ. Stat.* 6, 107–128.

- Hoffmann, A.A., 2009. Physiological climatic limits in *Drosophila*: Patterns and implications. *J. Exp. Biol.* 213, 870–880. <https://doi.org/10.1242/jeb.037630>
- Huey, R. B. & Kingsolver, J.G., 1993. Evolution of Resistance to High Temperature in Ectotherms Raymond B. Huey; Joel G. Kingsolver *The American Naturalist*, Vol. 142, Supplement: Evolutionary Responses to Environmental. *Am. Nat.* 142, 21–46.
- Huey, R.B., Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Vitt, L.J., Hertz, P.E., Pérez, H.J.Á., Garland, T., 2009. Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 1939–1948. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1957>
- Huey, R.B., Hertz, P.E., Sinervo, B., 2003. Behavioral drive versus behavioral inertia in evolution: A null model approach. *Am. Nat.* 161, 357–366. <https://doi.org/10.1086/346135>
- Janzen, D.H., 1967. Why mountain passes are higher in the tropics. *Am. Nat.* 101, 233–249.
- Jetz, W., Pyron, R.A., 2018. The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 850–858. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0515-5>
- Katzenberger, M., Hammond, J., Tejedo, M., Relyea, R., 2018. Source of environmental data and warming tolerance estimation in six species of North American larval anurans. *J. Therm. Biol.* 76, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.07.005>
- Kembel, S.W., Cowan, P.D., Helmus, M.R., Cornwell, W.K., Morlon, H., Ackerly, D.D., Blomberg, S.P., Webb, C.O., 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq166>

Kingsolver, J.G., Arthur Woods, H., Buckley, L.B., Potter, K.A., MacLean, H.J., Higgins, J.K., 2011. Complex life cycles and the responses of insects to climate change. *Integr. Comp. Biol.* 51, 719–732. <https://doi.org/10.1093/icb/icr015>

Koricheva, J., Gurevitch, J., Mengersen, K., 2013. *Handbook of Meta-analysis in Ecology and Evolution*, Princeton University Press.

Kulkarni, S.S., Gomez-Mestre, I., Moskalik, C.L., Storz, B.L., Buchholz, D.R., 2011. Evolutionary reduction of developmental plasticity in desert spadefoot toads. *J. Evol. Biol.* 24, 2445–2455. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02370.x>

Laudet, V., 2011. The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Curr. Biol.* 21, R726–R737. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.030>

Lima-Ribeiro, M.S., Varela, S., González-Hernández, J., Al., E., 2015. EcoClimate: a database of climate data from multiple models for past, present, and future for macroecologists and biogeographers. *Biodivers. Informatics* 10, 1–21. <https://doi.org/10.17161/bi.v10i0.4955>

Losos, J.B., 2008. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecol. Lett.* 11, 995–1003. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01229.x>

McDiarmid, R.W., Altig, R., 1999. *Tadpoles: the biology of anuran larvae*, The University of Chicago Press.

- Møller, A.P., Jennions, M.D., 2001. Testing and adjusting for publication bias. *Trends Ecol. Evol.* 16, 580–586. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02235-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02235-2)
- Morey, S., Reznick, D., 2000. A comparative analysis of plasticity in larval development in three species of spadefoot toads. *Ecology* 81, 1736–1749. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[1736:ACAOPI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[1736:ACAOPI]2.0.CO;2)
- Nakagawa, S., Santos, E.S.A., 2012. Methodological issues and advances in biological meta-analysis. *Evol. Ecol.* 26, 1253–1274. <https://doi.org/10.1007/s10682-012-9555-5>
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
- Pörtner, H.O., Bennett, A.F., Bozinovic, F., Clarke, A., Lardies, M.A., Lucassen, M., Pelster, B., Schiemer, F., Stillman, J.H., 2006. Trade-offs in thermal adaptation: The need for a molecular to ecological integration. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 295–313. <https://doi.org/10.1086/499986>
- Quintero, I., Wiens, J.J., 2013. Rates of projected climate change dramatically exceed past rates of climatic niche evolution among vertebrate species. *Ecol. Lett.* 16, 1095–1103. <https://doi.org/10.1111/ele.12144>
- Rangel, T.F., Edwards, N.R., Holden, P.B., Diniz-Filho, J.A.F., Gosling, W.D., Coelho, M.T.P., Cassemiro, F.A.S., Rahbek, C., Colwell, R.K., 2018. Modeling the ecology and evolution of biodiversity: Biogeographical cradles, museums, and graves. *Science* (80-). 361. <https://doi.org/10.1126/science.aar5452>

- Revell, L.J., 2012. phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol. Evol.* 3, 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ruthsatz, K., Peck, M.A., Dausmann, K.H., Sabatino, N.M., Glos, J., 2018. Patterns of temperature induced developmental plasticity in anuran larvae. *J. Therm. Biol.* 74, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.03.005>
- Sheu, Y., Zurano, J.P., Ribeiro-Junior, M.A., Ávila-Pires, T.C., Rodrigues, M.T., Colli, G.R., Werneck, F.P., 2020. The combined role of dispersal and niche evolution in the diversification of Neotropical lizards. *Ecol. Evol.* 10, 2608–2625. <https://doi.org/10.1002/ece3.6091>
- Souza, K.S., Jardim, L., Rodrigues, F., Batista, M.C.G., Rangel, T.F., Gouveia, S., Terribile, L.C., Ribeiro, M. de S.L., Fortunato, D. de S., Diniz-Filho, J.A.F., 2019. How likely are adaptive responses to mitigate the threats of climate change for amphibians globally? *Front. Biogeogr.* 11. <https://doi.org/10.21425/F5FBG43511>
- Stillman, J.H., 2003. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science (80-.)*. 301, 65. <https://doi.org/10.1126/science.1083073>
- Stillman, J.H., Somero, G.N., 2000. A comparative analysis of the upper thermal tolerance limits of eastern pacific porcelain crabs, genus *Petrolisthes*: Influences of latitude, vertical zonation, acclimation, and phylogeny. *Physiol. Biochem. Zool.* 73, 200–208. <https://doi.org/10.1086/316738>

- Sunday, J.M., Bates, A.E., Dulvy, N.K., 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 1823–1830. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1295>
- Tata, J.R., 2008. Getting hooked on thyroid hormone action: A semi-autobiographical account. *J. Biosci.* 33, 653–667. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0085-9>
- Tejedo, M., Marangoni, F., Pertoldi, C., Richter-Boix, A., Laurila, A., Orizaola, G., Nicieza, A.G., Álvarez, D., Gomez-Mestre, I., 2010. Contrasting effects of environmental factors during larval stage on morphological plasticity in post-metamorphic frogs. *Clim. Res.* 43, 31–39. <https://doi.org/10.3354/cr00878>
- Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Deutsch, C.A., 2008. Putting the Heat on Tropical Animals The Scale of Prediction. *Science* (80-). 320, 1296–1297.
- Turriago, J.L., Parra, C.A., Bernal, M.H., 2015. Upper thermal tolerance in anuran embryos and tadpoles at constant and variable peak temperatures. *Can. J. Zool.* 93, 267–272. <https://doi.org/10.1139/cjz-2014-0254>
- Vichtbauer, W., 2010. Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 36. <https://doi.org/10.1002/wics.10>
- Walters, R.J., Hassall, M., 2006. The temperature-size rule in ectotherms: May a general explanation exist after all? *Am. Nat.* 167, 510–523. <https://doi.org/10.1086/501029>
- Wiens, J.J., Ackerly, D.D., Allen, A.P., Anacker, B.L., Buckley, L.B., Cornell, H. V., Damschen, E.I., Jonathan Davies, T., Grytnes, J.A., Harrison, S.P., Hawkins, B.A., Holt, R.D., McCain, C.M., Stephens, P.R., 2010. Niche conservatism as an emerging

principle in ecology and conservation biology. *Ecol. Lett.* 13, 1310–1324.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01515.x>

Wilbur, H.M., Collins, J.P., 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* (80-). 182, 1305–1314. <https://doi.org/10.1126/science.182.4119.1305>

Williams, S.E., Shoo, L.P., Isaac, J.L., Hoffmann, A.A., Langham, G., 2008. Towards an integrated framework for assessing the vulnerability of species to climate change. *PLoS Biol.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060325>

Woods, H.A., Dillon, M.E., Pincebourde, S., 2015. The roles of microclimatic diversity and of behavior in mediating the responses of ectotherms to climate change. *J. Therm. Biol.* 54, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.10.002>

Wright, S.J., Muller-Landau, H.C., Schipper, J., 2009. The future of tropical species on a warmer planet. *Conserv. Biol.* 23, 1418–1426. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01337.x>.

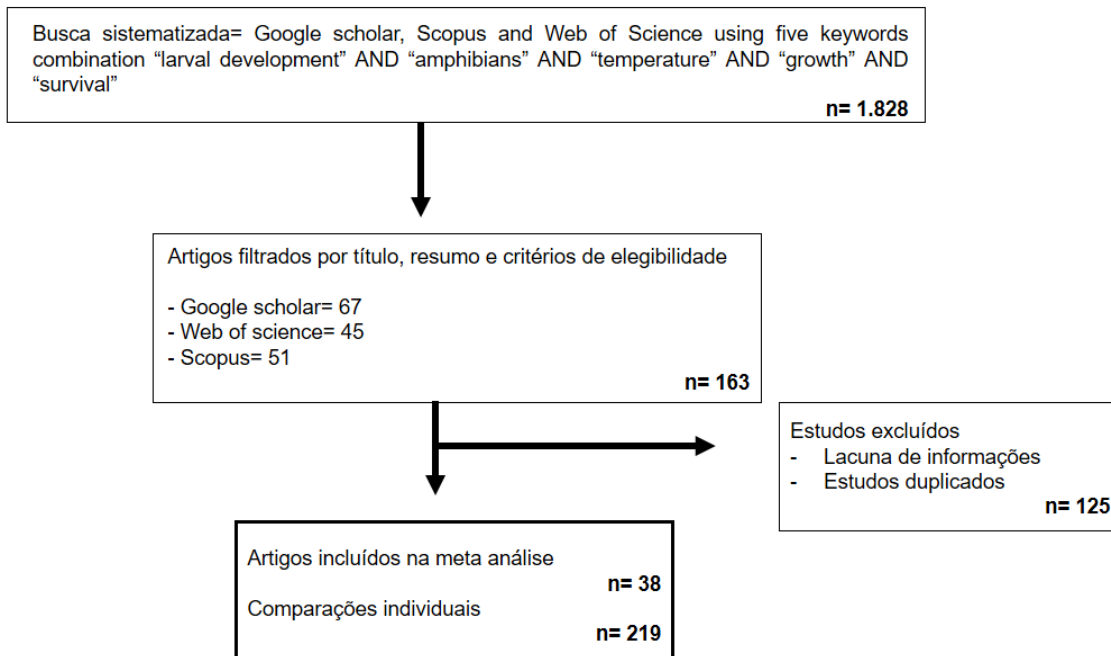


Figura 1. Diagrama representando o processo de triagem dos estudos incluídos na meta-análise.

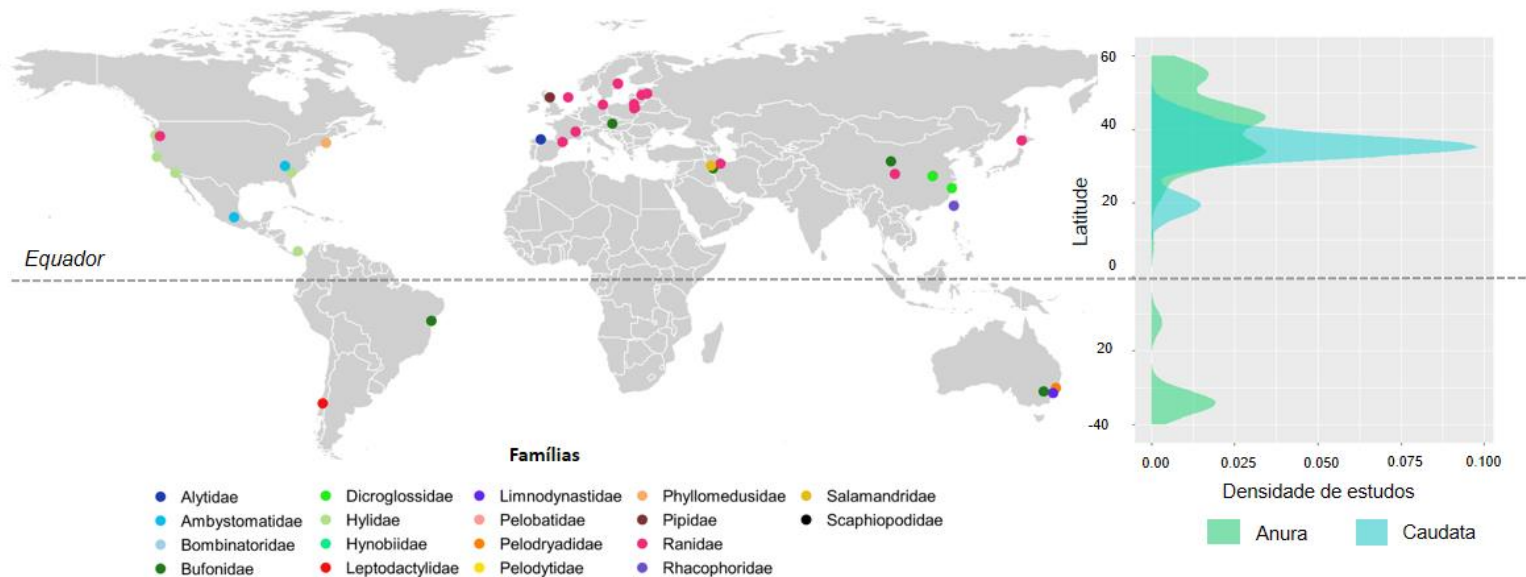


Figura 2. Distribuição geográfica dos estudos incluídos na meta-análise. O gráfico representa a densidade de estudos que avaliaram o efeito da temperatura no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de anfíbios

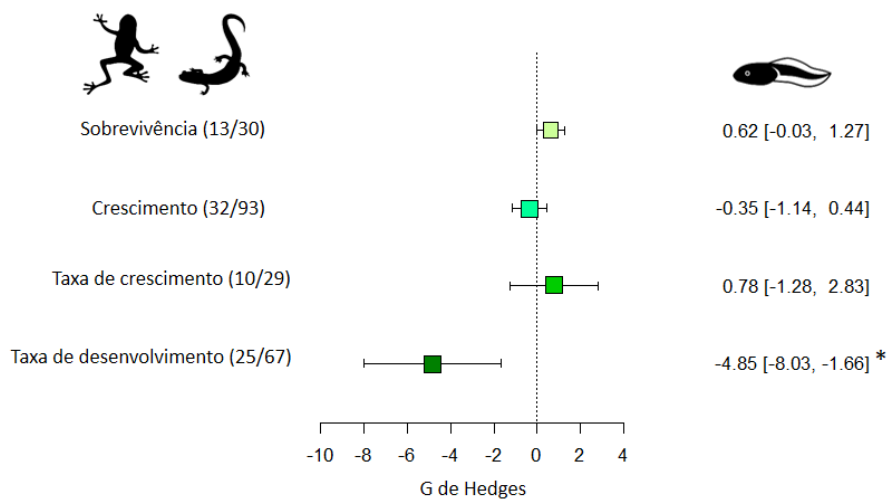


Figura 3. Tamanhos de efeito da temperatura nos traços metamórficos para anfíbios larvais. A linha vertical indica que não há efeito. Valores médios de g de Hedges e o intervalo de confiança a 95% são exibidos no lado direito (asteriscos indicam significância estatística, $P < 0,05$). No lado esquerdo são apresentados o número de estudos e comparações individuais para cada variável, respectivamente.

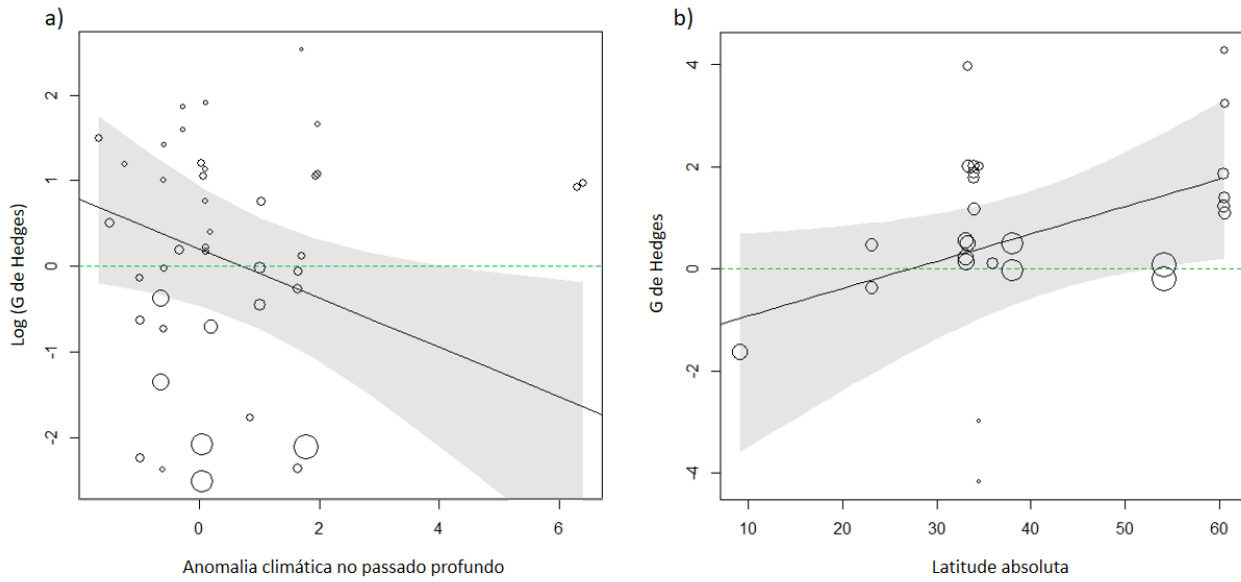


Figura 4. Relação entre o tamanho de efeito da temperatura no crescimento das larvas e a anomalia climática no passado profundo (a) e relação entre o tamanho de efeito da temperatura na sobrevivência e a latitude absoluta (b). O tamanho do círculo indica o peso de cada tamanho de efeito nas estimativas dos parâmetros de meta regressão. As linhas ajustadas representam os efeitos parciais de cada variável moderadora.

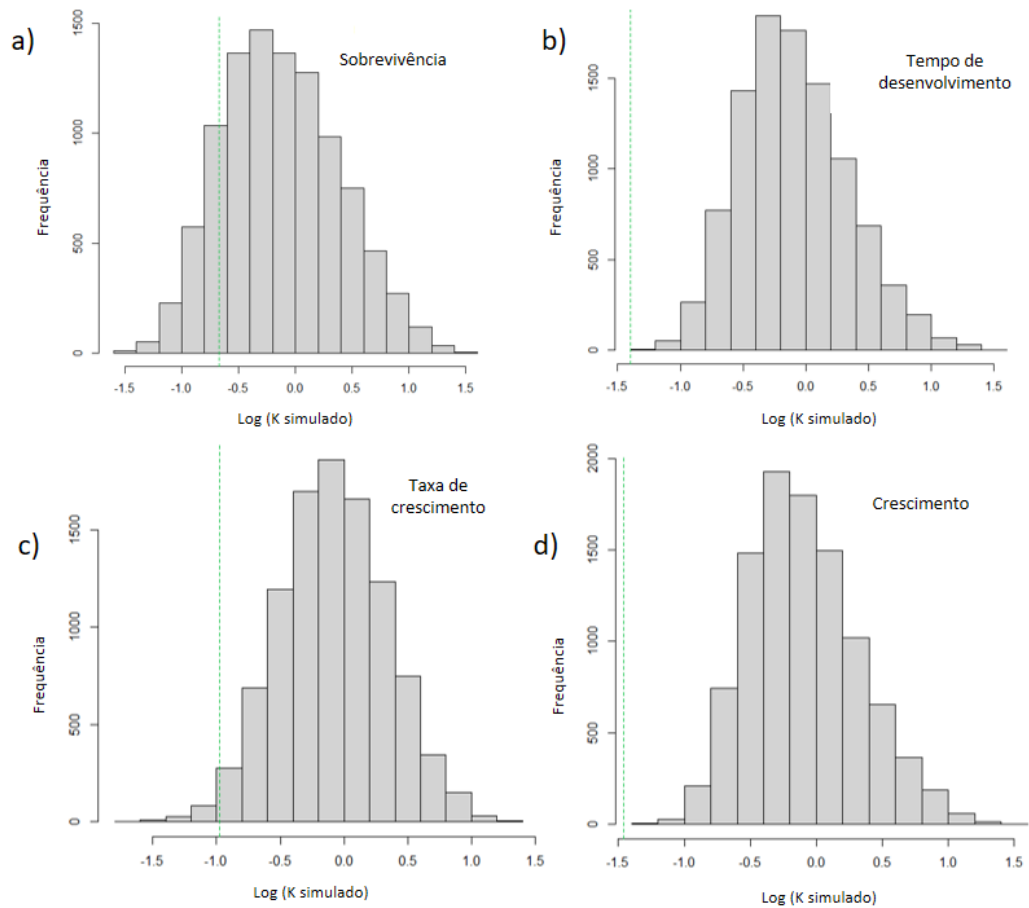


Figura 5. Distribuição de valores esperados para os traços avaliados em um modelo de evolução aleatória por movimento. As linhas pontilhadas representam os valores de K observados. A figura (a) mostra os dados para sobrevivência, b) para tempo de desenvolvimento, c) taxa de crescimento e d) crescimento.

Tabela suplementar 1. Informação resumida para cada comparação incluída na meta análise. Amp. atual se refere a Amplitude térmica atual do período chuvoso. Anom. se refere a Anomalia climática no período chuvoso para o passado profundo e o passado recente.

Referência	Família	Espécie	Estágio	Variável resposta	Temp °C	Controle			Temp °C	Tratamento			Long	Lat	Amp. Atual	Anom. 6ky	Anom. 1760	Tmax 1999
						Média	DV	n		Média	DV	n						
Alvarez e Nicieza 2002	Alytidae	Discoglossus galganoi	larval	crescimento	12	330.00	67.52	20	17	255.88	44.03	21	-5.57	43.43	6.71	-0.10	-0.13	12.00
Alvarez e Nicieza 2002	Alytidae	Discoglossus galganoi	larval	crescimento	12	330.00	67.52	20	22	163.92	44.02	21	-5.57	43.43	6.71	-0.10	-0.13	12.00
Anderson et al 2001	Hylidae	Pseudacris regilla	larval	crescimento	9.9	0.18	0.04	5	20.7	0.56	0.09	5	-123.21	44.70	8.76	-0.28	-0.51	10.52
Anderson et al 2001	Hylidae	Pseudacris regilla	larval	crescimento	9.9	0.18	0.04	5	25.7	0.54	0.06	5	-123.21	44.70	8.76	-0.28	-0.51	10.52
Baier et al 2016	Bufonidae	Bufo bufo	larval	crescimento	15	8.01	0.24	5	20	11.42	0.24	5	16.28	48.24	16.90	1.71	-0.09	24.41
Baier et al 2016	Bufonidae	Bufo bufo	larval	crescimento	15	10.50	6.91	5	20	16.65	0.76	5	16.28	48.24	16.90	1.71	-0.09	24.41
Blouin e Brown 2000	Ranidae	Rana cascadae	larval	crescimento	18	0.86	0.11	22	25	0.78	0.10	22	-121.83	44.42	10.94	-0.39	-0.54	7.59
Blouin e Brown 2000	Ranidae	Rana cascadae	larval	taxa crescimento	18	0.01	0.00	22	25	0.03	0.00	22	-121.83	44.42	10.94	-0.39	-0.54	7.59
Blouin e Brown 2000	Ranidae	Rana cascadae	larval	tempo desenvolvimento	18	57.45	2.06	22	25	24.57	1.56	22	-121.83	44.42	10.94	-0.39	-0.54	7.59
Browne e Edwards 2003	Pelodyridae	Ranoidea aurea	larval	crescimento	15	8.00	0.80	4	22	8.50	1.00	4	151.70	-32.85	9.11	-0.60	-0.42	26.38
Browne e Edwards 2003	Pelodyridae	Ranoidea aurea	larval	crescimento	15	8.00	0.80	4	28	10.50	0.80	4	151.70	-32.85	9.11	-0.60	-0.42	26.38
Browne e Edwards 2003	Pelodyridae	Ranoidea aurea	larval	crescimento	15	44.30	1.00	4	22	45.80	1.60	4	151.70	-32.85	9.11	-0.60	-0.42	26.38
Browne e Edwards 2003	Pelodyridae	Ranoidea aurea	larval	crescimento	15	44.30	1.00	4	28	50.10	1.40	4	151.70	-32.85	9.11	-0.60	-0.42	26.38
Burmeister 2015	Ranidae	Rana arvalis	larval	sobrevivencia	16	2.83	3.08	20	20	2.29	2.54	20	13.39	54.09	7.92	5.25	-0.08	7.58
Burmeister 2015	Ranidae	Rana arvalis	larval	sobrevivencia	16	2.83	3.08	20	24	3.10	3.24	20	13.39	54.09	7.92	5.25	-0.08	7.58
Burmeister 2015	Ranidae	Rana arvalis	larval	tempo desenvolvimento	16	51.27	3.13	20	20	28.97	1.21	20	13.39	54.09	7.92	5.25	-0.08	7.58
Chang et al. 2014	Rhacophoridae	Rhacophorus moltrechti	larval	sobrevivencia	17	87.05	13.27	5	22	92.09	2.41	5	120.53	23.04	3.93	-0.19	-0.42	28.01
Chang et al. 2014	Rhacophoridae	Rhacophorus moltrechti	larval	sobrevivencia	17	87.05	13.27	5	27	80.94	16.89	5	120.53	23.04	3.93	-0.19	-0.42	28.01
Chang et al. 2014	Rhacophoridae	Zhangixalus moltrechti	larval	tempo desenvolvimento	17	89.06	6.57	5	22	69.47	7.30	5	120.53	23.04	3.93	-0.19	-0.42	28.01
Chang et al. 2014	Rhacophoridae	Zhangixalus moltrechti	larval	tempo desenvolvimento	17	89.06	6.57	5	27	95.59	6.57	5	120.53	23.04	3.93	-0.19	-0.42	28.01
Chaparro Herrera et al 2018	Ambystomatidae	Ambystoma granulorum	embrionario	tempo desenvolvimento	14	7.51	0.37	4	19	8.66	0.43	4	-99.19	19.53	11.79	0.07	-0.32	22.34
Chaparro Herrera et al 2018	Ambystomatidae	Ambystoma granulorum	embrionario	tempo desenvolvimento	14	7.51	0.37	4	25	5.22	0.37	4	-99.19	19.53	11.79	0.07	-0.32	22.34
Dastansara et al 2017	Bufonidae	Bufo viridis	larval	crescimento	18	19.05	1.12	4	21	16.11	1.54	4	47.02	34.53	22.18	5.34	-0.68	16.00
Dastansara et al 2017	Bufonidae	Bufo viridis	larval	sobrevivencia	18	23.57	4.18	4	21	64.00	24.22	4	47.02	34.53	22.18	5.34	-0.68	16.00
Dastansara et al 2017	Bufonidae	Bufo viridis	larval	tempo desenvolvimento	18	150.40	7.83	4	21	86.58	13.47	4	47.02	34.53	22.18	5.34	-0.68	16.00
DiazPaez e Canales 2018	Leptodactylidae	Pleudorema thaul	larval	crescimento	15	4.20	0.52	3	25	3.38	0.48	3	-72.13	-37.61	6.75	2.32	-0.41	10.36
DiazPaez e Canales 2018	Leptodactylidae	Pleudorema thaul	larval	crescimento	15	833.33	252.39	3	25	516.75	215.88	3	-72.13	-37.61	6.75	2.32	-0.41	10.36
Freitas et al. 2017	Ranidae	Lithobates pipiens	larval	crescimento	23	4.61	0.50	3	28	5.55	0.50	3	2.79	56.34	4.81	0.18	-0.11	9.53
Freitas et al. 2017	Ranidae	Lithobates pipiens	larval	tempo desenvolvimento	23	42.91	0.99	3	28	37.09	1.09	3	2.79	56.34	4.81	0.18	-0.11	9.53
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Pelobatidae	Pelobates cultripes	larval	crescimento	24	25.17	1.58	9	32	24.17	1.06	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Scaphiopus holbrookii	larval	crescimento	24	13.22	1.29	50	32	12.41	1.30	47	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Spea intermontana	larval	crescimento	24	21.12	1.29	14	32	19.29	1.29	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Spea multiplicata	larval	crescimento	24	19.13	1.29	15	32	18.02	1.29	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Pelobatidae	Pelobates cultripes	larval	taxa crescimento	24	0.55	0.07	9	32	0.56	0.04	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Scaphiopus holbrookii	larval	taxa crescimento	24	0.63	0.03	50	32	0.78	0.10	47	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Spea intermontana	larval	taxa crescimento	24	0.67	0.06	14	32	0.83	0.05	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Spea multiplicata	larval	taxa crescimento	24	0.74	0.06	15	32	1.30	0.06	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Pelobatidae	Pelobates cultripes	larval	tempo desenvolvimento	24	42.44	4.74	9	32	36.13	4.73	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Scaphiopus holbrookii	larval	tempo desenvolvimento	24	21.90	0.53	50	32	16.02	3.17	47	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Spea intermontana	larval	tempo desenvolvimento	24	30.91	0.98	14	32	22.72	1.04	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre e Buchholz 2006	Scaphiopodidae	Spea multiplicata	larval	tempo desenvolvimento	24	28.15	1.54	15	32	16.02	0.53	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Gomez Mestre et al 2010	Phyllomedusidae	Agalychnis callidryas	larval	crescimento	21	0.07	0.01	15	29	0.08	0.01	21	-71.11	42.35	16.28	1.01	-0.59	25.64
Gomez Mestre et al 2010	Phyllomedusidae	Agalychnis callidryas	larval	crescimento	21	19.91	1.47	15	29	20.86	1.47	21	-71.11	42.35	16.28	1.01	-0.59	25.64
Gomez Mestre et al 2010	Pipidae	Xenopus laevis	larval	crescimento	18	0.06	0.02	27	24	0.07	0.02	26	-2.79	56.34	16.28	1.01	-0.59	25.64
Gomez Mestre et al 2010	Pipidae	Xenopus laevis	larval	crescimento	18	18.51	1.71	27	24	18.49	1.63	26	-2.79	56.34	16.28	1.01	-0.59	25.64
Gomez Mestre et al 2010	Phyllomedusidae	Agalychnis callidryas	larval	taxa crescimento	21	0.01	0.00	15	29	0.03	0.00	21	-71.11	42.35	8.63	0.20	-0.11	10.74
Gomez Mestre et al 2010	Pipidae	Xenopus laevis	larval	taxa crescimento	18	0.01	0.01	27	24	0.02	0.01	26	-2.79	56.34	8.63	0.20	-0.11	10.74

Gomez Mestre et al 2010	Phyllomedusidae	Agalychnis callidryas	larval	tempo desenvolvimento	21	49.53	3.14	15	29	29.21	3.30	21	-71.11	42.35	8.63	0.20	-0.11	10.74
Gomez Mestre et al 2010	Pipidae	Xenopus laevis	larval	tempo desenvolvimento	18	53.63	3.79	27	24	29.58	3.77	26	-2.79	56.34	8.63	0.20	-0.11	10.74
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Lissotriton helveticus	embrionario	crescimento	12	9.37	0.12	4	17	9.27	0.16	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Lissotriton vulgar	embrionario	crescimento	12	9.35	0.12	4	17	9.14	0.22	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Triturus cristatus	embrionario	crescimento	12	11.41	0.06	4	17	10.63	0.16	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Lissotriton helveticus	embrionario	sobrevivencia	12	0.95	0.10	4	17	0.95	0.10	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Lissotriton vulgaris	embrionario	sobrevivencia	12	0.85	0.13	4	17	0.95	0.06	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Triturus cristatus	embrionario	sobrevivencia	12	0.37	0.09	4	17	0.45	0.18	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Lissotriton helveticus	embrionario	tempo desenvolvimento	12	36.48	1.41	4	17	17.42	0.52	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Lissotriton vulgar	embrionario	tempo desenvolvimento	12	34.33	1.11	4	17	15.64	0.45	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Griffithsand e Wijer 1994	Salamandridae	Triturus cristatus	embrionario	tempo desenvolvimento	12	36.78	0.15	4	17	15.33	0.49	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	crescimento	15	52.50	15.84	8	20	19.30	7.35	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	crescimento	15	52.50	15.84	8	25	10.30	4.24	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	crescimento	15	52.50	15.84	8	30	20.30	6.79	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	sobrevivencia	15	7.60	2.38	8	20	14.90	0.65	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	sobrevivencia	15	7.60	2.38	8	25	12.40	2.12	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	sobrevivencia	15	7.60	2.38	8	30	9.30	3.96	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	tempo desenvolvimento	15	106.40	1.64	8	20	56.80	0.82	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	tempo desenvolvimento	15	106.40	1.64	8	25	45.00	3.39	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Harkey e Semlitsch 1988	Hylidae	Pseudacris ornata	larval	tempo desenvolvimento	15	106.40	1.64	8	30	45.60	2.77	8	-81.72	33.28	11.52	1.15	-0.53	31.11
Joly et al 2005	Pelodytidae	Pelodytes punctatus	larval	crescimento	15	16.30	0.84	3	25	15.80	0.68	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Joly et al 2005	Pelodytidae	Pelodytes punctatus	larval	crescimento	15	58.60	12.17	3	25	54.40	13.17	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Joly et al 2005	Pelodytidae	Pelodytes punctatus	larval	tempo desenvolvimento	15	89.70	13.77	3	25	59.00	5.57	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Maciel e Junca 2009	Leptodactylidae	Pleurodema diplolister	larval	crescimento	26	12.10	1.00	12	33	11.80	1.10	12	-38.97	-12.27	6.93	-0.33	-0.42	29.42
Maciel e Junca 2009	Bufonidae	Rhinella granulosa	larval	crescimento	26	5.70	0.40	12	33	6.20	0.40	12	-38.97	-12.27	6.93	-0.33	-0.42	29.42
Maciel e Junca 2009	Leptodactylidae	Pleurodema diplolister	larval	tempo desenvolvimento	26	24.80	6.40	12	30	18.10	6.00	12	-38.97	-12.27	6.93	-0.33	-0.42	29.42
Maciel e Junca 2009	Bufonidae	Rhinella granulosa	larval	tempo desenvolvimento	26	15.20	5.30	12	33	9.40	1.60	12	-38.97	-12.27	6.93	-0.33	-0.42	29.42
Morand et al 1997	Bombinatoridae	Bombina variegata	larval	crescimento	15	25.00	2.00	3	27	25.00	1.00	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Bufonidae	Bufo bufo	larval	crescimento	15	30.00	1.00	3	27	9.00	0.30	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Bufonidae	Epidalea calamita	larval	crescimento	15	14.00	1.00	3	27	7.00	0.40	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Ranidae	Rana dalmatina	larval	crescimento	15	60.00	3.00	3	27	25.00	2.00	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Ranidae	Rana temporaria	larval	crescimento	15	41.00	2.00	3	27	24.00	3.00	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Bombinatoridae	Bombina variegata	larval	tempo desenvolvimento	15	106.56	4.12	3	27	65.13	3.86	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Bufonidae	Bufo bufo	larval	tempo desenvolvimento	15	73.10	1.04	3	27	29.48	0.34	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Bufonidae	Epidalea calamita	larval	tempo desenvolvimento	15	73.83	1.71	3	27	44.96	2.34	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Ranidae	Rana dalmatina	larval	tempo desenvolvimento	15	106.48	2.30	3	27	49.25	7.35	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Morand et al 1997	Ranidae	Rana temporaria	larval	tempo desenvolvimento	15	64.26	0.79	3	27	48.29	2.98	3	5.08	45.81	10.20	5.27	-0.10	7.88
Moryia 1980	Hynobiidae	Hynobius retardatus	larval	crescimento	4	18.60	0.90	21	10	22.30	0.70	18	141.23	43.08	14.96	-1.68	-0.38	23.06
Moryia 1980	Hynobiidae	Hynobius retardatus	larval	crescimento	4	18.60	0.90	21	22	17.00	0.50	18	141.23	43.08	14.96	-1.68	-0.38	23.06
Mosavi et al 2017	Ranidae	Pelophylax ridibundus	larval	crescimento	18	23.21	1.80	4	21	28.03	0.10	4	49.28	35.97	23.07	-1.23	0.01	20.25
Mosavi et al 2017	Ranidae	Pelophylax ridibundus	larval	sobrevivencia	18	33.00	19.14	4	21	35.00	18.00	4	49.28	35.97	23.07	-1.23	0.01	20.25
Mosavi et al 2017	Ranidae	Pelophylax ridibundus	larval	tempo desenvolvimento	18	162.32	11.82	4	21	113.54	18.54	4	49.28	35.97	23.07	-1.23	0.01	20.25
Mueller et al 2019	Hylidae	Pseudacris hypochondriaca	embrionario	crescimento	10	1.79	0.93	39	15	2.01	0.72	39	-117.16	33.13	11.77	-0.65	-0.36	19.03
Mueller et al 2019	Hylidae	Pseudacris hypochondriaca	embrionario	crescimento	10	1.79	0.93	39	20	1.49	0.50	39	-117.16	33.13	11.77	-0.65	-0.36	19.03
Mueller et al 2019	Hylidae	Pseudacris hypochondriaca	embrionario	crescimento	10	1.79	0.93	39	25	2.49	1.08	39	-117.16	33.13	11.77	-0.65	-0.36	19.03
Mueller et al 2019	Hylidae	Pseudacris regilla	embrionario	sobrevivencia	10	89.96	12.72	6	15	92.38	17.48	13	-117.16	33.13	11.77	-0.65	-0.36	19.03
Mueller et al 2019	Hylidae	Pseudacris regilla	embrionario	sobrevivencia	10	89.96	12.72	6	20	93.42	15.33	10	-117.16	33.13	11.77	-0.65	-0.36	19.03
Mueller et al 2019	Hylidae	Pseudacris regilla	embrionario	sobrevivencia	10	89.96	12.72	6	25	96.54	10.39	9	-117.16	33.13	11.77	-0.65	-0.36	19.03
Orizaola e Laurila 2009 A	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	sobrevivencia	20	35.08	14.84	8	25	96.07	7.87	4	18.00	60.48	11.34	6.29	-0.31	8.96
Orizaola e Laurila 2009 A	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	sobrevivencia	20	42.62	12.98	8	25	85.25	9.84	4	18.00	60.48	11.34	6.29	-0.31	8.96
Orizaola e Laurila 2009 A	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	sobrevivencia	20	68.20	12.06	8	25	90.82	9.18	4	18.00	60.48	11.34	6.29	-0.31	8.96
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	20	1.69	0.10	8	25.38	1.00	0.04	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37

Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	20	1.51	0.11	8	25.38	1.06	0.06	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	20	1.36	0.04	8	25.38	1.05	0.04	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	sobrevivencia	20	75.69	17.41	8	25.38	93.54	7.38	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	sobrevivencia	20	69.92	19.80	8	25.38	95.08	4.31	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	sobrevivencia	20	94.46	4.35	8	25.38	99.38	1.23	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	20	27.29	1.94	8	25.38	23.38	1.06	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	20	22.75	2.24	8	25.38	24.02	0.95	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	20	27.98	1.05	8	25.38	33.89	1.90	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	20	62.43	3.31	8	25.38	42.84	1.46	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	20	67.98	3.31	8	25.38	44.44	1.46	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2009 B	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	20	49.42	0.83	8	25.38	32.89	1.17	4	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	19	0.73	0.04	9	26	0.92	0.08	9	22.97	52.97	17.22	1.98	-0.21	25.44
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	19	0.71	0.02	7	26	0.88	0.04	7	23.20	53.10	17.29	1.98	-0.21	25.43
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	19	0.74	0.04	10	26	0.90	0.06	10	22.88	54.23	11.16	1.93	20.17	4.46
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	19	0.74	0.05	9	26	0.89	0.06	9	25.18	57.07	15.95	0.07	-0.34	9.98
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	19	0.76	0.05	10	26	0.99	0.08	10	26.93	57.45	16.77	0.04	-0.35	9.57
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	19	0.72	0.07	10	26	0.89	0.05	10	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	19	0.75	0.04	10	26	0.89	0.06	10	18.02	60.53	11.34	6.29	-0.31	8.96
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	crescimento	19	0.79	0.05	10	26	0.94	0.08	10	17.93	60.58	12.35	1.03	5.36	8.70
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	19	18.58	1.26	9	26	13.09	0.71	9	22.97	52.97	17.22	1.98	-0.21	25.44
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	19	18.82	0.79	7	26	14.06	0.85	7	23.20	53.10	17.29	1.98	-0.21	25.43
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	19	18.54	1.43	10	26	13.80	1.12	10	22.88	54.23	11.16	1.93	20.17	4.46
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	19	18.97	1.59	9	26	14.19	1.07	9	25.18	57.07	15.95	0.07	-0.34	9.98
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	19	19.26	1.97	10	26	15.28	0.83	10	26.93	57.45	16.77	0.04	-0.35	9.57
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	19	21.79	2.13	10	26	14.03	0.87	10	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	19	23.22	1.02	10	26	14.19	0.87	10	18.02	60.53	11.34	6.29	-0.31	8.96
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	taxa crescimento	19	23.64	1.39	10	26	14.52	1.60	10	17.93	60.58	12.35	1.03	5.36	8.70
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	19	40.03	2.28	9	26	71.03	5.36	9	22.97	52.97	17.22	1.98	-0.21	25.44
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	19	38.37	1.33	7	26	63.09	3.47	7	23.20	53.10	17.29	1.98	-0.21	25.43
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	19	40.09	1.08	10	26	66.30	6.02	10	22.88	54.23	11.16	1.93	20.17	4.46
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	19	39.26	1.81	9	26	63.63	3.78	9	25.18	57.07	15.95	0.07	-0.34	9.98
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	19	40.09	2.23	10	26	65.47	4.21	10	26.93	57.45	16.77	0.04	-0.35	9.57
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	19	33.75	1.49	10	26	65.15	3.48	10	18.00	60.48	11.68	6.39	-0.30	9.37
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	19	32.71	1.72	10	26	64.42	3.80	10	18.02	60.53	11.34	6.29	-0.31	8.96
Orizaola e Laurila 2016	Ranidae	Pelophylax lessonae	larval	tempo desenvolvimento	19	33.84	1.05	10	26	65.58	5.21	10	17.93	60.58	12.35	1.03	5.36	8.70
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	embrionario	crescimento	16	9.12	0.32	4	20	8.31	0.31	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	embrionario	crescimento	16	9.12	0.32	4	24	9.55	0.31	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	embrionario	crescimento	16	7.58	0.25	4	20	9.75	0.31	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	embrionario	crescimento	16	7.58	0.25	4	24	8.23	0.28	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	crescimento	16	10.22	0.48	4	20	13.34	1.14	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	crescimento	16	10.22	0.48	4	24	10.93	0.50	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	crescimento	16	13.57	0.78	4	20	13.29	0.71	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	crescimento	16	13.57	0.78	4	24	12.15	2.45	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	taxa crescimento	16	0.16	0.01	4	20	0.16	0.01	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	taxa crescimento	16	0.16	0.01	4	24	0.15	0.02	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	taxa crescimento	16	0.25	0.02	4	20	0.29	0.02	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	taxa crescimento	16	0.25	0.02	4	24	0.28	0.06	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	embrionario	tempo desenvolvimento	16	11.72	0.68	4	20	15.18	0.57	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	embrionario	tempo desenvolvimento	16	11.72	0.68	4	24	9.43	0.64	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	embrionario	tempo desenvolvimento	16	10.46	0.57	4	20	9.22	0.72	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	embrionario	tempo desenvolvimento	16	10.46	0.57	4	24	9.75	0.53	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	tempo desenvolvimento	16	43.72	0.72	4	20	47.43	1.53	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76

Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	tempo desenvolvimento	16	43.72	0.72	4	24	36.80	0.72	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	tempo desenvolvimento	16	38.66	1.53	4	20	33.75	1.13	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Oromi et al 2015	Ranidae	Rana temporaria	larval	tempo desenvolvimento	16	38.66	1.53	4	24	32.78	3.46	4	1.05	42.62	16.70	0.10	-0.38	20.76
Qar et al 2013	Bufonidae	Bufo viridis	larval	crescimento	6	72.45	5.88	20	NA	28.60	3.17	20	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rumschlag et al 2014	Hylidae	Pseudacris regilla	larval	sobrevivencia	15	0.62	0.27	15	20	0.61	0.26	15	-122.78	38.03	6.45	-0.02	-0.32	13.42
Rumschlag et al 2014	Hylidae	Pseudacris regilla	larval	sobrevivencia	15	0.62	0.27	15	25	0.76	0.27	15	-122.78	38.03	6.45	-0.02	-0.32	13.42
SK Courtney Jones et al 2015	Limnodynastidae	Limnodynastes peronii	larval	crescimento	18	15.3	2.69	2	22	15.7	2.12	2	150.85	-34.43	8.90	-0.61	-0.38	25.09
SK Courtney Jones et al 2015	Limnodynastidae	Limnodynastes peronii	larval	crescimento	18	15.3	2.69	2	26	14.50	0.99	2	150.85	-34.43	8.90	-0.61	-0.38	25.09
SK Courtney Jones et al 2015	Limnodynastidae	Limnodynastes peronii	larval	sobrevivencia	18	73.20	7.35	2	22	27.50	9.76	2	150.85	-34.43	8.90	-0.61	-0.38	25.09
SK Courtney Jones et al 2015	Limnodynastidae	Limnodynastes peronii	larval	sobrevivencia	18	73.20	7.35	2	26	16.10	8.06	2	150.85	-34.43	8.90	-0.61	-0.38	25.09
SK Courtney Jones et al 2015	Limnodynastidae	Limnodynastes peronii	larval	tempo desenvolvimento	18	62.10	6.93	2	22	76.40	6.51	2	150.85	-34.43	8.90	-0.61	-0.38	25.09
SK Courtney Jones et al 2015	Limnodynastidae	Limnodynastes peronii	larval	tempo desenvolvimento	18	62.10	6.93	2	26	59.40	4.95	2	150.85	-34.43	8.90	-0.61	-0.38	25.09
Tang et al 2020	Dicroglossidae	Hoplobatrachus rugulosus	larval	crescimento	29	1.48	0.09	3	34	1.36	0.05	3	119.90	28.46	14.90	-0.04	-0.44	26.93
Tang et al 2020	Dicroglossidae	Hoplobatrachus rugulosus	larval	crescimento	29	22.00	0.52	3	34	21.20	0.35	3	119.90	28.46	14.90	-0.04	-0.44	26.93
Tang et al 2020	Dicroglossidae	Hoplobatrachus rugulosus	larval	tempo desenvolvimento	29	26.10	0.52	3	34	20.80	0.52	3	119.90	28.46	14.90	-0.04	-0.44	26.93
Touchon E Warkentin 2010	Hylidae	Dendropsophus ebraccatus	larval	sobrevivencia	25.2	32.03	0.87	10	26.2	29.12	2.25	10	79.70	9.11	4.92	0.73	-0.29	29.23
Vaissi e Shafiri 2016	Salamandridae	Neurergerus derjugini	larval	crescimento	15	29.07	1.61	12	18	32.08	1.88	12	46.40	35.35	21.60	-1.50	-0.52	17.14
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	crescimento	2	14.20	1.30	9	10	15.40	1.10	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	crescimento	2	14.90	0.80	9	10	15.00	1.20	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	crescimento	2	15.10	1.00	9	10	15.90	1.00	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	crescimento	2	14.20	1.30	9	15	13.60	0.90	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	crescimento	2	14.90	0.80	9	15	12.50	0.50	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	crescimento	2	15.10	1.00	9	15	13.20	1.00	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	tempo desenvolvimento	2	66.40	11.60	9	10	46.30	5.70	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	tempo desenvolvimento	2	72.20	7.40	9	10	45.20	8.40	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	tempo desenvolvimento	2	69.80	7.20	9	10	48.30	4.60	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	tempo desenvolvimento	2	66.40	11.60	9	15	22.40	2.20	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	tempo desenvolvimento	2	72.20	7.40	9	15	22.60	1.90	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Voss 1993	Ambystomatidae	Ambystoma maculatum	embrionario	tempo desenvolvimento	2	69.80	7.20	9	15	21.60	3.50	9	-83.67	35.29	16.52	1.63	-0.43	28.74
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	crescimento	20	0.30	0.02	6	24	0.25	0.02	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	crescimento	20	0.30	0.02	6	28	0.23	0.02	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	crescimento	20	0.30	0.02	6	32	0.23	0.03	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	crescimento	20	16.29	8.75	6	24	17.29	8.57	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	crescimento	20	16.29	8.75	6	28	22.29	2.10	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	crescimento	20	16.29	8.75	6	32	20.36	4.72	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	sobrevivencia	16	0.90	42.11	6	20	67.64	24.77	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	sobrevivencia	16	0.90	42.11	6	24	74.21	22.29	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	sobrevivencia	16	0.90	42.11	6	28	71.69	26.01	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	sobrevivencia	16	0.90	42.11	6	32	48.93	33.44	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	tempo desenvolvimento	20	51.88	5.27	6	24	39.02	4.39	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	tempo desenvolvimento	20	51.88	5.27	6	28	37.77	5.27	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Wijethunga et al 2016	Bufonidae	Rhinella marina	larval	tempo desenvolvimento	20	51.88	5.27	6	32	31.51	8.32	6	147.95	-33.94	13.45	-0.99	-0.29	28.63
Yu et al 2015	Ranidae	Rana chensinensis	larval	crescimento	23.2	0.37	0.08	50	25.8	0.28	0.07	50	114.10	32.20	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2015	Ranidae	Rana chensinensis	larval	crescimento	23.2	0.37	0.08	50	28.1	0.26	0.12	50	114.10	32.20	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2015	Ranidae	Rana chensinensis	larval	taxa crescimento	23.2	4.07	0.96	50	25.8	3.26	1.03	50	114.10	32.20	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2015	Ranidae	Rana chensinensis	larval	taxa crescimento	23.2	4.07	0.96	50	28.1	3.20	1.48	50	114.10	32.20	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2015	Ranidae	Rana chensinensis	larval	tempo desenvolvimento	23.2	85.00	8.45	50	25.8	74.78	13.07	50	114.10	32.20	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2015	Ranidae	Rana chensinensis	larval	tempo desenvolvimento	23.2	85.00	8.45	50	28.1	69.24	28.44	50	114.10	32.20	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2016 A	Ranidae	Rana kukunoris	larval	crescimento	22.61	0.22	0.05	50	29.75	0.19	0.04	50	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 A	Ranidae	Rana kukunoris	larval	crescimento	22.61	11.63	1.12	50	29.75	11.05	1.12	50	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 A	Ranidae	Rana kukunoris	larval	taxa crescimento	22.61	3.43	0.24	50	29.75	3.44	0.82	50	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 A	Ranidae	Rana kukunoris	larval	tempo desenvolvimento	22.61	65.53	13.03	50	29.75	54.74	13.03	50	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67

Yu et al 2016 B	Bufonidae	Bufo gargarizans	larval	crescimento	22.6	0.13	0.04	100	25.8	0.11	0.04	100	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 B	Bufonidae	Bufo gargarizans	larval	crescimento	22.6	0.13	0.04	100	29.8	0.13	0.03	100	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 B	Bufonidae	Bufo gargarizans	larval	crescimento	22.6	9.49	1.46	100	25.8	8.58	1.09	100	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 B	Bufonidae	Bufo gargarizans	larval	crescimento	22.6	9.49	1.46	100	29.8	9.31	2.19	100	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 B	Bufonidae	Bufo gargarizans	larval	taxa crescimento	22.6	0.98	0.37	100	25.8	1.02	0.37	100	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 B	Bufonidae	Bufo gargarizans	larval	taxa crescimento	22.6	0.98	0.37	100	29.8	2.38	1.10	100	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 B	Bufonidae	Bufo gargarizans	larval	tempo desenvolvimento	22.6	74.25	27.52	100	25.8	62.83	14.43	100	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 B	Bufonidae	Bufo gargarizans	larval	tempo desenvolvimento	22.6	74.25	27.52	100	29.8	31.84	10.89	100	101.33	36.67	16.84	1.78	-0.25	16.67
Yu et al 2016 C	Dicroglossidae	Fejervarya limnocharis	larval	crescimento	26	0.15	0.05	70	29	0.16	0.06	70	114.02	32.13	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2016 C	Dicroglossidae	Fejervarya limnocharis	larval	crescimento	26	0.15	0.05	70	32	0.15	0.04	70	114.02	32.13	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2016 C	Dicroglossidae	Fejervarya limnocharis	larval	taxa crescimento	26	0.38	0.40	70	29	0.47	0.34	70	114.02	32.13	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2016 C	Dicroglossidae	Fejervarya limnocharis	larval	taxa crescimento	26	0.38	0.40	70	32	0.37	0.19	70	114.02	32.13	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2016 C	Dicroglossidae	Fejervarya limnocharis	larval	tempo desenvolvimento	26	55.22	18.25	70	29	45.59	29.90	70	114.02	32.13	16.94	0.05	-0.19	31.99
Yu et al 2016 C	Dicroglossidae	Fejervarya limnocharis	larval	tempo desenvolvimento	26	55.22	18.25	70	32	49.69	7.87	70	114.02	32.13	16.94	0.05	-0.19	31.99
Zhao et al 2014	Ranidae	Rana kukunoris	larval	crescimento	12.7	4.08	0.06	5	16.5	4.09	0.05	5	102.55	32.80	12.60	0.84	-0.47	14.68
Zhao et al 2014	Ranidae	Rana kukunoris	larval	crescimento	12.7	5.18	0.04	5	16.5	5.17	0.05	5	102.55	32.80	12.60	0.84	-0.47	14.68

Referências

- Anderson, M. T. et al. 2001. The direct and indirect effects of temperature on a predator-prey relationship. - *Can. J. Zool.* 79: 1834–1841.
- Baier, F. et al. 2016. Non-target effects of a glyphosate-based herbicide on Common toad larvae (*Bufo bufo*, Amphibia) and associated algae are altered by temperature. - *PeerJ* 2016: 1–23.
- Blouin, M. S. and Brown, S. T. 2000. Effects of temperature-induced variation in anuran larval growth rate on head width and leg length at metamorphosis. - *Oecologia* 125: 358–361.
- Browne, R. K. and Edwards, D. L. 2003. The effect of temperature on the growth and development of the endangered green and golden bell frog (*Litoria aurea*). - *J. Therm. Biol.* 28: 295–299.
- Burmeister, M. 2015. Effects of Temperature and Acidity on the Growth and Development of *Rana arvalis* larvae Effects of Temperature and Acidity on the Growth and Development of *Rana arvalis* larvae. in press.
- Chang, Y. M. et al. 2014. Winter breeding and high tadpole densities may benefit the growth and development of tadpoles in a subtropical lowland treefrog. - *J. Zool.* 294: 154–160.
- Chaparro-Herrera, D. de J. et al. 2018. Factors of global warming (UV-B radiation and temperature) affecting larval development of *Ambystoma granulosum*. - *Teor. y Prax.* 14: 131–154.
- Courtney Jones, S. K. et al. 2015. Long-term changes in food availability mediate the effects of temperature on growth, development and survival in striped marsh frog larvae: Implications for captive breeding programmes. - *Conserv. Physiol.* 3: 1–12.
- Dastansara, N. et al. 2017. Impacts of temperature on growth, development and survival of larval *Bufo* (*Pseudepidalea*) *viridis* (Amphibia: Anura): implications of climate change. - *Zool. Ecol.* 27: 228–234.
- Díaz-Páez, H. and Canales-Arévalo, C. 2018. Effect of temperature and type of diet on the metamorphosis of *Pleurodema thaul* (Lesson, 1826) in a population of south-central Chile. - *Anim. Biodivers. Conserv.* 41: 121–130.
- Freitas, J. S. and Almeida, E. A. 2016. Antioxidant defense system of tadpoles (*Eupemphix nattereri*) exposed to changes in temperature and pH. - *Zoolog. Sci.* 33: 186–194.
- Gomez-mestre, I. and Buchholz, D. R. 2007. Developmental plasticity mirrors differences among taxa in spadefoot toads linking plasticity and diversity. in press.
- Gomez-Mestre, I. et al. 2010. The shape of things to come: linking developmental plasticity to post-metamorphic morphology in anurans. - *J. Evol. Biol.* 23: 1364–1373.
- Griffiths, R. A. and Wijer, P. 1994. Differential effects of pH and temperature on embryonic development in the British newts (*Triturus*). - *J. Zool.*: 613–622.
- Harkey, G. A. and Semlitsch, R. D. 2014. Effects of Temperature on Growth, Development, and Color Polymorphism in the Ornate Chorus Frog *Pseudacris ornata* Effects of Temperature on Growth, Development, and Color Polymorphism in the Ornate Chorus Frog *Pseudacris ornata*. - *Copeia* 1988: 1001–1007.

- Joly, P. 2005. Canalization of Size at Metamorphosis Despite Temperature and Density Variations in *Pelodytes punctatus*. - *Herpetol. J.* 15: 45–50.
- Maciel, T. A. and Juncá, F. A. 2009. Effects of temperature and volume of water on the growth and development of tadpoles of *Pleurodema diplolister* and *Rhinella granulosa* (*Amphibia* : *Anura*). - *Zoologia* 26: 413–418.
- Morand, A. 1997. Phenotypic variation in metamorphosis in five anuran species along a gradient of stream influence. - *Ecology* 320: 645–652.
- Moryia, T. 1979. Effect of Temperature on Embryonic and Post Embryonic Development of Salamander , *Hynobius retardatus*. - *Low Temp. Sci.* 37: 113–115.
- Mueller, C. A. et al. 2019. Immediate and Persistent Effects of Temperature on Oxygen Consumption and Thermal Tolerance in Embryos and Larvae of the Baja California Chorus Frog , *Pseudacris hypochondriaca*. - *Front. Physiol.* 10: 1–12.
- Orizaola, G. and Laurila, A. 2009a. Microgeographic variation in temperature-induced plasticity in an isolated amphibian metapopulation. - *Evol. Ecol.* 23: 979–991.
- Orizaola, G. and Laurila, A. 2009b. Microgeographic variation in the effects of larval temperature environment on juvenile morphology and locomotion in the pool frog. - *J. Zool.* 277: 267–274.
- Oromi, N. et al. 2015. Variation of growth rate and survival in embryos and larvae of *Rana temporaria* populations from the Pyrenees. - *Acta Herpetol.* 10: 85–91.
- Qar, J. and Alawneh, S. 2013. Effect of Rearing Temperature on Larval *Bufo Viridis Viridis Laurenti* 1768. - *Singaporean J. Sci. Res.* 5: 17–23.
- Rumschlag, S. et al. 2014. The effects of the amphibian chytrid fungus, insecticide exposure, and temperature on larval anuran development and survival. - *Environ. Toxicol. Chem.* 33: 2545–2550.
- Tang, Y. et al. 2020. The combined effects of temperature and aromatase inhibitor on metamorphosis , growth , locomotion , and sex ratio of tiger frog (*Hoplobatrachus rugulosus*) tadpoles. - *Peer* 8: 1–17.
- Touchon, J. C. and Warkentin, K. M. 2011. Thermally contingent plasticity : temperature alters expression of predator-induced colour and morphology in a Neotropical treefrog tadpole. - *J. Anim. Ecol.* 80: 79–88.
- Vaissi, S. and Sharifi, M. 2016. Changes in food availability mediate the effects of temperature on growth , metamorphosis and survival in endangered yellow spotted mountain newt : Implications for captive breeding ... Changes in food availability mediate the effects of temperature on gr. - *Biologia (Bratisl)*. in press.
- Wijethunga, U. et al. 2016. Moving south : effects of water temperatures on the larval development of invasive cane toads (*Rhinella marina*) in temperate Australia. - *Ecol. Evol.*: 6993–7003.
- Yu, T. L. et al. 2015. Plasticity in metamorphic traits of Chinese brown frog (*Rana chensinensis*) tadpoles : the interactive effects of food level and rearing temperature. - *Anim. Biol.* 65: 233–240.
- Yu, T. L. et al. 2016a. Plasticity in Metamorphic Traits of *Rana kukunoris* Tadpoles: The Interactive Effects of Food Level and Rearing Temperature. *Russian Journal of Ecology.* 47: 552-556.
- Yu, T. et al. 2016b. Plasticity of metamorphic traits in a high-altitude toad : interactive effects of food level and temperature. - *Amphib. Reptil.*
- Yu, T. et al. 2016c. Plasticity in Metamorphic Traits of Rice Field Frog (*Rana limnocharis*) Tadpoles : The Interactive Effects of Rearing Temperature and Food Level. - *Asian Herpetol. Res.* 7: 265–270.
- Zhao, J. et al. 2014. Artificial Warming Facilitates Growth but Not Survival of Plateau Frog (*Rana kukunoris*) Tadpoles in Presence of Gape-Limited Predatory Beetles. - *PLoS One* in press.

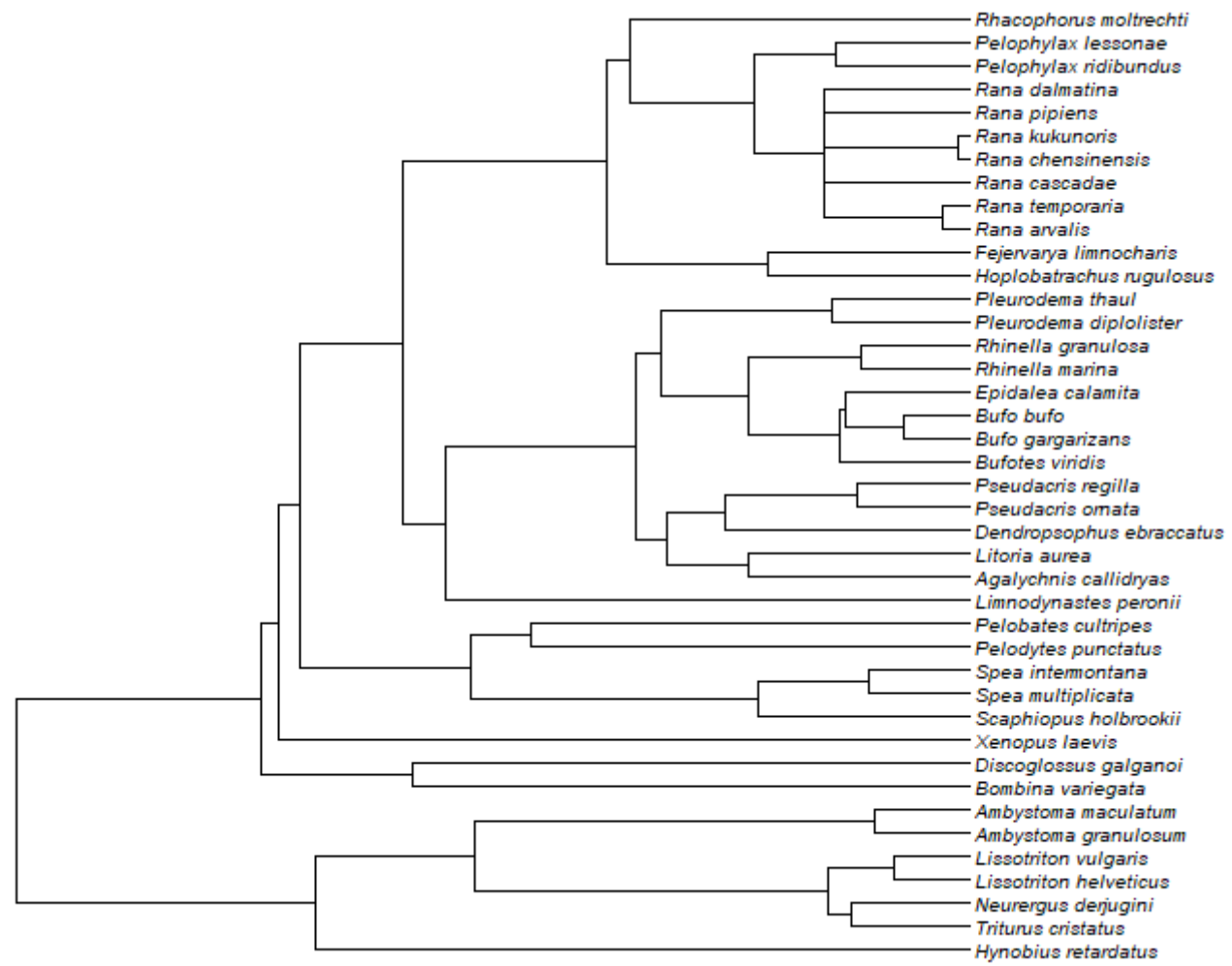


Figura suplementar S1. Relação de parentesco entre as espécies incluídas na meta-análise.

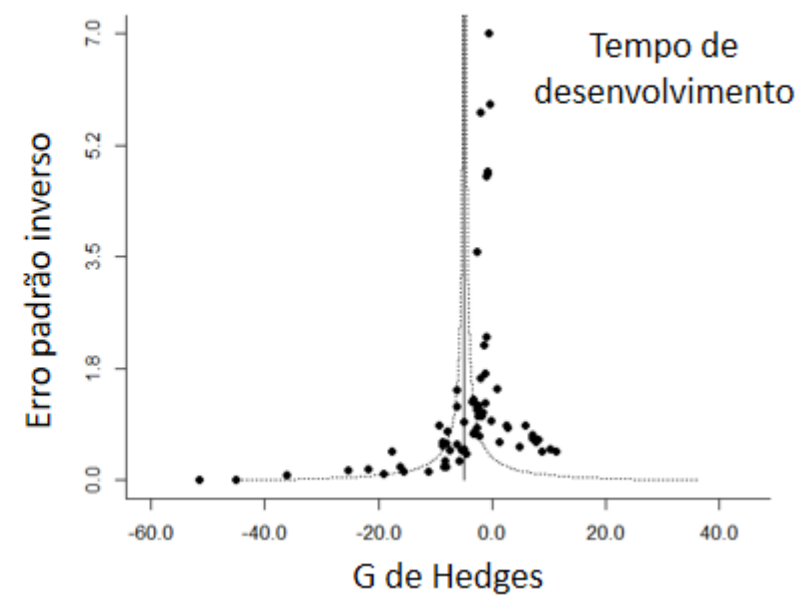
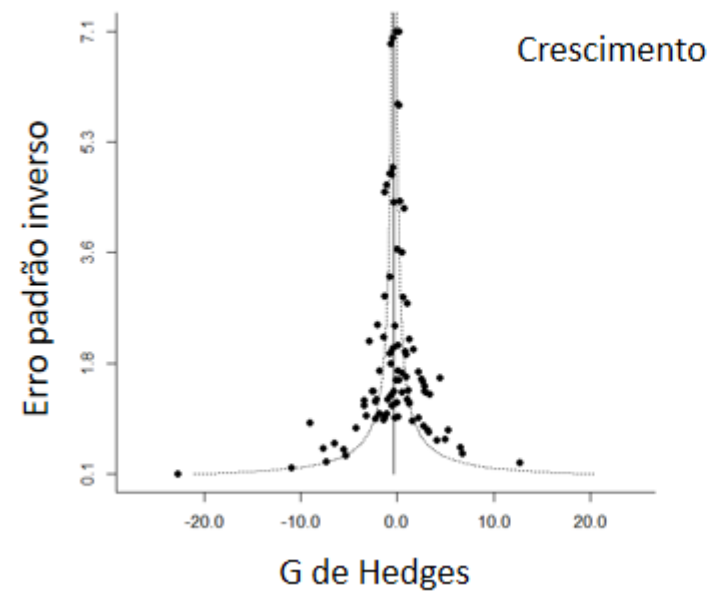
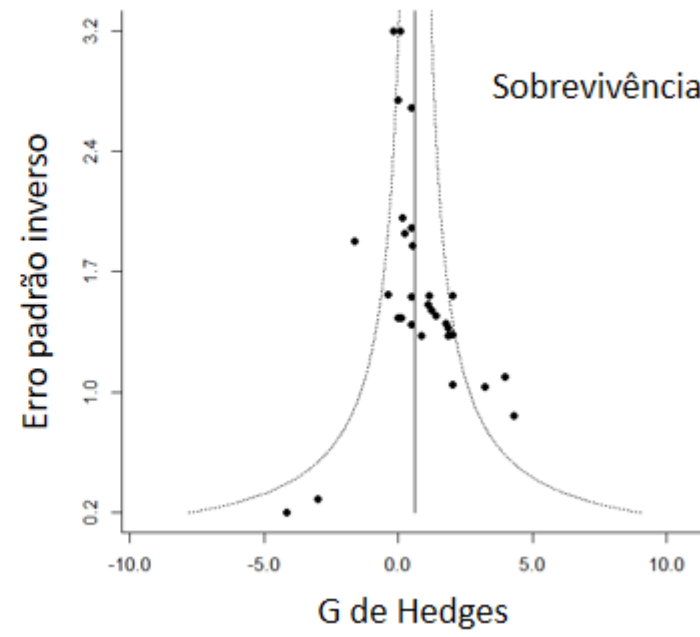
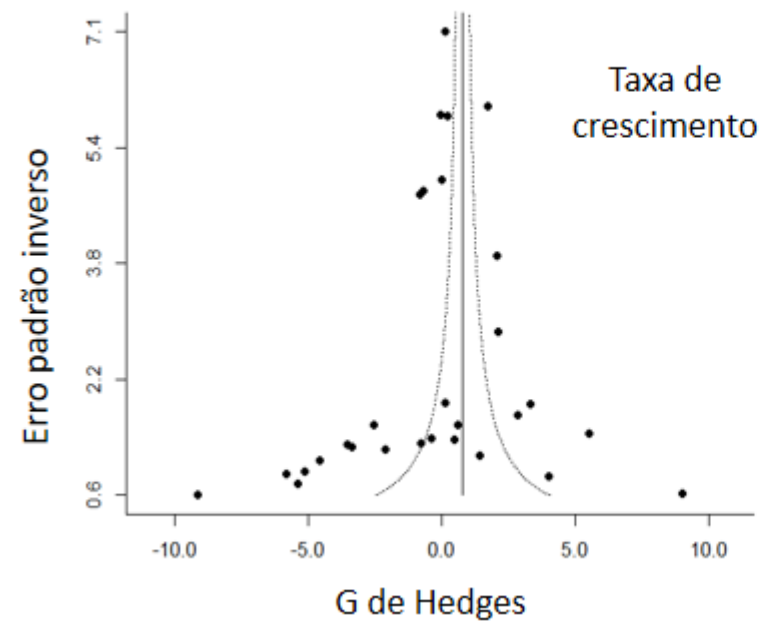


Figura suplementar S2. Gráficos de funil para todos os traços avaliados em nossa meta-análise.

```

# Código do R utilizado para conduzir Meta análise multinível

# Código obtido em Ximenes et al. 2019 (doi:10.1093/beheco/arz210)
# modificado por Gabriela Alves Ferreira (gabriela-alves77@hotmail.com)
# # # # Script alterado pela última vez em 20 de fevereiro de 2021 e funcional na versão R 4.0.2

#load packages
library(Matrix);library(permute);library(lattice);library(metafor);library(ape);library(picante);
library(phytools)

#set work directory
setwd("~/MESTRADO/Capitulo_MetaAnalise/analises_gab/dados")
list.files()

#import dataset
data<- read.csv("sobrevivencia_data.csv", head=T, sep=";")

#analysis
dat<- escalc(measure="SMD", n1i=n_treat, n2i=n_control,
            sd1i=sd_treat, sd2i=sd_control, m1i=mean_treat,
            m2i=mean_control,data=data, append=TRUE, vtype= "UB")
head(dat)

#####
##### PHYLOGENY #####
#####

phy<-read.nexus("tree_Gab.nexus")
windows()

Ntip(phy)
plotTree(phy,ftype="i",fsize=0.6,lwd=1)

vcv.anfib_uni<-vcv(phy,cor=T) # Matrix variance-covariance

#####
##### MULTILEVEL META-ANALYSIS #####
#####

three_metafor <- rma.mv(yi = dat$yi,
                      V = dat$vi,
                      random = list(~ 1 | reference,
                                    ~ 1 | Obs,

```

```

~ 1 | atual_especie),
R=list(atual_especie = vcv.anfib_uni),
Rscale = 3,
data=dat,
test = "t",
method = "REML")
summary(three_metafor)

#####
##### HETEROGENITY #####
#####
# I ^ 2 para rma.mv following Nakagawa & Santos 2012 (I2 total, I2phylo e I2entre spp):
# s2 é a variação dentro do estudo:
s2_fun<-function(vi){
  wi<-1/vi
  wi.2<-wi^2
  k<-length(vi)

  pri.ter<-(k-1)*sum(wi)
  seg.ter<-(sum(wi)^2)-(sum(wi.2))
  s2_obs<-pri.ter/seg.ter
  return(s2_obs)
}

s2_rma_mv<-s2_fun(vi = dat$vi)

I2_between_study <- three_metafor$sigma2[1]/ (sum(three_metafor$sigma2) + s2_rma_mv)
#Study level I^2

I2_within_study <- three_metafor$sigma2[2]/ (sum(three_metafor$sigma2) + s2_rma_mv)
#Comparisons level I^2

I2_phylo <- three_metafor$sigma2[3]/ (sum(three_metafor$sigma2) + s2_rma_mv)
#Phylogeny-level I^2

I2_within <- s2_rma_mv / (sum(three_metafor$sigma2) + s2_rma_mv) #Sampling error
I2_total <- 1 - I2_within #Total I^2
I2_total
I2_between_study
I2_within_study
I2_phylo

#####
##### PUBLICATION BIAS #####

```

```
#####

# Egger test
summary(lm(residuals.rma(three_metafor)~weights(three_metafor)))
plot(residuals.rma(three_metafor)~weights(three_metafor))
abline(lm(residuals.rma(three_metafor)~weights(three_metafor)))

# Trim-and-fill:
mea.yi<-as.numeric(unlist(by(dat$yi,INDICES = dat$reference,FUN=mean)))
mea.vi<-as.numeric(unlist(by(dat$vi,INDICES = dat$reference,FUN=mean)))
rma_mea<-rma.uni(yi=mea.yi,vi=mea.vi)
trimfill(rma_mea,estimator="L0")
trimfill(rma_mea,estimator="R0")

#####
##### Meta_regression #####
#####

attach(dat)
#correlation Pearson moderators
dat_mods<- na.omit(dat[,29:35])
dat_mods
colnames(dat_mods)<-c("Amp.Chuvas_Atual", "Anoma.TempoProfundo",
"Anoma.TempoRecente", "Temp.max.6kya", "Temp.max.1760", "Temp.max.1999",
"latitude")

correl<- cor(dat_mods, method = "pearson")
round(correl, 2)
library(corrplot)
corrplot(cor(correl), method = "circle")

##### Run meta regression #####
#example with latitude#

mods_three_ablat <- rma.mv(yi = filt_lat$yi,
V = filt_lat$vi,
random = list(~ 1 | reference,
~ 1 | Obs,
~ 1 | atual_especie),
R=list(atual_especie=vcv.anfib_uni),
Rscale = 3,
test = "t",
method = "REML",
mods = ~ latitude)
```

```

summary(mods_three_ablat)

#Pseudo-R2:
1-(sum(mods_three_ablat$sigma2) /sum(three_metafor$sigma2))

#####
##### Sinal Filogenético #####
#####

setwd("~/MESTRADO/Capitulo_MetaAnalise/analises_gab/dados")
list.files()

#leia a arvore filogenetica
library(ape)
phy <- read.nexus("tree_Gab.nexus")

#import dataset
dat_so<- read.table("sobrevivencia_phylosig.csv", head=T, sep=";")

#efeito médio sobrevivência
ES_med_so<-as.numeric(unlist(by(dat_so$yi,INDICES =dat_so$atual_especie,FUN=mean)))
#tamanho de efeito médio para as espécies
spp_so<- dat_so$atual_especie
nomes_so<-unique(spp_so)
nomes_so<-nomes_so[order(nomes_so)]
names(ES_med_so)<-nomes_so

library(picante)
dados_pareados_med_so <- match.phylo.data (phy = phy, data = ES_med_so)

#Calculando o sinal filogenético pelo K de Blomberg para cada variável
library(phytools)
phylosig (x = dados_pareados_med_so$data, tree = dados_pareados_med_so$phy, method =
"K", test = F)

#cortando a arvore para calcular o K nulo
phy_so<- keep.tip(phy, dat_so$atual_especie)
plot(phy_so)

#k simulado
lista.trait_so <- vector(mode = "list", length = 10000)
for(i in 1:10000){
  lista.trait_so[[i]] <- fastBM(tree = phy_so, a = 0, mu = 1, sig2 = 1)
}

```



```
print(i)
}

vetor.Knulos_so <- unlist(lapply(X = lista.trait_so,
                               FUN = phylosig, tree = phy_so, method = "K", test = F
                              )
                          )
hist(vetor.Knulos_so)

# K observado de 0.51 para sobrevivencia
abline(v = 0.512252, lty = 2, col = "#03C03C")

#calculando o pvalor
sum(vetor.Knulos_so <= 0.512252)/length(vetor.Knulos_so)
```

CAPÍTULO 2

Como o glifosato e o estresse térmico afetam a sobrevivência, crescimento e tolerância térmica em girinos de *Boana faber* (Hylidae, Anura)?

Gabriela Alves Ferreira, Marco Katzenberger, Fernanda Guimarães Fava, Renan Nunes Costa, Leildo

Carilo e Mirco Solé



Manuscrito a ser submetido no periódico Plos One

Como o glifosato e o estresse térmico afetam a sobrevivência, crescimento e tolerância térmica em girinos de *Boana faber* (Hylidae, Anura)?

Gabriela Alves Ferreira ^{1,2*}, Marco Katzenberger ³, Fernanda Guimarães Fava ¹, Renan Nunes Costa ⁴,
Leildo Carilo ⁵ e Mirco Solé ^{1,6}

1. *Tropical Herpetology Lab, Programa de Pós- Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade. Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brasil.*

2. *Kunhã Asé Network of Women in Science, Salvador, Brasil.*

3. *Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva, Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.*

4. *Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Minas Gerais, Santa Emília, CEP 36800-000. Carangola - Minas Gerais, Brasil.*

5. *Tropical Herpetology Lab, Programa de Pós- Graduação em Zoologia. Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900 Ilhéus, Bahia, Brasil.*

6. *Herpetology Section, Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig, Adenauerallee 160, 53113 Bonn, North Rhine-Westphalia, Germany.*

*Autora correspondente: Gabriela Alves Ferreira, e-mail: gabriela-alves77@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5661-3381>

Resumo

Ambientes estressantes podem levar à aceleração da metamorfose em detrimento do tamanho corporal, resultando na ocorrência de anormalidades morfológicas; muitos estudos associaram à ocorrência desses fenômenos à poluição dos habitats por agrotóxicos e ao estresse térmico. Aqui, avaliamos como a exposição ao glifosato (Roundup Original DI) e a temperaturas constantes mais altas afeta a sobrevivência de girinos de *Boana faber* e estimamos o CL50_{96hs} para a população. Além disso, avaliamos como a exposição ao Roundup afeta o crescimento, morfologia e tolerância térmica das larvas. Nossos achados sugerem que o Roundup tanto em doses letais quanto subletais pode afetar a sobrevivência das larvas de *Boana faber*. Também parece haver um efeito aditivo entre o Roundup e o aumento da temperatura na sobrevivência das larvas, no entanto, precisamos explorar melhor esse ponto para determinação de um padrão, revelando ser uma questão promissora a ser investigada no futuro. Observamos efeitos da exposição crônica ao herbicida na morfologia e crescimento dos girinos, resultando em redução no tamanho corporal e diferenças na forma das larvas. Embora não tenhamos recuperado nenhum efeito direto da exposição ao herbicida no CTMax, observamos uma tendência de aumento do CTMax para girinos expostos ao Roundup, o que precisa ser melhor explorado com uma ampliação do N. A compreensão de como alterações antrópicas no ambiente afetam a persistência dos anuros é fundamental para o manejo e conservação das espécies e pode ser considerada um passo inicial para a formulação de legislações que regulam o uso de herbicidas no entorno de unidades de conservação.

Abstract

Stressful environments can lead to an acceleration of metamorphosis to the detriment of body size, resulting in the occurrence of morphological abnormalities; many studies have associated the occurrence of these phenomena with habitat pollution by pesticides and thermal stress. Here, we evaluate how exposure to glyphosate (Roundup Original DI) and to higher constant temperatures affects the survival of *Boana faber* tadpoles and we estimate the CL5096hs for the population. In addition, we evaluated how exposure to Roundup affects the growth, morphology and thermal tolerance of the larvae. Our findings suggest that Roundup in both lethal and sublethal doses can affect the survival of *Boana faber* larvae. There also seems to be an additive effect between Roundup and the increase in temperature on larvae survival, however, we need to further explore this point to determine a pattern, revealing it to be a promising issue to be investigated in the future. We observed effects of chronic exposure to the herbicide on the growth and morphology of tadpoles, resulting in a reduction in total length and differences in the shape of the larvae. Although we have not recovered any direct effects from exposure to the herbicide on CTMax, we observed a trend of increasing CTMax for tadpoles exposed to Roundup, which needs to be further explored with an increase in N. Understanding how anthropogenic changes in the environment affect persistence of anurans is fundamental for the management and conservation of species and can be considered an initial step for the formulation of laws that regulate the use of herbicides in the vicinity of conservation units.

Introdução

Diante de uma perspectiva histórica, muitos pesquisadores veem na atual crise da biodiversidade um sexto evento de extinção em massa (Wake e Vredenburg 2008). Estressores antropogênicos como poluição, contaminação dos habitats, doenças emergentes, mudanças climáticas e introdução de espécies exóticas têm sido apontados como possíveis causadores do declínio das espécies, afetando diretamente a sua persistência e tornando-as mais suscetíveis à extinção (Stuart et al. 2004, Wake e Vredenburg 2008). Muitos organismos possuem a habilidade de responder à mudanças nas condições ambientais com fenótipos ambientalmente induzidos. Anfíbios larvais, por exemplo, podem reduzir seu tempo até a metamorfose e seu comprimento corporal em resposta a condições ambientais adversas (McDiarmid e Altig 1999).

As respostas dos anfíbios às mudanças ambientais podem ser mediadas por mecanismos complexos (Katzenberger et al. 2014). Prever estas respostas com mais precisão requer o entendimento de como o estresse provocado por uma mudança ambiental, como por exemplo, o aumento da temperatura da água, pode interagir com o estresse induzido por outro tipo de estressor, como a contaminação por poluentes (Pörtner e Farrell 2008). É conhecido, por exemplo, que a toxicidade de alguns poluentes pode ser influenciada por condições abióticas como temperatura e pH, e também pela presença de outros poluentes (Rand 1995). Para uma melhor compreensão dos efeitos dessas ameaças nos anfíbios são necessários projetos experimentais mais complexos e biologicamente realistas que, potencialmente, permitirão previsões mais próximas do que pode ocorrer em ambiente natural (Broomhall 2002, Relyea 2012, Rohr e Palmer 2012). No entanto, a maior parte dos estudos que investigam o efeito da toxicidade de poluentes ou das mudanças climáticas em anfíbios, avaliam os fatores isoladamente ignorando o possível efeito sinérgico, aditivo ou antagônico que pode existir entre estes estressores (Broomhal 2002).

A exposição a poluentes e a temperaturas mais elevadas pode afetar diversos aspectos fisiológicos e morfológicos de anfíbios (Bridges 1999, Phillimore et al. 2010, Denoël et al. 2013, Katzenberger et al. 2014). No entanto, os mecanismos por trás dessas mudanças são diversos e, por vezes, difíceis de determinar (Costa e Nomura 2016). Sob condições aquáticas agravantes (e.g. lagoa aquecida prestes a secar, ambiente poluído), larvas de anfíbios podem apresentar fenótipos ambientalmente induzidos. Assim, o ambiente ao qual um organismo é exposto durante seu desenvolvimento inicial larval pode ter efeitos profundos na expressão fenotípica dos seus genótipos, de modo que a depender das condições ambientais, um único genótipo pode gerar vários fenótipos (Pigliucci 2001). Nos casos em que a plasticidade fenotípica aumenta a chance de persistência da espécie no novo ambiente, ela pode ser considerada adaptativa e em escalas de tempo mais longas, pode promover a evolução para um novo fenótipo ótimo favorecido pela seleção direcional (Ghalambor et al. 2007). Por outro lado, ambientes estressantes também podem induzir a plasticidade não adaptativa nos casos em que reduz a aptidão dos organismos, podendo levar ao distanciamento do fenótipo ótimo para a espécie (Katzenberger et al. 2014).

A taxa de crescimento e de desenvolvimento são características que apresentam alta plasticidade fenotípica em resposta a ambientes em mudança (Rohr et al. 2011). Em geral, girinos submetidos a ambientes estressantes tendem a apresentar tempo de desenvolvimento mais curto e taxas de crescimento mais rápidas, resultando em um menor tamanho corporal na metamorfose quando comparados a coespecíficos criados em ambientes ótimos. Apesar dessa estratégia favorecer a persistência da espécie sob ambientes estressantes, ela também pode acarretar em custos fisiológicos e morfológicos (Gomez-Mestre et al. 2013). O aceleração do desenvolvimento ontogenético pode causar anormalidades morfológicas nos girinos (e.g. (Bridges 1999, Egea-Serrano et al. 2012, Costa e Nomura 2016, Bolis et al. 2020),

potencialmente refletindo em componentes do fitness como crescimento, longevidade e sobrevivência (Møller 1997).

Além dos efeitos diretos causados por diferentes estressores, também podem ocorrer efeitos indiretos resultantes da interação entre o aumento da temperatura e a poluição química. A hipótese da sensibilidade tóxica mediada pelo clima prevê que o aumento do metabolismo provocado por temperaturas mais altas pode elevar o impacto dos poluentes em ectotérmicos, aumentando o gasto de energia para manutenção das funcionalidades do organismo (Hooper et al. 2013). Com o aumento das taxas metabólicas para desintoxicação de poluentes, como metais pesados ou agroquímicos, a capacidade dos girinos de reagir ao aumento da temperatura da água se torna limitada (Hallman e Brooks 2015). É conhecido que, sob temperaturas mais altas, a concentração de oxigênio reduz, aumentando as taxas metabólicas para organismos que se desenvolvem em locais com temperatura elevada. Esse efeito pode ser biologicamente irrelevante e afetar de forma muito fraca os indivíduos, se os custos de manutenção padrão são baixos (Hallman e Brooks 2015). No entanto, se o organismo tem seu metabolismo (demanda de oxigênio) elevado pelo aumento da temperatura ao mesmo tempo que está exposto a contaminantes, a sua demanda de energia pode se tornar muito alta e o oxigênio disponível na água pode não ser suficiente para atender as demandas respiratórias. O aumento na demanda por energia pode, portanto, restringir indiretamente a tolerância térmica superior nesses organismos (Hallman e Brooks 2015).

Aqui, avaliamos como a exposição ao herbicida glifosato (Roundup Original DI) afeta a sobrevivência, crescimento, morfologia e tolerância térmica em girinos de *Boana faber*. Também estimamos o CL50_{96hs} para a população. Além disso, avaliamos como a exposição combinada a doses subletais de Roundup e a temperaturas constantes mais altas afetam a sobrevivência das larvas. Esperamos um aumento da mortalidade para os girinos expostos a

concentrações mais altas de Roundup e a temperaturas constantes mais altas (McDiarmid e Altig 1999, Relyea 2005).

Também esperamos que os girinos expostos a doses subletais do herbicida Roundup apresentem menor tamanho corporal, bem como maiores alterações morfológicas (Costa e Nomura 2016). Além disso, como sugerido pela hipótese de sensibilidade tóxica mediada pelo clima (Hallman e Brooks 2015), hipotetizamos que os girinos expostos ao Roundup devem apresentar menores valores de temperatura crítica máxima (CTMax - temperatura na qual a capacidade de reação cessa em animais, caracterizada pela imobilidade) (Taylor et al. 2020).

Material e métodos

Coleta dos indivíduos e sistema experimental

O sapo martelo (*Boana faber*) é uma espécie pertencente à família Hylidae, amplamente distribuída na América do Sul, e pode ser encontrada tanto em ambientes florestais quanto em áreas abertas ou antropizadas (Martins e Haddad 1988). Coletamos quatro massas de ovos recém eclodidos em novembro de 2020 e em março de 2021 em um corpo d'água lântico (14°55'19,8"S e 39°01'30,4"W, Figura 1) situado no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. Como os casais de *B. faber* constroem piscinas individuais para cada desova, é possível afirmar que cada uma das quatro pertence a diferentes casais. A poça possui vegetação herbácea em seu entorno e não há indícios de uso de agrotóxicos. Transportamos os girinos para o Laboratório de Herpetologia Tropical da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde combinamos as ninhadas em um único tanque de armazenamento (60cm x 40cm x 40cm) contendo 6 litros de água desclorada, dissolvendo um potencial efeito parental. Os girinos foram alimentados *ad libitum* diariamente com ração para peixes ornamentais Alcon colours.

Os experimentos foram conduzidos em laboratório, sob condições controladas (25° C, 12h luz/12h escuro), utilizando aquários de vidro (60cm x 40cm x 40cm) com 2L de água desclorada, sem substrato e sem vegetação como unidades experimentais. Todos os girinos utilizados para os experimentos se encontravam acima do estágio 25 de desenvolvimento (Gosner 1960). Utilizamos como contaminante, em todos os experimentos, uma formulação comercial de glifosato (ROUNDUP ORIGINAL DI®) com 48% de ingrediente ativo. A meia-vida do glifosato no meio ambiente pode chegar até a 21 dias (Giesy et al. 2000) assim, os experimentos de exposição crônica e aguda tiveram uma única aplicação do contaminante dentro do período avaliado. As doses utilizadas na exposição aguda foram baseadas em estudos recentes que avaliam o efeito de agrotóxicos em larvas de anuros (Jones et al. 2010, Egea-Serrano et al. 2012, Lajmanovich et al. 2013, Costa e Nomura 2016) enquanto a dose utilizada na exposição crônica foi estimada em um teste piloto e confirmada no experimento 1, a fim de garantir a sobrevivência dos indivíduos e, posterior observação dos efeitos subletais do contaminante químico.

Experimento 1: exposição aguda ao Roundup

Após 20 dias de desenvolvimento desde a eclosão, expusemos os girinos à exposição aguda ao Roundup utilizando cinco concentrações nominais do herbicida: controle: 0 mg a.i./L; tratamento 1: 2 mg a.i./L; tratamento 2: 4 mg a.i./L; tratamento 3: 6 mg a.i./L e tratamento 4: 8 mg a.i./L, que correspondem às doses de 4.16, 8.33; 12.5 e 16.66 ul/L, respectivamente. No controle aplicamos uma dose de 25 ul de água para evitar um potencial efeito do modo de aplicação do herbicida. Replicamos cada tratamento seis vezes, totalizando 30 unidades experimentais com 10 girinos cada e dispomos os aquários de modo randomizado. Examinamos os aquários a cada 24 horas, removendo e contabilizando os indivíduos mortos. O pH foi aferido no início e no final do experimento. Ao atingir 96 horas de exposição,

finalizamos o experimento e registramos o número total de indivíduos sobreviventes que, posteriormente foram eutanasiados em solução aquosa de xilocaína, fixados em formalina 10% e serão adicionados à coleção científica da Universidade Estadual de Santa Cruz (MZUESC).

Experimento 2: exposição crônica à temperatura e ao Roundup

Após 20 dias de desenvolvimento, os girinos foram alocados em aquários para avaliação do efeito do aumento da temperatura e do herbicida Roundup. Assim, foram realizadas combinações de dois fatores com dois níveis cada: glifosato (concentrações nominais de 0 mg a.i./L e 5.58 mg a.i./L) e temperatura (25° e 32° C). Replicamos cada tratamento cinco vezes, totalizando 20 unidades experimentais com 15 girinos em cada e dispomos os aquários aleatoriamente. Utilizamos aquecedores de aquário Hot (5W) para manter a água à temperatura de teste desejada e termostatos Ageon para manter a temperatura constante. Os indivíduos mortos foram contabilizados e removidos das unidades experimentais. Após 14 dias de exposição, finalizamos o experimento e eutanasiamos as larvas sobreviventes seguindo o mesmo procedimento citado no experimento 1.

Experimento 3: exposição crônica ao Roundup

Após 20 dias de desenvolvimento, os girinos foram alocados aleatoriamente nos aquários e submetidos à exposição ao herbicida Roundup sob doses nominais de 5.58 mg a.i./L para o tratamento com herbicida e 0 mg a.i./L para o controle. Replicamos o tratamento com glifosato 5 vezes e o controle 4 vezes, totalizando 9 unidades experimentais com 20 girinos em cada. Após 10 dias de exposição, finalizamos o experimento e coletamos aleatoriamente entre 5 e 6 girinos de cada unidade experimental para realização das análises morfológicas, totalizando 25 girinos para cada tratamento. As larvas foram eutanasiadas seguindo o procedimento citado no experimento 1 e, em seguida, foram posicionadas em um pequeno aquário com gel de ultrassom e água para obtenção de imagens em vista dorsal e lateral. Para

isso, uma câmera digital foi posicionada em um tripé a 30 cm de altura. Analisamos as imagens no software ImageJ aferindo as seguintes medidas lineares: comprimento total do girino (CTG), comprimento do corpo (CCO), altura do corpo (AC), comprimento da cauda (CCA), altura máxima da cauda (AMAC), altura da musculatura caudal (AMUC). Os girinos restantes foram mantidos vivos nas unidades experimentais para aferição de sua tolerância térmica através da temperatura crítica máxima (CTMax).

Temperatura crítica máxima

Para obter o CTMax das larvas e avaliar se a exposição ao glifosato afeta a tolerância térmica dos indivíduos, seguimos o protocolo proposto por (Lutterschmidt e Hutchison 1997). A massa de cada girino foi aferida antes do início do teste de tolerância térmica. Expusemos 12 girinos de cada tratamento do experimento 3 a uma taxa de aquecimento constante de $0.25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ até que atingissem a temperatura crítica máxima. O ponto final do experimento foi definido pela ausência de reação dos girinos (imobilidade total) após a estímulos externos (Gutiérrez-Pesquera et al. 2016). Após o término dos testes, os girinos foram transferidos para água em temperatura ambiente (aproximadamente 25° C), onde foram alocados para recuperação por um período de 24 horas. Indivíduos mortos dentro das 24 horas foram excluídos das análises por considerarmos que poderia sobre- estimar o CTMax.

Morfometria geométrica

As variações nas formas dos girinos foram aferidas por meio de técnicas de morfometria geométrica. Este método permite avaliar a variação nos forma dos indivíduos em um sistema de coordenadas representado em um plano cartesiano (Monteiro e Reis 1999). Para acessar diferenças na forma, digitalizamos 24 landmarks e semilandmarks em 29 indivíduos de cada tratamento do experimento 3, através dos programas tpsUtil (Rohlf 2009) e tpsDig2 (Rohlf 2008). Para definição dos landmarks seguimos Katzenberger et al. (2014), mas excluimos o

ponto 8 devido às diferenças morfológicas entre *B. faber* e a espécie de referência (*Hyla versicolor*).

Análises estatísticas

Utilizamos uma regressão pelo método probit (Finney 1971) para estimar a concentração letal de Roundup Original DI para 50 % da população (CL50_{96h}). Avaliamos o efeito da exposição a temperatura e ao Roundup na sobrevivência das larvas através de uma Análise de Variância (ANOVA two way), seguido pelo teste *a posteriori* de Tukey. Essa análise foi realizada para o três momentos de aferição da sobrevivência do experimento 2.

Avaliamos se os dados de tamanho corporal e tolerância térmica superior obtidos no experimento 3 seguiam os pressupostos de normalidade e homocedasticidade e conduzimos um Test T para amostras independentes para avaliar como essas variáveis são afetadas pelo glifosato. Como todas as medidas lineares estavam correlacionadas com o comprimento total dos girinos, utilizamos apenas esta variável como proxy do crescimento.

O efeito do herbicida na sobrevivência das larvas foi avaliado através do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, visto que os dados não atendiam os pressupostos de normalidade e homocedasticidade. Testamos se o CTMax estava correlacionado com a massa (mg) dos girinos através do coeficiente de correlação de Pearson. Para avaliar as variações na morfologia das larvas sem efeitos do tamanho, posição e orientação, aplicamos um método de sobreposição de Procrustes utilizando os 24 landmarks. Depois, aplicamos uma análise discriminante para avaliar se existe diferença na forma de girinos expostos ao Roundup quando comparados ao controle. Todas as análises de forma foram realizadas no software MorphoJ (Klingenberg 2011) e as demais análises foram conduzidas no ambiente R (R core Team 2021). Os gráficos apresentam média e desvio padrão como medida de variância. Consideramos um nível de significância de 0.05.

Permissão

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (processo n° 018/19), seguindo as normas emitidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais foram coletados e transportados sob autorização do SISBIO-ICMBio (n° 73441-1).

Resultados

O CL_{50}_{96hs} estimado para a população de *Boana faber* foi de 7.45 mg a.i./L (15.5 ul/L). O pH e a temperatura da água foram mantidos constantes durante a exposição (pH = 6.8 +- 0.58; temperatura = 25.69 +- 0.65° C). O experimento que avalia o efeito da exposição ao Roundup juntamente com temperaturas mais altas, havia sido planejado para explorar os efeitos subletais dos dois estressores, contudo a temperatura utilizada (32°C) combinada ao Roundup (5.58 mg a.i./L) provocou um efeito agudo extremo nas taxas de sobrevivência dos girinos, visto que com apenas quatro dias de exposição, todos os girinos distribuídos nas réplicas deste tratamento já estavam mortos (Tabela 2, Figura 2).

As larvas expostas ao herbicida Roundup apresentaram redução significativa em sua sobrevivência ($t = 20$, $p < 0.0001$, Tabela 1, Figura 3a). Além disso, foi observada redução no comprimento total, ($p < 0.0001$), com média de 15.57 mm, enquanto as larvas do controle apresentaram em média, 18.56 mm de comprimento (Tabela 1, Figura 3b). Não encontramos diferença significativa na temperatura crítica máxima (CTMax) das larvas expostas ao Roundup quando comparadas ao controle ($t = -2.13$, $df = 13.02$, $p = 0.051$, Tabela 1, Figura 3c), embora tenhamos observado uma tendência ao aumento do CTMax para larvas expostas ao Roundup. A massa das larvas não foi correlacionada com o CTMax (Pearson = -0.06, $p = 0.78$).

A análise discriminante mostrou que a exposição ao Roundup afeta a morfologia das larvas ($p = 0.02$, $t = 510.59$, Figura 4).

Discussão

Nossos resultados sugerem que a exposição combinada ao Roundup e a temperaturas constantes mais altas pode reduzir mais fortemente a sobrevivência das larvas do que a exposição aos fatores isolados, no entanto, mais testes precisam ser realizados para confirmar a existência do efeito aditivo. A exposição subletal ao herbicida também pode provocar efeitos morfológicos pronunciados nas larvas, como redução no tamanho corporal e alterações na forma dos indivíduos. O CTMax das larvas expostas ao Roundup foi ligeiramente mais alto do que dos indivíduos do controle, mas não encontramos efeitos significativos.

O CL50_{96hs} para a população de *Boana faber* (7.45 mg a.i./L) é considerado alto quando comparado ao CL50 para outras espécies de anfíbios expostas ao Roundup. Por exemplo, Jones et al. (2010) encontraram um CL50 de 2.44 mg a.i./L para girinos de *Rana sylvatica* (Ranidae) e de 2.30 mg a.i./L para girinos de *Bufo americanus* (Bufonidae) expostos ao Roundup Original MAX durante 7 dias. Costa e Nomura (2016) estimaram o CL50_{96hs} em 2.13 mg a.i./L para larvas de *Physalaemus cuvieri* (Leptodactylidae) expostas ao Roundup Original com 48% de ingrediente ativo, enquanto Simioni et al. (2013) encontraram um CL50_{96hs} de 5.38 mg a.i./L para larvas de *Physalaemus albonotatus* (Leptodactylidae).

Já as larvas de *Xenopus laevis* estudadas por Perkins et al. (2000), apresentam um CL50 extremamente alto (9.3 mg a.i./L) quando expostas ao Roundup com 356 g de ácido glifosato por litro, assim como foi demonstrado para *Physalaemus centralis* (Leptodactylidae) com CL50_{96hs} de 19.7 mg a.i./L. Assim, fica evidente que o Roundup pode ter efeitos distintos a depender da espécie utilizada como modelo, da formulação aplicada no bioensaio e das diferenças metodológicas entre estudos (e.g. mesocosmos e experimentos em laboratório,

diferenças na quantidade de indivíduos por unidade experimental), dificultando a classificação das espécies mais susceptíveis ao herbicida (Mann et al. 2009) e limitando a comparação da toxicidade do Roundup entre diferentes espécies.

A exposição ao Roundup não afetou apenas a sobrevivência das larvas, mas também provocou efeitos subletais morfológicos em *Boana faber*. Aqui, observamos uma forte redução no comprimento total e alterações pronunciadas na forma das larvas como consequência da exposição ao Roundup. Como já é conhecido, os girinos possuem capacidade de dispersão extremamente limitada e precisam se adaptar ao estresse ambiental para conseguir sobreviver nos locais escolhidos pelos parentais (McDiarmid e Altig 1999). A plasticidade nas características metamórficas pode ser considerada uma forma de “driblar” condições ambientais estressantes, embora possa resultar em custos morfológicos, fisiológicos e de história de vida para as larvas (Gomez-Mestre et al. 2013).

Girinos que se desenvolvem em ambientes estressantes podem ter aumentos na produção dos hormônios do estresse que, subsequentemente, interagem com os hormônios da tireoide (HT), principais responsáveis pela chegada a metamorfose, aumentando a produção de HT e acelerando o tempo metamórfico (Tata 2008, Laudet 2011). No entanto, apesar de permitir a sobrevivência, a redução no tamanho corporal e no tempo até a metamorfose pode ter efeitos diretos no fitness dos indivíduos (Gomez-Mestre et al. 2013). O menor tamanho na metamorfose pode impactar a seleção sexual e o sucesso reprodutivo dos adultos, afetando por exemplo, o sucesso de acasalamento e a quantidade e o tamanho dos ovos produzidos pelas fêmeas (Mays et al. 2006, Hayes et al. 2010). Portanto, mesmo que os indivíduos consigam sobreviver sob doses subletais, sua aptidão pode estar seriamente comprometida refletindo na persistência da população a longo prazo.

O efeito dos contaminantes químicos na fisiologia térmica dos ectotérmicos ainda precisa ser melhor explorado para delinear as implicações gerais dos impactos do Roundup na tolerância térmica superior. Patra et al. (2007) por exemplo, demonstraram que a exposição ao inseticida Endosulfan pode reduzir a CTMax em peixes. Por outro lado, Katzenberger et al. (2014) demonstraram que a exposição ao Roundup não afeta o CTMax das larvas de *Hyla versicolor*. Em nossos experimentos observamos um aumento no CTMax para os indivíduos de *Boana faber*, resultado que contrasta com os resultados encontrados por Katzenberger et al. (2014) para *H. versicolor*. Esses resultados sugerem que o efeito dos contaminantes químicos na fisiologia térmica dos ectotérmicos pode depender do tipo e concentração do contaminante utilizado, da formulação do contaminante e do modo como ele afeta os organismos (Katzenberger et al. 2014).

O surfactante presente nas formulações comerciais de Glifosato, por exemplo, pode causar mais danos do que o próprio princípio ativo e aumentar a toxicidade do herbicida (Giesy et al. 2000). A formulação com a qual trabalhamos (Roundup Original DI) difere daquela utilizada por Katzenberger et al. (2014) (Roundup Power Max), o que pode explicar diferenças entre nossos resultados. Além disso, embora as espécies pertençam à mesma família (Hylidae), elas são de subfamílias e gêneros diferentes, o que também pode explicar diferenças que encontramos no efeito do Roundup no CTMax das larvas. Como tivemos um N baixo para cada tratamento (N=9), mais testes são necessários, com um N maior, e até mesmo com outras ferramentas para investigar o que ocorre fisiologicamente para causar a maior tolerância. Uma hipótese seria que a exposição ao Roundup induz a secreção de proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins – Hsp) e por isso a CTMax é alcançada em temperaturas mais altas nos indivíduos expostos a algum tipo de contaminante (Chen et al. 2018, Wang et al. 2019, Melo et al. 2020).

Parece existir um efeito aditivo muito forte entre a temperatura constante mais alta e a exposição subletal ao Roundup na sobrevivência das larvas de *Boana faber*, mas isso precisa ser melhor explorado com mais experimentos. Observamos que a sobrevivência das larvas reduziu bruscamente no tratamento que combina o efeito da temperatura e do Roundup, sendo muito superior à mortalidade registrada para as larvas expostas aos fatores isoladamente. A temperatura que utilizamos representa um aumento alto e constante, que dificilmente será encontrado em ambientes naturais no futuro, principalmente na região Tropical. As mudanças ambientais esperadas com as alterações climáticas incluem eventos extremos de temperatura com picos de aquecimento mais frequentes e aumentos nas ondas de calor (Schar et al. 2004). No entanto, não existe consenso ainda se, em geral, as médias térmicas se manterão em níveis mais altos do que os relatados hoje, durante as próximas décadas. Portanto, o estresse térmico que simulamos pode não ser uma representação realista do que acontecerá em ambiente natural.

Além disso, como observado por (Katzenberger 2014) a temperatura ótima (32.12°C) para *Boana faber* está muito próxima do estresse térmico ao qual submetemos os girinos (32°C), o que pode explicar o efeito agudo extremo da temperatura na sobrevivência. Para os girinos, é muito custoso estar sob temperaturas muito próximas a sua temperatura ótima, porque um pico de aquecimento pode aproximar os indivíduos do seu CTMax e acarretar em custos para a sua persistência (Deutsch et al. 2008). A alta taxa de mortalidade no experimento que combina o efeito do Roundup e do estresse térmico também pode estar relacionada à diminuição na quantidade de oxigênio causada pelo aumento da temperatura da água (Freitas e Almeida 2016). Girinos expostos a temperaturas mais altas podem sofrer maior estresse oxidativo como consequência do aumento no metabolismo e na maior demanda por oxigênio (Margarido et al. 2013, Freitas e Almeida 2016).

Conclusão

Nossos achados sugerem que o Roundup tanto em doses letais quanto subletais pode afetar a sobrevivência das larvas de *Boana faber*. Também parece haver um efeito aditivo entre o Roundup e o aumento da temperatura na sobrevivência das larvas, no entanto, precisamos explorar melhor esse ponto para determinação de um padrão, revelando ser uma questão promissora a ser investigada no futuro. Observamos efeitos da exposição crônica ao herbicida na morfologia dos girinos, resultando em redução no tamanho corporal e diferenças na forma das larvas. Embora não tenhamos recuperado nenhum efeito direto da exposição ao herbicida no CTMax, observamos uma tendência de aumento do CTMax para girinos expostos ao Roundup, o que precisa ser melhor explorado com uma ampliação do N. A compreensão de como alterações antrópicas no ambiente afetam a persistência dos anuros é fundamental para o manejo e conservação das espécies e pode ser considerado um passo inicial para a formulação de legislações que regulam o uso de herbicidas no entorno de unidades de conservação.

Referências

- Bolis, A. et al. 2020. Exposure during embryonic development to Roundup® Power 2.0 affects lateralization, level of activity and growth, but not defensive behaviour of marsh frog tadpoles. - Environ. Pollut. 263: 114395.
- Bridges, C. M. 1999. Effects of a Pesticide on Tadpole Activity and Predator Avoidance Behavior. - J. Herpetol. 33: 303–306.
- Broomhall, S. 2002. The effects of endosulfan and variable water temperature on survivorship and subsequent vulnerability to predation in *Litoria citropa* tadpoles. - Aquat. Toxicol. 61: 243–250.
- Chen, B. et al. 2018. Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses

- to environmental stress. - *Mol. Ecol.* 27: 3040–3054.
- Costa, R. N. e Nomura, F. 2016. Measuring the impacts of Roundup Original® on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. - *Hydrobiologia* 765: 85–96.
- Denoël, M. et al. 2013. Effects of a sublethal pesticide exposure on locomotor behavior: A video-tracking analysis in larval amphibians. - *Chemosphere* 90: 945–951.
- Deutsch, C. A. et al. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 6668–6672.
- Egea-Serrano, A. et al. 2012. Understanding of the impact of chemicals on amphibians: A meta-analytic review. - *Ecol. Evol.* 2: 1382–1397.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge, England: Cambridge University Press. 356p.
- Freitas, J. S. e Almeida, E. A. 2016. Antioxidant defense system of tadpoles (*Eupemphix nattereri*) exposed to changes in temperature and pH. - *Zoolog. Sci.* 33: 186–194.
- Ghalambor, C. K. et al. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. - *Funct. Ecol.* 21: 394–407.
- Giesy, J. P. et al. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. - *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167: 35–120.
- Gomez-Mestre, I. et al. 2013. Mechanisms and consequences of developmental acceleration in tadpoles responding to pond drying. - *PLoS One* 8: 1–12.
- Gutiérrez-Pesquera, L. M. et al. 2016. Testing the climate variability hypothesis in thermal tolerance limits of tropical and temperate tadpoles. - *J. Biogeogr.* 43: 1166–1178.
- Hallman, T. A. e Brooks, M. L. 2015. Metal-mediated climate susceptibility in a warming

- world: Larval and latent effects on a model amphibian. - *Environ. Toxicol. Chem.* 35: 1872–1882.
- Hayes, T. B. et al. 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 4612–4617.
- Hooper, M. J. et al. 2013. Interactions between chemical and climate stressors: A role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks. - *Environ. Toxicol. Chem.* 32: 32–48.
- Jones, D. K. et al. 2010. Roundup® and amphibians: The importance of concentration, application time, and stratification. - *Environ. Toxicol. Chem.* 29: 2016–2025.
- Katzenberger, M. 2014. Impact of Global Warming in Holarctic and Neotropical communities of amphibians Marco Jacinto Katzenberger Baptista Novo.
- Katzenberger, M. et al. 2014. Swimming with predators and pesticides: How environmental stressors affect the thermal physiology of tadpoles. - *PLoS One* 9: 1–11.
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. - *Mol. Ecol. Resour.* 11: 353–357.
- Lajmanovich, R. C. et al. 2013. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. - *Water. Air. Soil Pollut.* in press.
- Laudet, V. 2011. The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. - *Curr. Biol.* 21: R726–R737.
- Lips, K. R. et al. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change

- in amphibian declines. - PLoS Biol. 6: 0441–0454.
- Lutterschmidt, W. I. e Hutchison, V. H. 1997. The critical thermal maximum: History and critique. - Can. J. Zool. 75: 1561–1574.
- Mann, R. M. et al. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. - Environ. Pollut. 157: 2903–2927.
- Martins, M. e Haddad, C. F. B. 1988. Vocalizations and reproductive behaviour in the smith frog, *Hyla faber* Wied (Amphibia: Hylidae). - Amphib. Reptil. 9: 49–60.
- Mays, H. L. et al. 2006. Sexual dimorphism and dichromatism in Steere's *Liocichla* (*Liocichla steerii*). - J. F. Ornithol. 77: 437–443.
- McDiarmid, R. W. e Altig, R. 1999. Tadpoles: the biology of anuran larvae.
- Melo, M. S. et al. 2020. Modulation of antioxidant gene expressions by Roundup® exposure in the decapod *Macrobrachium potiuna*. - Ecotoxicol. Environ. Saf. 190: 110086.
- Møller, A. P. 1997. Developmental Stability and Fitness : A Review. - Am. Nat. 149: 916–932.
- Monteiro, L. R., e Reis, S. F. D. 1999. Princípios de morfometria geométrica. In Princípios de morfometria geométrica (189-189).
- Patra, R. W. et al. 2007. The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes. - Environ. Toxicol. Chem. 26: 1454–1459.
- Perkins, P. J. et al. 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*. - Environ. Toxicol. Chem. 19: 940–945.
- Phillimore, A. B. et al. 2010. Differences in spawning date between populations of common frog reveal local adaptation. - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107: 8292–8297.

- Pigliucci, M. 2002. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture.
- Pörtner, H. O. e Farrell, A. P. 2008. Physiology and Climate Change. - *Science* (80-.). 322: 690–692.
- R Development Core Team, 2021. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: www.r-project.org.
- Rand, GM (Ed.). 1995. Fundamentos de toxicología acuática: efectos, destino ambiental y evaluación de riesgos
- Relyea, R. A. 2005. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. - *Ecol. Appl.* 15: 1118–1124.
- Relyea, R. A. 2012. New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; Herbicides induce antipredator morphology. - *Ecol. Appl.* 22: 634–647.
- Rohr, J. R. e Palmer, B. D. 2012. Climate change, multiple stressors, and the decline of ectotherms. - *Conserv. Biol.* 27: 741–751.
- Rohr, J. R. et al. 2011. Will climate change reduce the effects of a pesticide on amphibians?: Partitioning effects on exposure and susceptibility to contaminants. - *Glob. Chang. Biol.* 17: 657–666.
- Rohlf J.F. 2008. TpsDig2. State University of New York, Stony Brook, NY.
- Rohlf J.F. 2009. TpsUtil. State University of New York, Stony Brook, NY.
- Schar, C. et al. 2004. The role of increasing temperature variability in European summer heat waves. - *Nature* 427: 3926–3928.
- Simioni, F., da Silva, D. F. N., e Mott, T. 2013. Toxicity of glyphosate on *Physalaemus*

- albonotatus (Steindachner, 1864) from Western Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8: 55-58
- Stefani Margarido, T. C. et al. 2013. Biochemical biomarkers in *Scinax fuscovarius* tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. - *Mar. Environ. Res.* 91: 61–67.
- Stuart, S. N. et al. 2004. Status and trends of amphibian Declines and Extinctions Worldwide. - *Science* (80-.). 306: 1783–1786.
- Tata, J. R. 2008. Getting hooked on thyroid hormone action: A semi-autobiographical account. - *J. Biosci.* 33: 653–667.
- Taylor, E. N. et al. 2020. The thermal ecology and physiology of reptiles and amphibians: A user’s guide. - *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Integr. Physiol.* 335: 13–44.
- Wake, D. B. e Vredenburg, V. T. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2: 27–44.
- Wang, X. et al. 2019. Metabolic switch in energy metabolism mediates the sublethal effects induced by glyphosate-based herbicide on tadpoles of a farmland frog *Microhyla fissipes*. - *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 186: 109794.

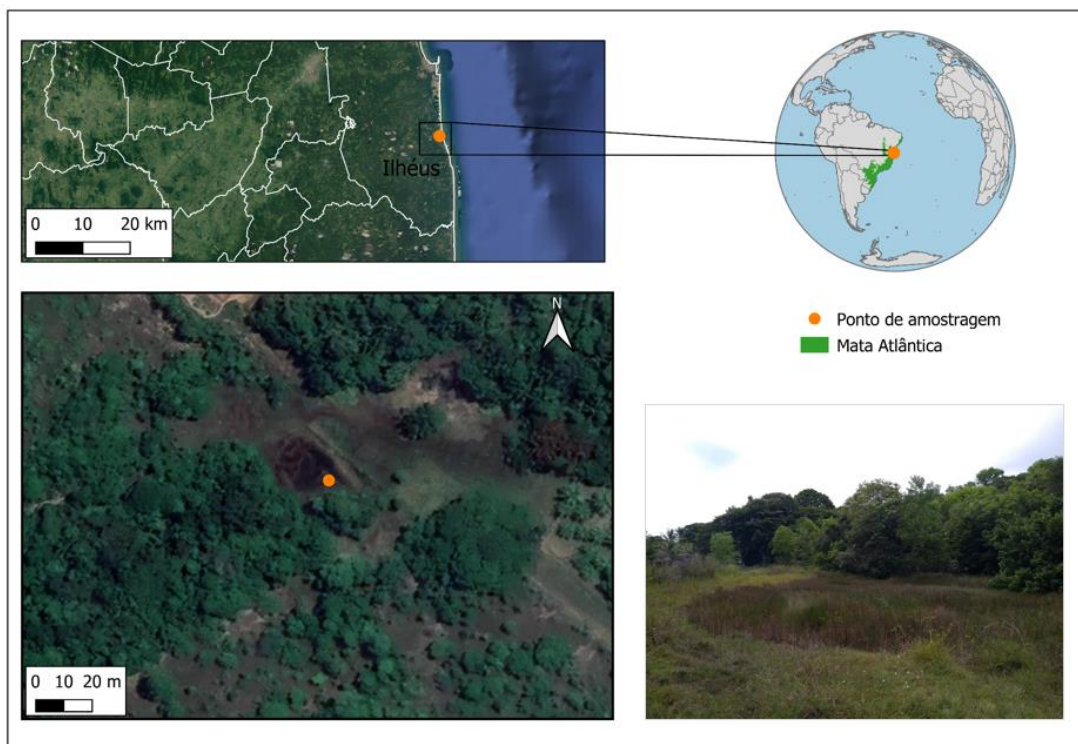


Figura 1. Mapa da região de coleta da população de *Boana faber* utilizada neste estudo.

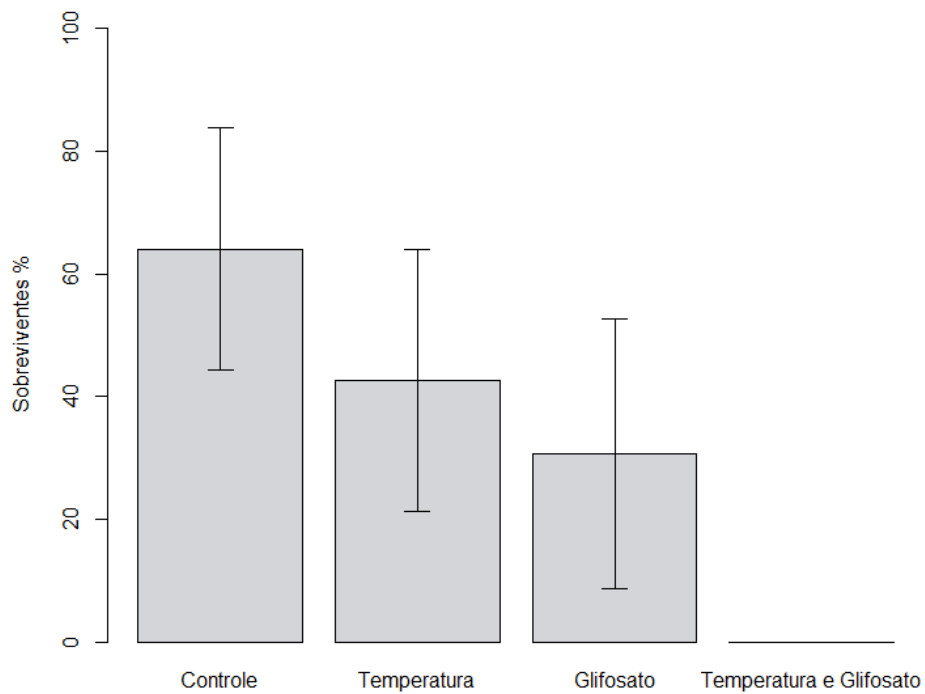


Figura 2. Porcentagem de girinos sobreviventes a exposição ao herbicida Roundup (5.58 mg a.i./L) e a temperatura constantes mais altas (32° C) durante 14 dias. Nenhum girino do tratamento com temperatura e glifosato sobreviveu ao final do experimento.

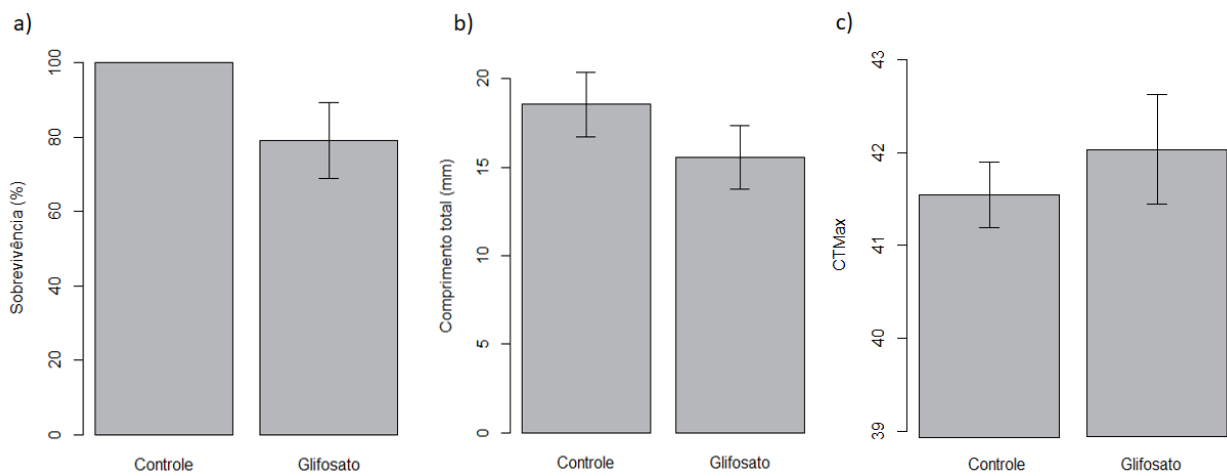


Figura 3. Sobrevivência (a), tamanho corporal (b) e (c) CTMax de girinos expostos ao Roundup (5.58 mg a.i./L) durante 10 dias. O gráfico apresenta média e desvio padrão.

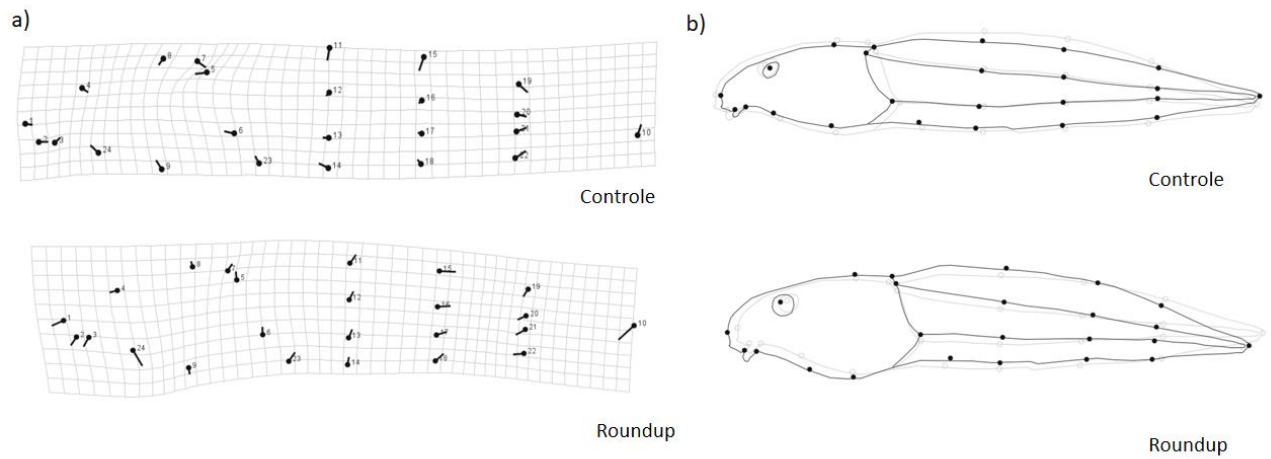


Figura 4. Grades de transformação com landmarks e semilandmarks (pontos pretos) e vetores mostrando a direção da variação; b) comparação de desenhos da forma para cada tratamento. As linhas cinzas representam a forma do consenso de Procrustes dos girinos expostos ao controle e ao glifosato.

Tabelas

Variável	t	Teste estatístico	Gl	p-valor
CTMax	-2.14	Teste T	13.03	0.05
Comprimento total	5.89	Teste T	47.98	< 0.0001
Survival	20.00	Mann-Whitney-Wilcoxon		0.01

Tabela 1. Resultados do teste utilizado para inferir o efeito de doses subletais do Roundup na sobrevivência, crescimento e tolerância térmica de larvas de *Boana faber*. Gl- graus de liberdade.

Tempo de exposição	Estressores	Gl	Soma Sq	Média Sq	F	P
14 dias de exposição	Temperatura	1	5.34	5.34	48.38	< 0.001
	Glifosato	1	1.37	1.37	12.43	< 0.001
	Temperatura: glifosato	1	0.85	0.85	7.72	0.01
	Resíduos	16	1.77	0.11		

Tabela 2. Resultados da ANOVA sobre a influência da exposição ao Roundup e do aumento da temperatura sobre a sobrevivência de larvas de *Boana faber*, considerando também a interação dessas variáveis de forma combinada. Valores em destaque representam resultados para os quais $p < 0.01$. G.l. - graus de liberdade.

CONCLUSÃO GERAL

A temperatura dita o ritmo de diversos processos bioquímicos e fisiológicos das larvas de anuros, sendo um dos principais responsáveis por determinar taxas de desenvolvimento e crescimento, embora outros estressores como presença de poluentes na água sejam claramente importantes. Os resultados obtidos no capítulo 1 confirmam o padrão já conhecido da Temperature size-rule sob organismos aquáticos, demonstrando que girinos e embriões que se desenvolvem em temperaturas relativamente mais altas atingem a metamorfose e a eclosão mais cedo. Também observamos que espécies tropicais podem ter sua sobrevivência e desenvolvimento mais afetados pelas mudanças climáticas do que espécies temperadas, confirmando as descobertas encontradas em trabalhos anteriores, que prevêem maior vulnerabilidade às alterações climáticas para espécies de latitudes mais baixas. Contudo, como poucos estudos foram realizados na região tropical e relativamente poucas espécies foram estudadas, ainda precisamos explorar melhor o efeito da temperatura, considerando espécies de ambientes montanhosos, savanas e vegetação xeromórfica, para que tenhamos evidências concretas que permitam delinear com maior confiabilidade padrões gerais do estresse térmico.

Os resultados do capítulo 1 também mostram que parece existir alto potencial adaptativo para girinos expostos ao estresse térmico para quase todos os traços avaliados, visto que o crescimento, tempo de desenvolvimento e a taxa de crescimento apresentam alta labilidade. No entanto, uma questão chave é compreender se o tempo necessário para evolução dos traços é rápido o bastante para que a espécie persista as mudanças climáticas. Para o crescimento, por exemplo, observamos que o tempo necessário para que a evolução dos atributos ocorra é extenso, de aproximadamente 6 mil anos. Portanto, em uma escala filogenética a evolução dos atributos pode ser considerada relativamente rápida, mas considerando a escala de mudanças climáticas, as espécies poderão não conseguir se adaptar.

Os achados do capítulo 2 sugerem que o Roundup tanto em doses letais quanto subletais pode afetar a sobrevivência das larvas de *Boana faber*. Também parece haver um efeito aditivo entre o Roundup e o aumento da temperatura na sobrevivência das larvas, no entanto, mais experimentos precisam ser realizados para determinação de um padrão. Nossos resultados também demonstram que a exposição crônica ao Roundup pode reduzir o comprimento total das larvas e causar diferenças na forma dos indivíduos, como demonstrado em trabalhos anteriores. Não encontramos nenhum efeito direto da exposição ao herbicida no CTMax das larvas, embora tenhamos observado uma tendência de aumento do CTMax para girinos expostos ao herbicida. Portanto, precisamos explorar melhor essa questão com uma ampliação do N para confirmar este efeito. Somente a partir da integração adequada entre resultados experimentais, ecologia e evolução poderemos prever com mais clareza os impactos de estressores antropogênicos sobre a biodiversidade e tentar mitigar parte deles.