

Artículo original

Modulación metabólica a temperaturas crecientes: un enfoque ontogenético en la rana tropical de alta montaña *Dendropsophus molitor* (Hylidae)

Metabolic modulation under increasing temperatures: an ontogenetic approach in the high mountain tropical frog *Dendropsophus molitor* (Hylidae)

Juliana Poveda-Cantini*, Edgar Cristancho

Universidad Nacional de Colombia, Laboratorio de fisiología animal, Bogotá, Colombia

Resumen

Se ha previsto que en los ambientes tropicales de alta montaña aumentarán los extremos térmicos en los próximos años debido a los efectos del cambio climático. En este escenario, las especies endémicas de distribución limitada pueden presentar afectaciones poblacionales, principalmente debido a las altas temperaturas, por lo que resulta importante conocer las respuestas fisiológicas de estos organismos frente a tales condiciones ambientales. Por ello, en el presente estudio nos propusimos estimar el efecto de la temperatura sobre la respiración en la rana de alta montaña *Dendropsophus molitor*, determinando el consumo de oxígeno ($\dot{V}O_2$) a temperaturas crecientes (18 a 28 °C) en larvas en estadios de desarrollo de Gosner 31–40, en juveniles en estadio de Gosner 43–45 y en adultos. En las larvas se midió el $\dot{V}O_2$ mediante una sonda de oxígeno disuelto (OD), en tanto que en los juveniles y adultos se utilizó un sensor de oxígeno gaseoso dotado de una cámara cerrada. Los individuos en estadios juveniles de la metamorfosis y los adultos presentaron un aumento del $\dot{V}O_2$ en función de la temperatura, en tanto que en los estadios larvales el $\dot{V}O_2$ presentó una tendencia monótonica frente al tratamiento térmico evaluado, con un aumento de 18 a 23 °C y una disminución de 23 % entre los 23 y los 28 °C. Esto sugiere una vulnerabilidad en la función respiratoria de las larvas de esta especie frente a las temperaturas elevadas, lo que indicaría que esta es la fase del desarrollo más sensible en un escenario de calentamiento global.

Palabras clave: Calentamiento global; Consumo de oxígeno; Anfibios; Ecofisiología; Tasa metabólica estándar.

Abstract

High-mountain tropical environments are predicted to present greater thermal extremes due to climate change in the coming years. In this scenario, endemic species with limited distribution may have population impacts. Therefore, it is important to study the physiological responses of these organisms in such environmental conditions. In this context, our objective was to estimate the effect of temperature on the respiration of the high mountain frog *Dendropsophus molitor* by determining oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) at increasing temperatures (18°C to 28°C) in Gosner development stages 31–40 larvae, Gosner stage 43–45 juveniles, and adults. $\dot{V}O_2$ in larvae was measured using a dissolved oxygen (DO) probe and in juveniles and adults using a gaseous oxygen sensor in a closed chamber. Juvenile individuals and adults had a $\dot{V}O_2$ increase as a function of temperature and larval-stage individuals' $\dot{V}O_2$ presented a monotonic trend in response to the thermal treatment evaluated, with an increase from 18 to 23°C followed by a decrease of 23% from 23 to 28°C. This suggests that the respiratory function of this species' larvae is vulnerable to high temperatures, so this would be the most susceptible development phase before a global warming scenario.

Keywords: Global warming; Oxygen consumption; Amphibians; Ecophysiology; Standard metabolic rate.

Citación: Poveda-Cantini J, Cristancho E. Modulación metabólica a temperaturas crecientes: un enfoque ontogenético en la rana tropical de alta montaña *Dendropsophus molitor* (Hylidae). Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 48(188):523-536, julio-septiembre de 2024. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.2655>

Editor: Martha Patricia Ramírez

***Correspondencia:**

Poveda-Cantini Juliana;
jupovedaca@unal.edu.co

Recibido: 27 de mayo de 2024

Aceptado: 26 de julio de 2024

Publicado en línea: 12 de agosto de 2024



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

Introducción

Dendropsophus molitor es un anfibio de alta montaña endémico de la cordillera oriental de Colombia; su hábitat se ubica entre los 2.000 y los 3.600 m. y está presente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Santander y Norte de Santander (Guarnizo *et al.*, 2014). La especie tiene hábitos heliotérmicos (Valdivieso & Tamsitt, 1974; Navas, 2006) y es frecuente en cuerpos de agua lénticos y poco profundos, así como en zonas intervenidas y centros poblados. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) la cataloga como de preocupación menor (LC) (Guarnizo *et al.*, 2014).

Como la mayoría de los anfibios a nivel mundial, *D. molitor* se enfrenta a amenazas como el uso elevado de pesticidas, el cambio de uso del suelo, la fragmentación de las coberturas naturales y el calentamiento global (Pounds *et al.*, 2006; Bernal *et al.*, 2009; Triana-Velásquez *et al.*, 2013; Alves-Ferreira *et al.*, 2022), siendo este último factor especialmente preocupante dado que el aumento de la temperatura amenaza principalmente a organismos ectotermos, cuya tasa metabólica está sujeta a la temperatura ambiental (Paaijmans *et al.*, 2013). Los organismos ectotermos tropicales de alta montaña se ven particularmente afectados por el calentamiento debido a su efecto sobre la temperatura corporal, además de los retos de la altura, entre ellos, la radiación ionizante (IR y UV) y las variaciones extremas de la temperatura diaria. La confluencia de dichos factores aumenta el riesgo de que estos organismos estén expuestos a temperaturas cercanas a sus límites térmicos (Nowakowsky *et al.*, 2017), lo que dificulta el desarrollo óptimo de sus funciones e historia de vida.

En este sentido, la conservación de tetrápodos ectotermos como los anfibios es prioritaria, ya que hacen parte esencial de los ecosistemas al controlar las poblaciones de invertebrados y constituir el alimento de otros vertebrados (Galeano *et al.*, 2006). En el caso de los anfibios, el panorama no es optimista, ya que en los últimos años se ha registrado la desaparición de un gran número de especies, así como el descenso de sus poblaciones a nivel mundial (Galeano *et al.*, 2006; Whitfield *et al.*, 2007; Catenazzi *et al.*, 2014; Nowakowsky *et al.*, 2017).

En este contexto deben emplearse herramientas de predicción y prevención para conocer el impacto de diversas variables ambientales en los organismos y poblaciones de interés y adoptar decisiones anticipadas para su conservación. La mayoría de modelos utilizados para calcular la tasa de desaparición de una especie se basan en la tendencia de las temperaturas de los ecosistemas y en la tasa de deforestación o de cambio de uso de la tierra (Agudelo *et al.*, 2019; Nowakowski *et al.*, 2017). El realismo de los escenarios de cambio de la composición de las especies propias de ambientes sujetos a crecientes factores de estrés aumenta a medida que se agregan a los modelos datos de ajustes fisiológicos individuales, procesos adaptativos a nivel de poblaciones y, en general, datos sobre su funcionamiento, por ejemplo, el rendimiento metabólico de los organismos en diferentes escenarios.

El rendimiento metabólico es una variable que se evalúa frecuentemente mediante el consumo de oxígeno ($\dot{V}O_2$) (Rowe & Crandall, 2018), ya que la función de la respiración es suplir los requerimientos de oxígeno y eliminar el dióxido de carbono (CO_2), ajustándose a los requerimientos del organismo en ambientes de diferentes características (Shelton *et al.*, 1986). El metabolismo también puede evaluarse con otros métodos, como la actividad de enzimas (Storey, 2002), el nivel de sustratos energéticos utilizados en la respiración (Jørgensen, 1988), la emisión de CO_2 (Donohoe *et al.*, 1998) y la calorimetría directa o indirecta (Lighton, 2008). El $\dot{V}O_2$ se ha empleado como medida de la tasa metabólica en adultos de *Rana pipiens*, *Xenopus laevis* y *Rhinella marina* (Hillman, 1976; de Andrade & Abe, 1997). Los estudios en estadios larvales son escasos, conocemos únicamente los aportes de Colmenares *et al.* (1980) y Rowe & Randall (2018) en las larvas de anfibios comunes en la región del Atlántico medio de Norteamérica.

Dado que los estudios predictivos en especies tropicales de alta montaña en general no se han apoyado en la respuesta fisiológica de las especies frente al calentamiento global, el alcance de los modelos específicos para ellas podría mejorarse mediante la inclusión

de información sobre las funciones afectables por la temperatura, como la búsqueda de alimento, la digestión, la función cardíaca y el desarrollo. Debido al heterogéneo efecto de la temperatura sobre el metabolismo, resulta conveniente diferenciar entre la tasa metabólica basal (TMB) y la tasa metabólica estándar (TME). Ambas cuantifican el metabolismo en reposo de un organismo, pero la TMB se aplica al metabolismo de los endotermos, en tanto que la TME se usa para los ectotermos. En el presente estudio utilizamos la TME para determinar el metabolismo aeróbico mediante el consumo de oxígeno en fases larvales, juveniles y adultas de *D. molitor* bajo condiciones térmicas superiores a las habituales en su hábitat.

Materiales y métodos

Ejemplares

En enero del 2018 se capturaron ocho ejemplares (2 hembras y 6 machos) de *D. molitor* en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, con el objeto de generar descendencia. Los animales fueron transferidos a un terrario (0,10 m³) con especies vegetales y humedad adecuada, el cual se dejó a la intemperie para no alterar la intensidad de la luz ni el fotoperiodo. Las temperaturas diarias mínimas y máximas del terrario en los meses del estudio fueron 2,5 y 23,4 °C, respectivamente. Los ejemplares se reprodujeron entre los meses de mayo y noviembre de 2018 y fueron alimentados cada tercer día con insectos capturados en su ambiente natural. Después de cada postura y del desarrollo de los huevos a larvas de estadio 22 aproximadamente (Gosner, 1960), 12 individuos se transfirieron a un acuario (0,16 m³) en el laboratorio donde se les alimentaba cada tercer día con alimento comercial para peces de marca Aquarela (composición: harina de pescado, hígado animal, aceite de pescado, germen de trigo, levadura, vitaminas A, D y E, riboflavina, niacina, óxido de manganeso, óxido de hierro, óxido de cobre, óxido de zinc, yoduro de potasio, carbonato de calcio y lisina). El agua del acuario se cambiaba cada tercer día por agua libre de cloro, permaneciendo a temperatura ambiente (18° C) durante el tiempo de experimentación.

Determinación del consumo de oxígeno ($\dot{V}O_2$).

El consumo de oxígeno se midió en tres estadios diferentes de desarrollo según la escala de Gosner (1960): larvas (estadios 31-40), individuos juveniles (estadios 43-45) y adultos y en cinco temperaturas diferentes (18, 20, 23, 25 y 28 °C), controladas en baño de agua termostático, cuya lectura se verificó con un termómetro de mercurio (Brixco, Colombia, precisión de $\pm 1,0^\circ$ C). En las larvas el $\dot{V}O_2$ se determinó mediante el cambio del oxígeno disuelto en el agua (OD), en tanto que en los juveniles y adultos se hizo mediante el cambio porcentual en el oxígeno atmosférico, utilizando en ambos casos sensores de O₂ (Vernier®, Reid Suply, USA) en un sistema cerrado. Los juveniles y adultos (estadios de respiración aérea) se envolvieron en gasa húmeda para evitar su movimiento y que interfirieran en los datos del sensor. Para asegurar el estado de calma de los animales, la cámara de medición fue cubierta con papel de aluminio (Figura 1). Las mediciones se hicieron en animales en ayuno y bajo observación constante para registrar señales de incomodidad (movimientos bruscos, giros constantes y, en el caso de las larvas, buscar la superficie).

Determinación del $\dot{V}O_2$ en larvas

El $\dot{V}O_2$ se midió en 12 larvas utilizando una sonda de oxígeno disuelto (Vernier® Go Direct, modelo VER- GDX-O₂, Reid Suply, USA). Cada individuo se transfirió desde el acuario a una cámara de medición de 50 ml de agua. Para evitar el equilibrio de la presión parcial de oxígeno entre el agua y el aire atmosférico, se vertió glicerina sobre la superficie del agua hasta formar una película de 3 mm después de meter a cada individuo en la cámara de medición, para posteriormente introducir la sonda. Debido a la incomodidad mostrada por los animales, posiblemente debido a la temperatura del agua, el cambio en el OD se registró durante 20 min, dando 15 min previamente para el ajuste del animal a la cámara de medición. La duración de la medición se estableció siguiendo el protocolo de

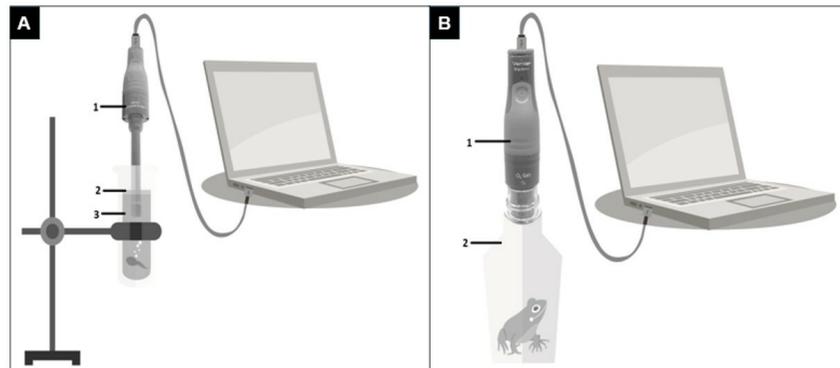


Figura 1. Montajes para la medición de $\dot{V}O_2$: **A.** Montaje para larvas, en donde 1 es el sensor de oxígeno disuelto, 2 señala la película de glicerina y 3 el medio acuoso de volumen conocido. **B.** Montaje para juveniles y adultos, en donde 1 señala el sensor de oxígeno gaseoso y 2 el medio aéreo de volumen conocido

Mueller & Semyour (2011) utilizado en huevos y larvas de *Pseudophryne bibronii*. Ya que los adultos no mostraron este comportamiento, el tiempo de registro se fijó en 30 min. Antes de cada medición los individuos fueron pesados en balanza analítica (Adventurer Ohaus, Estados Unidos). El $\dot{V}O_2$ se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\dot{V}O_2 = \left[\frac{\left(\frac{O_{2i} - O_{2f}}{\rho O_2} \right) V}{\frac{t}{w}} \right],$$

donde O_{2i} y O_{2f} corresponden, respectivamente, a la concentración inicial y final de oxígeno en la cámara de medición; ρO_2 a la densidad del oxígeno en el agua ($1,43g \cdot mL^{-1}$); V al volumen del medio (mL); t al tiempo de medición (min), y w a la masa del animal (g).

Determinación del $\dot{V}O_2$ en adultos y juveniles

El $\dot{V}O_2$ en juveniles y adultos (7 y 8 individuos, respectivamente) se midió determinando el cambio en la concentración del oxígeno con un sensor de oxígeno gaseoso Vernier Go Direct (Canadá). Los animales se introdujeron en un recipiente con capacidad de 50 mL para juveniles y 250 mL para adultos. La medición se prolongó por 30 min; se registró la concentración de oxígeno en la cámara cada 10 min dando 15 min previos para el ajuste del animal a la cámara. Antes de cada medición los individuos fueron pesados en balanza analítica (Adventurer Ohaus, Estados Unidos). El consumo de oxígeno se calculó utilizando la siguiente ecuación, cuyos resultados se expresaron en mL de $O_2 \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$:

$$\dot{V}O_2 = \left(\frac{\left(\frac{O_{2i} - O_{2f}}{t} \right) V}{w} \right).$$

Las cantidades y unidades fueron las mismas de la ecuación utilizada para la determinación de $\dot{V}O_2$ en larvas. La señal originada en los sensores se registró con una tasa de muestreo de 0,033 Hz y posteriormente se transfirió al computador usando el *software* del fabricante (Vernier Graphical Analysis®).

Coefficiente de temperatura Q_5

El coeficiente de temperatura (Q_5), se calculó con intervalos de 5° C para todos los estadios utilizando la ecuación de Van't Hoff:

$$Q_5 = \left(\frac{[\dot{V}O_2]_2}{[\dot{V}O_2]_1} \right)^{\frac{5}{T_2 - T_1}}$$

donde $[\dot{V}O_2]_1$ y $[\dot{V}O_2]_2$ denotan el consumo de oxígeno del individuo a las temperaturas T_1 y T_2 , respectivamente, con una diferencia entre las dos de 5° C.

Análisis estadístico

Los valores de $\dot{V}O_2$ corregidos por masa corporal y por estadio y temperatura se reportan como promedio y desviación estándar. La normalidad y la homocedasticidad de los datos obtenidos se comprobaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y el test de Bartlett, respectivamente. El consumo de oxígeno de un mismo estadio a diferentes temperaturas se comparó mediante un análisis de varianza de las medidas repetidas o test de Friedman para valores paramétricos o no paramétricos según el caso. Las diferencias en el consumo de oxígeno de los distintos estadios a igual temperatura se compararon mediante un análisis de varianza de una vía para datos paramétricos y mediante la utilización de un modelo de regresión lineal y pruebas pareadas de t Student para los datos no paramétricos. Las comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey o de Wilcoxon se hicieron para muestras pareadas según fuera necesario. La hipótesis nula fue rechazada con un nivel de significación de 0,05. En el análisis se utilizaron los programas R y Past 3.19.

Aspectos éticos

El grupo de investigación no posee permiso de captura, pero el estudio recibió aval del comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta 10-2018), ya que en el estudio no se utilizaron partes ni tejidos de los animales y tampoco se requirieron moléculas en la ruta del dogma de la genética. Además, los individuos fueron liberados en su hábitat natural después del estudio (medio urbano adyacente al laboratorio donde este se realizó).

Resultados

Los tamaños y pesos de los individuos en sus diferentes etapas de desarrollo se resumen en la **tabla 1**, este último expresado en promedios, rangos y desviación estándar del peso.

Consumo de oxígeno en larvas

El consumo promedio de los individuos larvales en las distintas temperaturas se presenta en la **figura 2A**. Se puede observar que en el rango de 18 a 23 °C el $\dot{V}O_2$ aumentó de 0,0025 mL·min⁻¹·g⁻¹ a 0,0035 mL·min⁻¹·g⁻¹, pero a partir de los 23 °C disminuyó a 0,0027 mL·min⁻¹·g⁻¹. Las diferencias en el consumo de oxígeno entre los 18 y los 23 °C, así como entre los 23 y los 25 °C fueron significativas según la prueba de Friedman ($p < 0,05$); el coeficiente de temperatura (Q_5) para este estadio fue positivo en el rango de 18 a 23 °C,

Tabla 1. Rango de peso, promedio y desviación estándar en diferentes estadios de desarrollo de *D. molitor*

Estadio	Rango (g)	Promedio ± SD (g)
Larvas	0,71 - 2,00	1,27 ± 0,34
Juveniles	0,87 - 2,32	1,61 ± 0,51
Adultos	2,65 - 9,55	4,65 ± 2,45

evidenciando un aumento de 1,35 veces (40 %) con un incremento de la temperatura de 5 °C, en tanto que a partir de los 23 °C, el valor de Q_{10} se hizo negativo, lo que implicó una disminución del $\dot{V}O_2$ en 0,80 veces (23 %) con el mismo cambio de temperatura.

Consumo de oxígeno en juveniles

El $\dot{V}O_2$ en los juveniles aumentó en función de la temperatura sin diferencias estadísticas con respecto a la temperatura ambiente (**Figura 2B**). El coeficiente de la temperatura tuvo un aumento similar en los rangos de 18 a 23 °C y 23 a 28 °C, aumentando éste entre 1,25 y 1,34 veces cada 5 °C.

Consumo de oxígeno en adultos

Al igual que en los juveniles, el aumento en consumo de $\dot{V}O_2$ en los adultos ocurrió al aumentar la temperatura, aunque, en general, el valor promedio de $\dot{V}O_2$ en este estadio fue menor en 21,7 % al de los juveniles (**Figura 2C**). El metabolismo incrementó de forma significativa ($p=0,002$, Anova) solo cuando la temperatura del ensayo aumentó a 28 °C. Los

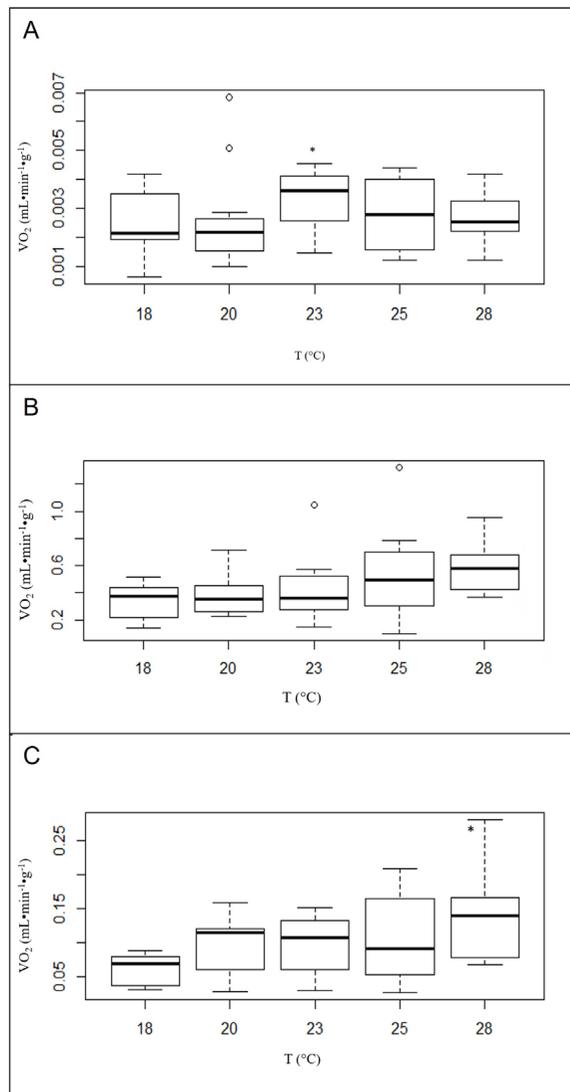


Figura 2. Valor promedio ± desviación estándar de $\dot{V}O_2$ en (A) larvas, (B) juveniles y (C) adultos de *D. molitor* con temperatura creciente. * Indica diferencias estadísticas con $p<0,05$ con respecto a las demás temperaturas en (A) y a 18 °C en (C)

datos presentaron una alta dispersión, posiblemente por el reducido número de individuos evaluados. El coeficiente de la temperatura calculado indica que el metabolismo aumentó entre 1,40 y 1,58 veces cada 5 °C, lo que indica un aumento similar al registrado en los estadios larvales y juveniles.

Comparación del $\dot{V}O_2$ entre estadios

Los resultados de la aplicación de las pruebas estadísticas se asumieron como acertados, a pesar de que no se cumplieron los supuestos necesarios, ya que los valores de p obtenidos fueron muy bajos (entre $1,226 \times 10^{-5}$ y $2,107 \times 10^{-5}$), con lo cual la posibilidad de incurrir en un error de tipo I era mínima.

En la **figura 3** se muestra el $\dot{V}O_2$ de los individuos en los diferentes estadios de desarrollo con cada una de las temperaturas evaluadas. Se observa que en todas las temperaturas se repitió el mismo patrón, es decir, los individuos juveniles presentaron un metabolismo aeróbico significativamente más alto que el de las larvas y los adultos, siendo el $\dot{V}O_2$ de estos dos últimos estadios muy similar en todas las temperaturas.

Discusión

La temperatura corporal es una variable crucial de los animales ectotermos, ya que los afecta a nivel fisiológico y comportamental (Angilletta *et al.*, 2002; Paaijmans *et al.*, 2013; Perotti *et al.*, 2018). En general, las tasas metabólicas de estos organismos se aceleran con temperaturas ambientales altas, lo que se refleja en el metabolismo aeróbico basal, el cual puede medirse a través del $\dot{V}O_2$. El metabolismo aeróbico ha recibido gran

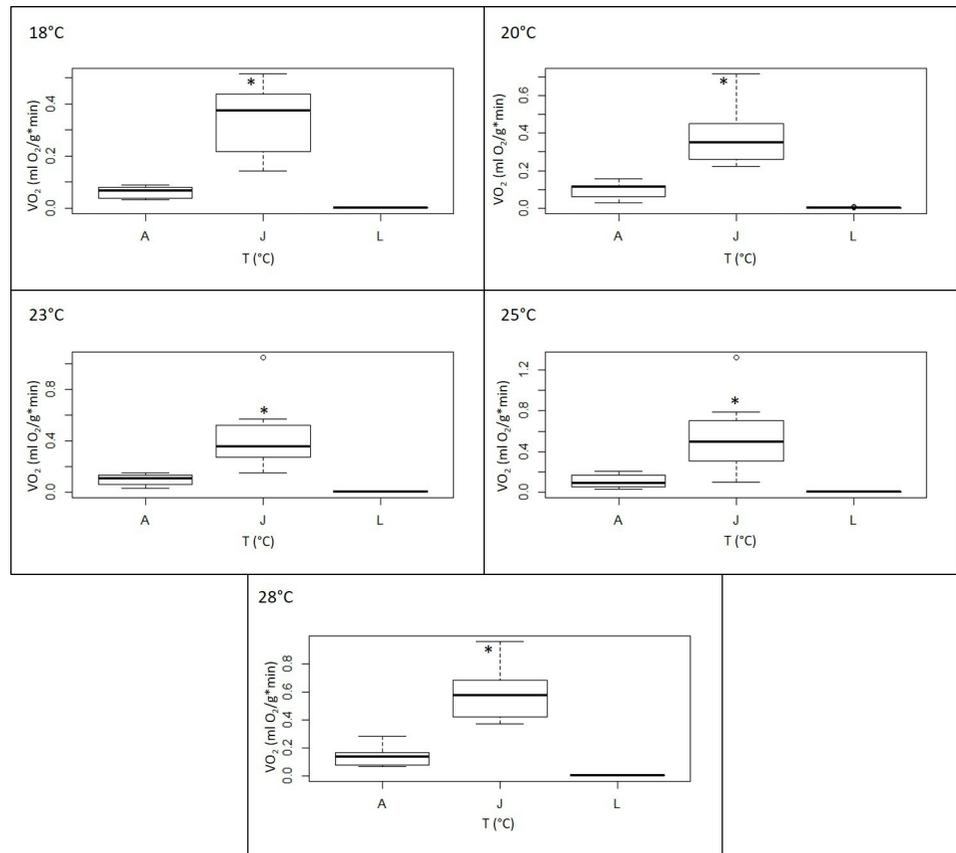


Figura 3. Promedio \pm desviación estándar del $\dot{V}O_2$ en adultos (A), juveniles (J) y larvas (L) de *D. molitor* con temperatura creciente. * Indica diferencias estadísticas con $p < 0,05$ con respecto a los demás estadios

atención en la última década porque es un rasgo clave para entender la respuesta térmica al cambio climático (Shulte, 2015). Este parámetro proporciona información directa de la cantidad de energía que un organismo requiere para llevar a cabo las funciones necesarias para su supervivencia (Blem *et al.*, 1986).

Las especies de anuros de alta montaña están adaptadas a fluctuaciones dramáticas de la temperatura en cortos periodos (Navas, 1997; Gutiérrez-Pesquera, 2015), lo que significa que pueden llevar a cabo funciones metabólicas con normalidad en un rango amplio de temperaturas. El presente estudio se enfocó en la actividad metabólica de estados larvarios en anuros tropicales de alta montaña, cubriendo así el desarrollo ontogénico mediante el análisis del $\dot{V}O_2$ como medida de referencia.

El incremento de la temperatura no produjo una tendencia marcada en el $\dot{V}O_2$ de las larvas: entre los 18 y los 20 °C el metabolismo se mantuvo cercano a niveles basales, pero se elevó al valor máximo en el marco del experimento con una temperatura de 23 °C (Figura 2A), lo cual se concuerda con lo reportado en anuros por Blem *et al.* (1986), Angilletta *et al.* (2002) y Rowe & Crandall (2018), quienes registraron el incremento del $\dot{V}O_2$ con la elevación de la temperatura dentro de los límites térmicos de las especies evaluadas. El incremento superior a 28 °C resultó en una disminución en un 20 % en la intensidad del metabolismo, lo que sugeriría que se alcanzó la temperatura máxima crítica para el $\dot{V}O_2$ de la especie en el estadio larval, valor que se refiere a la temperatura a partir de la cual las funciones aeróbicas del organismo empiezan a fallar debido al exceso de calor, que perjudica las funciones enzimáticas y, en consecuencia, ralentiza las reacciones metabólicas necesarias para el funcionamiento de los organismos (Navas, 1997; Angilletta, 2009).

Los resultados del $\dot{V}O_2$ para el estadio larval son comparables con los obtenidos por Rowe & Crandall (2018), quienes registraron entre 0,001 y 0,006 mg O₂·g⁻¹·min⁻¹ para larvas en estadio 25 de cuatro especies de anuros en un gradiente similar de temperaturas (16 - 30 °C). En este caso, el metabolismo de todas las especies aumentó en función de la temperatura, sin que se presentara su disminución; sin embargo, debe tenerse en cuenta que las especies evaluadas en nuestro estudio son propias de zonas templadas, donde las variaciones de temperatura son estacionales y mínimas en relación con las variaciones diarias de la alta montaña tropical enfrentadas por *D. molitor*.

Ya que la oxidación completa de ácidos grasos requiere mayor suplemento de oxígeno que la de carbohidratos (Hargreaves & Spriet, 2018), la elevación de la temperatura debería haber causado un incremento del $\dot{V}O_2$. La razón de que el aumento del metabolismo no sucediera es que, a pesar del amplio cambio en la temperatura diaria ambiental (aprox. 21 °C), la actividad de las enzimas de la β -oxidación en la especie podría haberse adaptado a un rango estrecho y frío. Las enzimas adaptadas al frío normalmente presentan valores elevados de la constante de Michaleis–Menten (Somero, 1995); por lo tanto, el aumento de la temperatura obstaculiza la formación del complejo enzima–sustrato, elevando la concentración necesaria para alcanzar $\frac{1}{2}V_{\max}$. Lo anterior sugiere que existe un rango térmico estrecho en la actividad de las enzimas que sostienen el metabolismo durante la metamorfosis en *D. molitor*.

La metamorfosis se asocia principalmente a modificaciones anatómicas en la transición del medio acuático al terrestre, pero también trae consigo enormes modificaciones moleculares y bioquímicas. Los estudios al respecto han demostrado ajustes adaptativos en las propiedades de la asociación Hb:O₂ de las especies al ambiente que habitan y dependientes del estado de desarrollo en el cual se encuentren. En la Hb de *Rana catesbeiana* McCutcheon (1936) estableció que el P₅₀ de la Hb larval es menor que en el adulto. Así, la Hb en los adultos es más adecuada para un animal que respira aire, es más activo y debe sostener el metabolismo muscular (Broyles, 1981). De otro lado, la hipoxia causa poco efecto en el P₅₀ de la Hb de larvas de *R. catesbeiana*, en tanto que, en adultos, este disminuye en aproximadamente 10 mm Hg (Pinder & Burggren, 1983). Meirelles *et al.* (1979) establecieron en *Pipa carvalhoi*, una especie netamente acuática, que la unión Hb:O₂ era independiente a los cambios de pH tanto en adultos como en larvas. Weber *et al.* (2002) establecieron que en comparación con *Xenopus leavis*, *Telmatobius*

peruvianus dispone de una modulación de Cl en la afinidad de la Hb por O₂. En cuanto al efecto de la temperatura en la afinidad de Hb por O₂, **Gahlenberck & Bartels** (1968) encontraron que la sangre de *Rana esculenta* aclimatada a 5,0 °C evidenció una afinidad similar a la de individuos aclimatados a 20 °C, lo cual demuestra indirectamente una baja dependencia del pH, ya que la temperatura incrementa la tasa de disociación del agua, aumentando la concentración de protones [H⁺] en la sangre. Por último, las poblaciones de *Bufo gargarizans* que habitan sobre los 3.400 m presentan un típico desplazamiento a la izquierda en la curva de disociación Hb:O₂ comparadas con las poblaciones de control (500 m), lo cual implica ajustes en la captura y liberación de O₂ dependientes de la oferta ambiental de O₂ (**Pu et al.**, 2021). El conocimiento de los moduladores de la asociación de Hb con O₂ en distintas especies, poblaciones y estados de desarrollo permite suponer que la Hb de *D. molitor* podría exhibir el mismo comportamiento registrado en larvas y adultos de *R. catesbeiana*.

La película de glicerina aplicada a la superficie del agua en el ensayo representó una barrera para la eliminación del CO₂ desde la sangre hacia el agua. Si asumimos una baja sensibilidad de la unión Hb:O₂ al pH, la acumulación de CO₂, pudo haber desplazado la curva de disociación en una magnitud reducida hacia la izquierda, con aumento de la afinidad de Hb por O₂. El aumento en la captación de O₂ no implica en forma directa una mejora en la capacidad de la proteína para entregar el oxígeno a los tejidos. Así, la disminución del P₅₀ pudo haber causado la del $\dot{V}O_2$ cuando la temperatura del medio fue superior a 23 °C (**Figura 2A**).

Rowe & Crandall (2018) encontraron que el consumo de oxígeno en *Hyla chrysoscelis* se dobla con el aumento de la temperatura ambiental en 10 °C (Q₁₀ = 2,03), el cual resulta ser moderadamente inferior al resultado obtenido al doblar el valor de Q₅ (1,35) para *D. molitor*, lo que puede obedecer a diferencias específicas de la especie y a la procedencia de los individuos utilizados en cada estudio. **Navas et al.** (2010) reportaron un desarrollo normal de la mayor parte de una muestra de renacuajos de *D. molitor* mantenida en temperaturas entre los 12 y los 30 °C, lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio. Si bien a partir de los 23 °C hay reducción del metabolismo aeróbico, las temperaturas superiores no resultan deletéreas para llevar a término el desarrollo, a pesar de la caída del $\dot{V}O_2$. Por otro lado, **Cupp** (1980) menciona que en los estadios larvales 32 y 42, *Rana temporaria* usualmente tiene una mayor tolerancia térmica que en los demás. Aunque no fue el propósito de nuestro estudio determinar la temperatura crítica máxima, el cambio de tendencia en el $\dot{V}O_2$ entre 23 y 25 °C insinúa un límite térmico para la función respiratoria.

En individuos juveniles el $\dot{V}O_2$ mostró una tendencia clara en función de la temperatura. Las temperaturas de 25 y 28 °C produjeron incrementos del 30 y el 50 %, respectivamente, en comparación con la temperatura ambiente. Aunque estos incrementos son considerables, no son estadísticamente distintos, quizás por el bajo tamaño muestral (n=7) o la gran variabilidad biológica de la función respiratoria. Las formas juveniles han abandonado el agua para respirar aire y el medio aéreo representa ventajas notables frente al agua para la respiración: el contenido de oxígeno es mayor, el esfuerzo ventilatorio es menor y la disipación de calor evaporativo es más favorable, lo cual se refleja en un aumento continuo del $\dot{V}O_2$ a partir de los 23 °C sin que disminuya con temperaturas superiores (**Figura 2B**). En el estadio juvenil el $\dot{V}O_2$ presentó variación entre los 0,3 y 0,6 mL O₂•g⁻¹•min⁻¹ en todas las temperaturas, lo cual representa, en todos los casos, un valor significativamente mayor a de los estadios larvales y adultos (**Figura 3**). A partir del estadio 40 de desarrollo se producen los cambios más dramáticos en la metamorfosis, como la reabsorción de la cola y las branquias, la formación de extremidades y pulmones y la remodelación de órganos como el intestino y el cerebro (**Brown & Cai**, 2007). Estos cambios suponen elevar la intensidad del metabolismo, lo que se logra aumentando el suministro de oxígeno evidenciado en el incremento del $\dot{V}O_2$ (**Figura 3**).

Son escasos los estudios que miden el $\dot{V}O_2$ en individuos juveniles (estadios 43–45), y la mayoría de las investigaciones se concentran en la etapa adulta de los anfibios o en estadios larvales más tempranos (alrededor del estadio 25) (**Rowe & Randall**, 2018;

Perotti et al., 2018). Por esta razón el conocimiento de la relación del metabolismo con la temperatura ha sido escaso y nuestros datos deben contrastarse con los de otras especies para establecer si la tendencia obtenida es típica para la especie o existen variaciones en el parámetro. Dada la gran variedad de estrategias reproductivas y de nichos ocupados por los anfibios, es posible suponer que la sensibilidad a la temperatura depende bastante de estos aspectos y que una misma temperatura genera diferentes respuestas en diferentes estadios (**Figura 3**).

Las mediciones de $\dot{V}O_2$ permitirían establecer que, aparentemente, este estadio no muestra vulnerabilidad aeróbica frente a la temperatura y que este aspecto no se vería alterado con el calentamiento global. Las larvas, sin embargo, tienen una tendencia a la disminución del metabolismo aeróbico en temperaturas superiores a los 23 °C. En un sistema de recursos limitados, esto podría reducir el crecimiento y disminuir la energía disponible para funciones vitales para la especie como la defensa contra patógenos (**Rowe & Crandall**, 2018), afectando la aptitud física de la especie.

En los adultos se observó un aumento del $\dot{V}O_2$ entre 1,40 y 1,58 veces con un incremento de 5 °C en la temperatura, lo que supone un aumento del metabolismo. En este estadio el $\dot{V}O_2$ cambió de 0,061 a 0,13 mL O₂•g⁻¹•min⁻¹ en el rango de temperatura registrado, lo que representa una diferencia estadísticamente significativa del $\dot{V}O_2$ con respecto a los juveniles más no a los renacuajos (**Figura 3**).

Otros estudios han medido el consumo de oxígeno en función de la temperatura en individuos de otras familias, géneros y especies de anuros. Así, **Hillman** (1976) reporta que a los 25 °C el $\dot{V}O_2$ de *X. laevis*, *R. pipiens*, *Anaxirus cognatus* y *Scaphiopus couchii* estuvo entre los 0,54 y 1,91 mL O₂•g⁻¹•h⁻¹ (0,009 mL O₂•g⁻¹•min⁻¹ y 0,032 mL O₂•g⁻¹•min⁻¹), lo que corresponde a un rango similar al comprobado en el presente estudio a igual temperatura. En especies de la misma familia de *D. molitor* (Hylidae), **de Andrade & Abe** (1997) reportaron que el $\dot{V}O_2$ de *Aparaphenodon brunoi* y *Corythomantis greeningi* osciló entre 47,9 y 60,3 mL O₂•kg⁻¹•h⁻¹ (0,000798 mL O₂•g⁻¹•min⁻¹ y 0,001 mL O₂•g⁻¹•min⁻¹) a temperaturas de 20 y 30 °C, respectivamente. Este resultado es notablemente menor al obtenido aquí, toda vez que las especies en cuestión son endémicas de las sabanas y bosques tropicales de tierras bajas de Brasil (altitud <500 m), donde el aporte de oxígeno en el aire atmosférico es mayor al existente a 2.600 m y el metabolismo puede tener mayor intensidad. Los valores de $\dot{V}O_2$ de *Aparaphenodon brunoi* y *Corythomantis greeningi* en este estudio fueron validados a partir de ecuaciones alométricas, más no mediante la contrastación con otras especies. La concordancia de nuestros resultados con los obtenidos por **Hillman** (1976) es indicio de la gran variabilidad del metabolismo dentro del mismo grupo de organismos debida a las fluctuaciones diarias de temperatura.

Davison (1955) encontró una relación logarítmica e inversa entre el $\dot{V}O_2$ y la masa corporal en anuros de varias familias, lo que indica que los ejemplares más pesados consumen menos oxígeno por unidad de peso y de tiempo. Los ejemplares de *D. molitor* tuvieron un peso promedio 3,7 veces menor al de sus contrapartes de tierras bajas. La regresión indica que el aumento en 3,7 veces en la masa corporal está acompañado de la disminución del 40 % en el $\dot{V}O_2$. A pesar de la corrección del metabolismo por la masa corporal, los valores de $\dot{V}O_2$ siguen siendo bastante disímiles. A pesar de que las ecuaciones de regresión realizadas por **Davison** (1955) incluyen datos de varias familias (Ranidae, Pipidae, Hylidae) con un amplio rango de masa corporal (1 a 350 g), la tendencia no necesariamente describe la relación de la masa corporal y el $\dot{V}O_2$ en *D. molitor*. A pesar de que las determinaciones de $\dot{V}O_2$ en el estudio de **de Andrade & Abe** (1997) se basan en la disminución registrada por sensor del contenido de oxígeno en un sistema cerrado, como en nuestro estudio, las diferencias en los valores no se pueden explicar a partir de las metodologías distintas sino de aspectos ambientales y ecológicos de las especies que pueden estar condicionando la expresión de los genes y productos proteicos involucrados en el metabolismo, lo cual no fue objeto de este estudio, pero que sin duda deben ser considerados en la interpretación del metabolismo aeróbico.

Los valores de $\dot{V}O_2$ en estadio adulto no evidencian que se haya alcanzado un límite de tolerancia térmica, lo cual concuerda con la determinación directa del máximo térmico crítico de 38 °C en *D. molitor* registrado por **Mahoney & Hutchison** (1969). A pesar de la tendencia del $\dot{V}O_2$ en estadios juveniles y adultos, la especie no se encuentra libre del riesgo del calentamiento global, ya que el $\dot{V}O_2$ es un proceso multifactorial, resultado de la función cardiorrespiratoria, del metabolismo muscular y de la actividad enzimática, entre otros. Por otro lado, las mediciones no incluyeron estadios de desarrollo como el de mórula o gástrula, debido a la dificultad de aislar en nuestro laboratorio los huevos de la capa gelatinosa que los envuelve y asegurar su funcionalidad. En resumen, los hallazgos del presente estudio no permiten establecer si la fragilidad de la respiración al elevarse la temperatura se manifiesta en etapas del desarrollo más tempranas que el estadio larval.

Limitaciones del estudio

El estudio se hizo en un límite de temperatura que supera el valor más alto registrado en Bogotá (24,9 °C, enero de 1995) por nuestro interés de medir la respuesta respiratoria en los límites térmicos ambientales y la tendencia al aumento en la temperatura como efectivamente sucedió (25,4 °C, enero de 2024) y porque consideramos que el estudio de variables fisiológicas aporta un criterio adicional a los modelos utilizados para predecir el tiempo de extinción de una especie con base en la tendencia de la temperatura y la deforestación. Sin embargo, los valores de temperatura podrían haber sido excesivos, de allí las señales de incomodidad de los animales durante la medición, las cuales podrían interpretarse como agotamiento del oxígeno en la cámara de medición.

Los ejemplares juveniles presentaron el valor de $\dot{V}O_2$ más elevado (aprox. 1,2 ml•g⁻¹•min⁻¹, caso aislado a 25 °C) (**Figura 3**). El volumen de la cámara de medición es de 250 ml, de los cuales el 21 %, o 52,5 ml, corresponde a O₂, lo que indica que a la tasa metabólica que se muestra en la **Figura 2B**, el O₂ se hubiera agotado completamente en 43 min. El mismo cálculo en el caso de las larvas involucra el coeficiente de solubilidad (α) del O₂ en agua (34 ml•L⁻¹) y su fracción porcentual en el aire atmosférico (0,21 %). Así, la cantidad de oxígeno disuelto por litro de agua sería 34 ml•L⁻¹ x 0,21 = 7,14 ml, y en una cámara de medición de 50 ml, sería de 0,36 ml. El valor más elevado de $\dot{V}O_2$ fue 0,007 ml•g⁻¹•min⁻¹ (caso aislado a 20 °C) (**Figura 2**), con lo que el oxígeno hubiera alcanzado para 51 min. En todos los estadios de desarrollo el tiempo de medición fue tan solo de 30 min. Si los niveles decrecientes de O₂ producen un comportamiento estereotipado, no fue posible establecerlo en nuestro estudio. Por otra parte, este comportamiento no ha sido documentado ampliamente; nuestra búsqueda bibliográfica produjo un solo resultado (**Meza-Parral et al.**, 2020). Los movimientos de incomodidad muy posiblemente fueron causados más por el cautiverio o por la temperatura que por el agotamiento del O₂. Para evitar la radiación directa y el sobrecalentamiento, los animales pueden buscar microambientes frescos de acuerdo con el estadio de desarrollo en que se encuentren. Sin embargo, las condiciones dentro de la cámara de medición pudieron haber resultado estresantes, lo que llevó a las señales de incomodidad registradas ocasionalmente.

El tamaño relativamente reducido de la muestra y el diseño estadístico sin réplicas pueden ser una debilidad del estudio, sin embargo, los valores de $\dot{V}O_2$ a temperaturas elevadas tuvieron diferencias estadísticas con aquellos registrados a temperatura ambiente, lo cual indica una clara tendencia.

Los ejemplares fueron producto del mismo cruce, es decir, tienen los mismos orígenes parentales, lo que puede suponer una variabilidad nula en la respuesta. Sin embargo, este no es el caso dada la recombinación de caracteres genéticos durante la meiosis, comprobada igualmente en anfibios (**Carroll**, 1996; **Rodríguez et al.**, 2018) y respaldada por la dispersión de los valores de $\dot{V}O_2$.

Conclusiones

El aumento de la temperatura ambiental tiene un efecto sobre el metabolismo de *D. molitor* dependiente del estadio de desarrollo. Las temperaturas superiores a los 23 °C redujeron la

tasa del metabolismo aeróbico en el estadio larval (31–40), lo que indica que es una fase particularmente vulnerable al aumento de la temperatura que también afecta los cuerpos de agua donde se desarrollan los individuos de esta especie (**Guarnizo *et al.*, 2014**). Los individuos juveniles y adultos se mostraron menos susceptibles: en los estadios juveniles (43–45) y en adultos el $\dot{V}O_2$ aumentó con la temperatura sin alcanzarse el límite de tolerancia térmica para este parámetro. A la luz de los resultados, cabe suponer que a largo plazo los efectos del calentamiento global sobre esta especie podrían incluir la disminución del reclutamiento terrestre, la reducción del crecimiento y la disminución de la energía disponible para la defensa contra patógenos ambientales contaminantes. El estudio de la temperatura sobre el metabolismo en los huevos puede establecer si la susceptibilidad térmica de la especie inicia en los estadios larvales o en fases tempranas del desarrollo como las de la mórula y la gastrulación.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por aportar el laboratorio, los equipos y los implementos necesarios para el desarrollo del estudio.

Contribución de los autores

ECM: aportes a la idea y diseño del estudio, dirección de su ejecución y colaboración con el análisis de datos, redacción del artículo y revisión de su contenido. JPC: aportes al diseño del estudio, ejecución y análisis de datos, colaboración en la redacción del artículo y revisión de su contenido.

Conflicto de intereses

Los autores no presentan conflictos de intereses.

Referencias

- Alves-Ferreira, G., Talora, D.C., Solé, M., Cervantes-López, M.J., Heming, N.M.** (2022). Unraveling global impacts of climate change on amphibians distributions: A life-history and biogeographic-based approach. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.987237>.
- Angilletta, M.** (2009). *Thermal adaptations, a theoretical and empirical synthesis*. Oxford University Press Inc.
- Angilletta, M., Nierwirowski, P., Navas, C.A.** (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*, 27(4), 249-268. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(01\)00094-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(01)00094-8)
- Bernal, M.H., Solomon, K.R., Carrasquilla, G.** (2009). Toxicity of formulated Glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval juvenile Colombian frogs 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 72, 966-973. <https://doi.org/10.1080/15287390902929717>
- Blem, C.R., Ragan C.A., Scott L.S.** (1986). The thermal physiology of two sympatric treefrogs *Hyla cinerea* and *Hyla chrysoscelis* (Anura: Hylidae). *Comparative Biochemistry & Physiology Part A*, 85A(3), 563- 570. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90447-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90447-0)
- Brattstrom, B.H.** (1963). A preliminary review of the thermal requirements of amphibians. *Ecologica*, 44(2), 238-255. <https://doi.org/10.2307/1932171>
- Brown, D.D. & Cai, L.** (2007). Amphibian metamorphosis. *Developmental Biology*, 306, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.021>
- Broyles R. H.** (1981). Changes in the Blood during Amphibian Metamorphosis. In L. I. Gilbert & E. Frieden (Eds) *Metamorphosis: A problem in developmental biology*. Springer. USA.
- Catenazzi, A., Lehr, E., Vredenburg, V.T.** (2014). Thermal physiology, disease and amphibian declines on the Eastern slopes of the Andes. *Conservation Biology*, 28(2), 509-517. <https://doi.org/10.1111/cobi.12194>.
- Costanzo, J.P., Lee R. E., Wright M.F.** (1991). Effect of cooling rate on the survival of frozen wood frogs, *Rana sylvatica*. *Journal of Comparative Physiology B*, 161, 225-229. <https://doi.org/10.1007/BF00262302>

- Cupp, P.V.** (1980). Thermal tolerance of five salientian amphibians during development at metamorphosis. *Herpetologica*, 36(3), 234-244. <http://www.jstor.org/stable/3891820>
- de Andrade, D. V. & Abe, A. S.** (1997). Evaporative water loss and oxygen uptake in two casque-headed tree frogs, *Aparasphenodon brunoii* and *Corythomantis greeningi* (Anura, Hylidae). *Comparative Biochemistry & Physiology Part A*, 118(3), 685-689. [https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(96\)00481-1](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(96)00481-1).
- Donohoe P. H., West T., Boutillier R. G.** (1998). Respiratory, metabolic, and acid-base correlates of aerobic metabolic rate reduction in overwintering frogs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274, R704-R710.
- Galeano, S.P., Urbina, J.C., Gutiérrez-C, P.D.A., Rivera-C, M., Páez, V.** (2006). Los anfibios de Colombia, diversidad y estado del conocimiento. En: M.E. Chávez y M. (Santamaría Ed). *Informe Nacional sobre el avance en el conocimiento y la información de la biodiversidad 1998-2004*. (106-118). Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt, Bogotá.
- Gahlenberck H. & Bartels H.** (1968). Temperaturadaptation der Sauerstoffaffinität des Blutes von *Rana esculenta* L. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 59, 232 -240.
- Gosner, K.L.** (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190. <http://www.jstor.org/stable/3890061>
- Guarnizo, C., Armesto, O., Acevedo, A.** (2014). *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863). En V. Paez (Ed). *Catálogo de anfibios y reptiles de Colombia, Asociación Colombiana de Herpetología*, 2(2), 56-61.
- Gutiérrez-Pesquera, L.M.** (2015). *Una valoración macrofisiológica de la vulnerabilidad al calentamiento global: Análisis de los límites de tolerancia térmica en comunidades de anfibios en gradientes latitudinales y altitudinales*. Informe final Becas de postgrado para proyectos de investigación para cooperación al desarrollo, Gobierno de España. Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. <https://www.researchgate.net/profile/Luis-Miguel-Gutierrez-Pesquera/publication/306240109>
- Hargreaves M. & Spriet L. L.** (2018). Exercise Metabolism: Fuels for the Fire. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8, a029744.
- Hillman, S.S.** (1976). Cardiovascular correlates of maximal oxygen consumption rates in anuran amphibians. *Journal of Comparative Physiology*, 109(2), 199-207. <https://doi.org/10.1007/BF00689418>
- Jørgensen B.** (1988). Metabolic costs of growth and maintenance in the toad, *Bufo bufo*. *Journal of Experimental Biology*, 138, 319-331.
- Kern P., Crampa R.B., Franklin C.E.** (2015). Physiological responses of ectotherms to daily temperature variation. *Journal of Experimental Biology*, 218, 3068-3076.
- Lighton J. R. B.** (2008). *Measuring Metabolic Rates. A Manual for Scientists*. Oxford University Press Inc. New York.
- Mahoney, J.J. & Hutchinson, V.H.** (1969). Photoperiod acclimation and 24-hour variations in the critical thermal maxima of a tropical and temperate frog. *Oecologia*, 2, 143- 161. <https://doi.org/10.1007/BF00379157>
- McCutcheon, F.H.** (1936). Hemoglobin function during the life history of the bullfrog. *Journal Cellular Comparative Physiology*, 8, 63-81. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030080107>
- Meza-Parral Y., García-Robledo C., Pineda E., Escobar F., Donnelly M.A.** (2020). Standardized ethograms and a device for assessing amphibian thermal responses in a warming world. *Journal of Thermal Biology*, 89, 102565. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102565>
- Meirelles N.C., Vieira M., Airoidi. L. Focesi A. Jr.** (1979). Some larval properties of *Pipa carvalhoi* adult hemoglobins. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 62A, 859-862.
- Mueller C.A. & Seymour R.S.** (2011). The Regulation Index: A New Method for Assessing the Relationship between Oxygen Consumption and Environmental Oxygen. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84(5), 522-532.
- Navas, C.A.** (1997). Thermal extremes at high elevation in the Andes: Physiological ecology of the frogs. *Journal of Thermal Biology*, 22(6), 467-477. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(97\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(97)00065-X)
- Navas, C.A., Úbeda, C.A., Logares, R., Jara, F.G.** (2010). Thermal tolerances in tadpoles of three species of Patagonian anurans. *South American Journal of Herpetology*, 5(2), 89 - 96. <https://doi.org/10.2994/057.005.0203>
- Nowakowsky, A.J., Watling, J.I., Whitfield, S.M., Todd, B.D., Kurz, D.J., Donnelly, M.A.** (2017). Tropical amphibians in shifting thermal landscapes under land-use and climate change. *Conservation Biology*, 31(1), 96-105. <https://doi.org/10.1111/cobi.12769>

- Paaijmans, K. P., Heinig, R. L., Seliga, R. A., Blanford, J. I., Blanford, S., Murdock, C. C., Thomas, M. B.** (2013). Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global Change Biology*, 19(8), 2373-2380. <https://doi.org/10.1111/gcb.12240>
- Perotti, M., Bonino, M., Ferraro, D., Cruz, F.** (2018). How sensitive are temperate tadpoles to climate change? The use of thermal physiology and niche model tools to assess vulnerability. *Zoology*, 127, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.01.002>
- Pinder A. & Burggren W.** (1983). Respiration during chronic hypoxia and hyperoxia in larval and adult bullfrogs. (*Rana catesbeiana*) II. Changes in respiratory properties of whole blood. *Journal of Experimental Biology*, 10, 205-213.
- Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M., Foster, P.N., La Marca E., Masters K.L., Merino-Viteri A., Puschendorf R., Ron S.R., Sánchez-Azofeifa G.A., Still C.J., Young B.E.** (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161-167. <https://doi.org/10.1038/nature04246>
- Pu P., Zhao Y., Niu Z., Cao W., Zhang T., He J., Wang J., Tang X., Chen Q.** (2021). Comparison of hematological traits and oxygenation properties of hemoglobins from highland and lowland Asia. *Journal of Comparative Physiology B*, 191(6), 1019-1029.
- Rowe, C. L. & Crandall, E. A.** (2018). The acute thermal respiratory response is unique among species in a guild of larval anuran amphibians—Implications for energy economy in a warmer future. *Science of the Total Environment*, 618, 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.332>
- Schulte P. M.** (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1856-1866. <https://doi.org/10.1242/jeb.118851>
- Shelton, G., Jones, D.R., Milsom, W.K.** (2011). Control of breathing in ectothermic vertebrates. En: E. Terjung (Ed.). *Comprehensive Physiology* (pp.857-909). Oxford University Press Inc. New York. <https://doi.org/10.1002/cphy.cp030228>
- Somero G. N.** (1995). Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology*, 57, 43-68. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.000355>
- Storey K.B.** (2002). Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part A* 133, 733-754.
- Triana-Velásquez, T.M., Montes-Rojas, C.M., Bernal M.H.** (2013). Efectos letales y subletales del glifosato (ROUNDUP® Active) en embriones de anuros colombianos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 271-278.
- Weber R. E., Ostojic H., Fago A., Dewilde S., Van Hauewaert M-L, Moens L., Monge C.** (2002). Novel mechanism for high-altitude adaptation in hemoglobin of the Andean frog *Telmatobius peruvianus*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283, R1052-R1060.
- Whitfield, S. M., Bell, K. E., Philippi, T., Sasa, M., Bolaños, F., Chaves, G., Savage, J. M., Donnelly, M. A.** (2007). Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8352-8356. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611256104>
- Zhu, W., Zhang, M., Chang, L., Zhu, W., Li, C., Xie, F., Zhang, H., Zhao, T., Jiang, J.** (2019). Characterizing the composition, metabolism, and physiological functions of the fatty liver in *Rana omeimontis* tadpoles. *Frontiers in Zoology*, 16, 42. <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0341-x>