

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Comparación de la resistencia cutánea a la pérdida de agua por evapotranspiración en dos especies de anfibios ecuatorianos con hábitos ecológicos diferentes: *Pristimantis actites* (Strabomantidae) e *Hyloxalus infraguttatus* (Dendrobatidae)

María Gabriela Loayza Gallardo

Quito, 20 de septiembre del 2019

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. María Gabriela Loayza Gallardo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Andrés Merino Viteri

Director de la Disertación

Quito, septiembre del 2019

A mi abuelita

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo su amor, apoyo y paciencia durante toda la vida haciendo de estos los mejores días, en especial a mi madre que siempre ha sido mi fortaleza.

A mis tías y tío Yovanny por ser luz en mi camino.

A las ranas, seres mágicos, que permitieron que este estudio se realice para así poder generar conocimiento y concientización de los factores que amenazan a este grupo.

A Andrés Merino por todo el conocimiento adquirido en este proyecto y durante la carrera y a todo el equipo de la Iniciativa de Conservación “Balsa de los Sapos” por haberme proporcionado el espacio para esta investigación.

A mis lectoras Christiana Katti y Miryan Rivera por todas sus oportunas observaciones y comentarios para enriquecer este trabajo.

A Santiago Ron por permitirme usar los especímenes del Proyecto “Arca de Noé” para los experimentos.

A mis Dodas: Pamela, Stephanie, Valeria, Diana y José Carlos que sin saber nada de este mundo de la biología siempre han mantenido su curiosidad para apoyarme en este camino, con su alegría y amor infinito todo ha sido mejor.

LISTA DE ABREVIATURAS

EWL:	Pérdida de agua por evapotranspiración
WCP:	Postura de conservación de agua
Po:	Peso inicial
Pf:	Peso final
To:	Temperatura inicial
Tf:	Temperatura final
HR:	Humedad relativa
Ri:	Resistencia cutánea
Rb:	Resistencia de capa borde
SA:	Superficie de área expuesta
Ts:	Temperatura corporal
Ta:	Temperatura ambiente
Sda:	Saturación de vapor de agua

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
4.	OBJETIVOS.....	8
4.1.	GENERAL:.....	8
4.2.	ESPECÍFICOS:.....	8
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.1.	COLECCIÓN DE INDIVIDUOS.....	9
5.2.	MANTENIMIENTO EN EL LABORATORIO.....	9
5.3.	EXPERIMENTOS DE DESECACIÓN	10
5.4.	EXPERIMENTOS DE PÉRDIDA DE AGUA.....	10
5.5.	MODELOS DE AGAR.....	11
5.6.	CÁLCULO DE LAS TASAS DE PÉRDIDA DE AGUA POR EVAPOTRANSPIRACIÓN CUTÁNEA	12
5.7.	RESISTENCIAS CUTÁNEAS	13
5.8.	DATOS AMBIENTALES	14
6.	RESULTADOS.....	15
6.1.	MEDIDAS MORFOMÉTRICAS.....	15
6.2.	TASAS DE PÉRDIDA DE AGUA	15
6.3.	RESISTENCIAS CUTÁNEAS	16
6.4.	DATOS AMBIENTALES	17
7.	DISCUSIÓN.....	18
7.1.	TASAS DE PÉRDIDA DE AGUA	18
7.2.	RESISTENCIAS CUTÁNEAS	19
7.3.	DATOS AMBIENTALES	21
8.	CONCLUSIONES.....	22
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
10.	FIGURAS	28
11.	TABLAS	34
12.	ANEXOS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de Deseccación.....	28
Figura 2. Modelos de agar	29
Figura 3. Valores mensuales de precipitación y temperaturas máximas y mínimas de las coordenadas registradas para la Reserva Río Guajalito.....	30
Figura 4. Valores mensuales de precipitación y temperaturas máximas y mínimas de las coordenadas registradas para La Reserva Manglares Churute.	30
Figura 5. Fluctuación de humedad en los experimentos.	31
Figura 6. Tasa de pérdida de agua ajustada ($\text{g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para <i>P. actites</i> e <i>H. infraguttatus</i>	32
Figura 7. Resistencia cutánea a la pérdida de agua por evapotranspiración.	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Masa y medidas corporales de los individuos vivos y modelos de agar.	34
Tabla 2. Tasas de pérdida de agua y valores de resistencia cutánea y capa borde para <i>Pristimantis actites</i>	35
Tabla 3. Tasas de pérdida de agua y valores de resistencia cutánea y capa borde para <i>Hyloxalus infraguttatus</i>	36
Tabla 4. Información ecológica y de muestreo de <i>Pristimantis actites</i> registrados en la reserva Río Guajalito (Santo Domingo de los Tsáchilas).	37
Tabla 5. Información ecológica y de muestreo de <i>Hyloxalus infraguttatus</i> en Manglares-Churute (Guayas).	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Posturas de las ranas durante la experimentación.....	39
Anexo 2. Escalamiento multidimensional no métrico (NDMS)	40
Anexo 3. Análisis de correlación (Rho de Spearman) de medidas corporales de <i>P. actites</i> e <i>Hyloxalus infraguttatus</i>	41
Anexo 4. Prueba de Normalidad Shapiro Wilk para las tasas de pérdida de agua.....	42
Anexo 5. Análisis de Mann Whitney Wilcoxon para las tasas de pérdida de agua bruta y ajustada entre especies.....	43
Anexo 6. Prueba t de student para las tasas de pérdida de agua en posición de conservación de agua (<i>P. actites</i>) y sentada (<i>H. infraguttatus</i>).....	44
Anexo 7. Análisis de Mann Whitney Wilcoxon para la resistencia cutánea entre <i>P. actites</i> e <i>H. infraguttatus</i>	45

1. RESUMEN

El control de la pérdida de agua por evapotranspiración (EWL, por sus siglas en inglés) en la piel de anfibios ha sido considerado como un factor importante en su adaptación para conquistar ambientes terrestres. Para disminuir la EWL, este grupo ha desarrollado estrategias comportamentales (adoptar postura de conservación de agua o selección de microhábitats húmedos), morfológicas (desarrollo de una piel más gruesa) y fisiológicas (desarrollar resistencia cutánea). En el presente estudio, se analizaron las tasas de (EWL) bruta, ajustada y en postura de conservación de agua para dos especies de anuros terrestres: *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus*. Se comparó la EWL en postura de conservación de agua de las ranas vivas con las de modelos de agar al 3% de igual forma, tamaño y color, mediante un flujo de aire (0.25 m s^{-1}) seco (0% de humedad relativa) y a temperatura ambiente ($\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$) para determinar su resistencia a la desecación. *P. actites* presentó una tasa bruta de pérdida de agua de 0.1658 g h^{-1} e *H. infraguttatus* de 0.091 g h^{-1} . La diferencia entre especies, puede estar determinada por el tamaño, comportamiento o presencia de un mecanismo de resistencia cutánea en las mismas. La tasa de pérdida de agua ajustada de *P. actites* fue $3.42\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y para *H. infraguttatus* fue $2.478\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, las cuales pueden estar determinadas por el comportamiento o un mecanismo de resistencia cutánea. Finalmente la tasa de pérdida de agua en postura de conservación de agua para *P. actites* fue de $2.28\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y para *H. infraguttatus* fue de $3.59\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y la de sus modelos de agar fueron $1.95\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $1.83\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Los resultados indicaron que el valor de resistencia cutánea para *P. actites* fue de 2.22 s cm^{-1} y para *H. infraguttatus* fue de 1.05 s cm^{-1} , diferencias posiblemente relacionadas con sus hábitos ecológicos. *P. actites* al encontrarse en hábitats más abiertos como bosques secundarios o áreas disturbadas, podrían ser más propensos a pérdidas de agua mayores; mientras que *H. infraguttatus* habita en lugares con poca incidencia del viento y están asociados a cuerpos de agua, lo cual podría conllevar a que la especie esté siempre hidratada y no necesitar el desarrollo de un mecanismo de resistencia a la desecación.

Palabras clave: Anfibios, evapotranspiración, hábitos ecológicos, postura de conservación de agua, resistencia cutánea.

2. ABSTRACT

Water loss due to evapotranspiration (EWL) control in the amphibians's skin has been considered as an important factor in their adaptation to terrestrial environments. To reduce EWL, this group has developed behavioral, morphological and physiological strategies, such as adopting water conservation posture or selecting humid microhabitats (behavioral strategies), increase of skin thickness (morphological strategies) and cutaneous resistance (physiological mechanism). In this study, we analyzed the EWL rates (net, adjusted and in water conservation posture) for two species of terrestrial anurans: *Pristimantis actites* and *Hyloxalus infraguttatus*. EWL of the alive frogs were compared with to ones from frog exact replicas (same shape, size and color) made from 3% agar. Frogs and replicas were exposed to a constant flow of dry air (0.25 m s^{-1} ; 0% of relative humidity) at room temperature (20°C) to determine their resistance to desiccation. *P. actites* presented a net water loss rate of 0.1658 g h^{-1} and *H. infraguttatus* presented a rate of 0.091 g h^{-1} . The difference between species may be determined by the size, behavior or presence of cutaneous resistance mechanisms in them. The adjusted water loss rate in *P. actites* was $3.42\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and in *H. infraguttatus* was $2.478\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, which can be determined by the behavior or a cutaneous resistance mechanism. Finally, the water loss rate in water conservation posture for *P. actites* was $2.28\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and for *H. infraguttatus* it was $3.59\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and for their agar models were $1.95\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $1.83\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectively. The results indicated that the cutaneous resistance value for *P. actites* was 2.22 s cm^{-1} and for *H. infraguttatus* it was 1.05 s cm^{-1} , differences which may be associated to their ecological habits, *P. actites* is present in more open habitats such as secondary forests or disturbed areas, so they may be more prone to greater water loss rates; while *H. infraguttatus* lives in places with little wind and is generally associated to water bodies, which may mean that this specie has more constant acces to hydration and does not need to develop a mechanism of resistance to desiccation.

Keywords: Amphibians, cutaneous resistance, ecological habits, evapotranspiration, water posture conservation.

3. INTRODUCCIÓN

El calentamiento global es una amenaza para la biodiversidad (Malcolm et al., 2006), la cual puede llevar a la extinción de miles de especies en los próximos 100 años (Mooney et al., 2009), debido a que los cambios en el clima pueden afectar la capacidad de supervivencia, reproducción y dispersión de las especies (Blaustein et al., 2010).

El 90% de los animales dependen de fuentes externas de calor para controlar la temperatura corporal (ectotermos). Estos animales han realizado cambios evolutivos en su fisiología (crecimiento, locomoción y reproducción) para compensar los efectos de la variación de la temperatura y así conferir resiliencia al cambio climático (Seebacher et al., 2015).

Los anfibios son animales ectotermos y un ejemplo de una de las radiaciones más amplias y conspicuas de animales terrestres, con más de 7000 especies descritas en la mayoría de los hábitats y continentes (Pyron, 2014). Los anfibios cumplen roles importantes en el funcionamiento de los ecosistemas, ya sea como controladores biológicos, en el ciclaje de nutrientes, bioturbación o en el flujo de energía (Hocking y Babbitt, 2014). Poseen respiración por medio de branquias en su fase larval y respiración pulmonar, cutánea y bucofaríngea cuando son adultos. Una de las diferencias con otros vertebrados es que la mayoría sufren notables transformaciones en su desarrollo lo cual se conoce como metamorfosis, característica que no presentan todos los anfibios, ya que algunos presentan desarrollo directo (se desarrollan directamente en la morfología de adulto) (Denver et al., 2002).

Las poblaciones de anfibios han ido disminuyendo a nivel mundial en las últimas décadas (Barinaga, 1990; Wake, 1991; Houlahan et al., 2000). Son el grupo más amenazado entre los vertebrados, por sus etapas acuáticas y terrestres al igual que por sus ciclos reproductivos que dependen de la presencia de humedad. Por lo tanto, los hacen vulnerables frente a los cambios que se dan en el ambiente (Ochoa et al., 2012). Factores como la pérdida y fragmentación del hábitat, contaminantes, infecciones fúngicas y bacterianas, temporadas de sequía, efectos individuales y sinergismos entre el cambio climático; entre otros han provocado la alta sensibilidad de este grupo (Bovo et al., 2018).

El comportamiento de las especies al igual que sus hábitats están siendo alterados, por lo cual las migraciones son necesarias para la supervivencia de los animales (Mooney et

al., 2009) . En los anuros el comportamiento migratorio está limitado por las demandas del equilibrio hídrico y la termorregulación, siendo la pérdida de agua por evaporación el mayor problema, debido a que su piel carece de cobertura y es permeable al agua. Por lo cual, la mayoría de anuros se distribuyen en un rango <1000 m de distancia desde su sitio natal (Sinsch, 1990). Además, varias especies muestran una alta especificidad para hábitats particulares, biomas o nichos climáticos, factores que limitan la dispersión a larga distancia (Pyron, 2014). Por ende, realizan migraciones si los sitios importantes de reproducción, hibernación o nutrición están separados espacialmente (Sinsch, 1990).

La piel de los anfibios es un órgano respiratorio que representa el borde entre las condiciones internas y la interacción con el medio ambiente (Kaufmann y Dohmen, 2016). Su función es intercambiar gas y agua entre los capilares sanguíneos (que llegan hasta la superficie de la piel) y el medio externo, por lo cual constituye el espacio donde ocurre la evapotranspiración y permite la absorción de agua, cumpliendo un rol de equilibrio hídrico (Fanjul et al., 1998). Es altamente vascularizada (Chew y Damman, 1961) y su permeabilidad varía según su hábito ecológico. Cuando los individuos se encuentran en la tierra la permeabilidad aumenta para facilitar la absorción de agua, pero en un medio acuático disminuye (Fanjul et al., 1998). La piel de los anfibios requiere que se mantenga húmeda y permeable al agua, ya que en consecuencia los anfibios presentan tasas de evaporación más altas en comparación con otros vertebrados (Chew y Dammann, 1961).

El control de la pérdida de agua por evapotranspiración (EWL, por sus siglas en inglés) en la piel de anfibios ha sido considerado como factor importante en su adaptación para conquistar ambientes terrestres. La EWL se determina por el tamaño de la rana, la temperatura ambiental, la humedad relativa, el hábitat, los periodos de actividad y los procesos fisiológicos de la rana (Donnelly y Crump, 1998). Para disminuir la EWL, este grupo ha desarrollado estrategias comportamentales como por ejemplo ser nocturno, enterrarse, asumir postura de conservación de agua (WCP, por sus siglas en inglés) y seleccionar microhábitats húmedos, morfológicas como el aumento de un mayor número de proyecciones de piel (Vitt y Caldwell, 2013) y fisiológicas como la impermeabilización de la piel, cambios de color de piel, producción de cera o presencia de resistencia cutánea (Pough et al., 1983)

La resistencia cutánea es un parámetro fisiológico que permite conocer el comportamiento de la piel en la regulación de pérdida de agua por evaporación, en

comparación con una superficie de agua libre. Es una medida directa del efecto de las estructuras tegumentarias y procesos sobre el movimiento del agua desde el interior del animal, a través de la piel y hacia el exterior. Su cuantificación nos permite realizar investigaciones sobre los mecanismos fisiológicos implicados, comparación entre especies y adaptación de los animales a hábitos terrestres (Spotila y Berman, 1976).

En los anfibios existe una relación entre los hábitos ecológicos y su resistencia cutánea a la pérdida de agua y tolerancia a la deshidratación (Young et al., 2015). Se ha determinado que esta resistencia es mayor en especies arbóreas, menor en especies acuáticas e intermedia en especies terrestres. Adicionalmente también se ha reportado una correspondencia entre hábitos ecológicos y comportamientos de termorregulación (Young et al., 2015).

Uno de los métodos más utilizados para estudiar la resistencia cutánea en anuros es la comparación de las tasas de pérdida de agua de las ranas con las de réplicas de agar al 3%; que al no experimentar movimiento, ni circulación sanguínea, han sido utilizados tradicionalmente como modelos nulos (permeabilidad total) (Spotila y Berman, 1976; Wygoda, 1984). Dichos modelos presentan resistencia cutánea igual a cero (superficie de agua libre, que no proporciona resistencia interna a la evaporación) (Leighly, 1937; Powell, 1940). Por lo tanto, son importantes para realizar comparaciones con organismos vivos (Rowley y Alford, 2009).

El Ecuador alberga 624 especies de anfibios descritas hasta septiembre de 2019, ocupando así el cuarto lugar con la anfibiafauna más numerosa a nivel mundial (Ron et al., 2019), pero se encuentra entre los países más afectados por las declinaciones y extinciones poblacionales de anfibios, ubicándose en tercer lugar de Latinoamérica en número de especies amenazadas (IUCN, 2019).

El presente estudio determinará si dos especies de anuros con hábitos ecológicos diferentes: *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus* presentan resistencia cutánea como mecanismo de defensa contra la pérdida de agua.

Pristimantis actites una especie endémica del Ecuador que se distribuye en los alrededores de Pilaló en la vertiente del Pacífico de la Cordillera Occidental, en el centro de Ecuador, en un rango altitudinal de 1420 a 2658 m.s.n.m (Yáñez et al., 2018). Individuos juveniles son conspicuos durante el día, mientras que las ranas adultas presentan actividad

durante la noche (Lynch, 1979). Individuos de esta especie, habitan en bosques nublados, zonas disturbadas como potreros o bosques secundarios; muestran una tendencia a seleccionar hábitats muy húmedos (Lynch y Duellman, 1997) y presentan desarrollo directo, que es un modo reproductivo de una morfología adulta sin pasar por la etapa larvaria intermedia (Callery, Fang, y Elinson, 2001).

Hyloxalus infraguttatus se encuentra distribuida en las estribaciones occidentales de la Cordillera Occidental de los Andes y en la Cordillera de la Costa del Ecuador, desde los 70 a 1500 m.s.n.m (Coloma et al., 2018). Es una especie diurna, la cual inicia su actividad a las seis de la mañana, se mantiene durante el día, disminuye en la tarde y se inactiva durante la noche (Díaz, 1998). Esta especie se encuentra junto a canales de agua o pozas. Presentan desarrollo con larva acuática (Coloma et al., 2018) y su época reproductiva está asociada a condiciones climáticas, es decir temporada lluviosa entre marzo y abril (Pazmiño, 2012). Los machos cuidan de la puesta de 7 a 18 días, manteniendo los nidos húmedos con su orina, hasta que los huevos eclosionan (Duellman, 1992). Luego de la eclosión el macho carga los renacuajos en el dorso por 2 o 3 días hasta depositarlos en el agua, donde la metamorfosis se completa en aproximadamente 3 meses (Pazmiño, 2012).

Los estudios sobre la resistencia cutánea en anfibios son escasos en el Ecuador. Se tiene como referencia investigaciones realizadas por Guevara (2017), Maldonado (2017) y Morales (2019), quienes reportan que especies con hábitos ecológicos diferentes, presentan distintos mecanismos para afrontar cambios que se dan en el ambiente donde se desenvuelven. Maldonado (2017), menciona que la resistencia cutánea para *Pristimantis unistrigatus* (especie terrestre) es 2.814 cm s^{-1} y para *Hypsiboas cinerascens* (especie arborea) es 3.082 cm s^{-1} , demostrando una resistencia cutánea más alta para especies arbóreas, las cuales están expuestas a ambientes hostiles y la distancia a fuentes de agua es mayor al igual que la velocidad del viento (Tracy et al., 2010).

Con los antecedentes ya mencionados, la presente investigación es de gran importancia. Permitirá contribuir con el conocimiento de las tasas de pérdida de agua y resistencias cutáneas que presenta, *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus* con distintos hábitos ecológicos (actividad nocturna-actividad diurna), distintos tipos de reproducción (desarrollo directo – larva acuática); por ende con datos para estudios de conservación. Debido a que la presencia o ausencia de resistencia cutánea, nos permite entender cómo las poblaciones de anfibios podrían responder a potenciales cambios

ambientales (temperatura - precipitación), y así crear proyectos para conservar la biodiversidad, principalmente a los anfibios del Ecuador.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL:

- Comparar las resistencias cutáneas a la pérdida de agua por evapotranspiración en individuos adultos de dos especies de anfibios con hábitos ecológicos diferentes: *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus*.

4.2. ESPECÍFICOS:

- Determinar las tasas de pérdida de agua por evapotranspiración en postura de conservación de agua de *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus*.
- Determinar las tasas de pérdida de agua por evapotranspiración de modelos de agar al 3% de *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus* en postura de conservación de agua.
- Calcular la resistencia cutánea a la pérdida de agua por evaporación en *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus* mediante la comparación de sus tasas de desecación y las de sus modelos de agar correspondientes.
- Asociar la resistencia cutánea de *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus* con sus hábitos ecológicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. COLECCIÓN DE INDIVIDUOS

Se recolectaron 15 individuos de la especie *Pristimantis actites* en La Reserva Río Guajalito provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (0.212559°S, 78.88128°O) a una altitud entre 1785 y 1973 m.s.n.m; entre las 20:30 y 01:51h. También se recolectaron 15 individuos de la especie *Hyloxalus infraguttatus* en la Reserva Ecológica Manglares Churute provincia del Guayas (2.42423°S, 79.66312°O) a una altitud entre 43 y 178 m.s.n.m; entre las 14:30 y 22:38h. Los individuos fueron colocados en recipientes individuales de plástico, con papel toalla humedecido y se trasladaron a las instalaciones de la Iniciativa de Conservación “Balsa de los Sapos” de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

5.2. MANTENIMIENTO EN EL LABORATORIO

Las ranas recolectadas se colocaron en contenedores individuales plásticos en las instalaciones de la Iniciativa de Conservación “Balsa de los Sapos”, con suministros manuales de agua y comida 3 veces a la semana, con grillos (*Gryllus assimilis*) de tamaño apropiado según el tamaño de las ranas.

Los individuos de *P. actites* fueron sometidos a un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Los individuos de *H. infraguttatus* previamente fueron sometidos a este mismo ciclo; sin embargo al no adoptar postura de conservación de agua (experimentos no reportados), se les cambió el ritmo circadiano sometiéndoles a 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz en un terrario de vidrio, cubierto por telas negras.

Su aclimatación fue por una semana bajo condiciones controladas de temperatura (~20 °C), generando una aclimatación a las condiciones del laboratorio, para evitar que los resultados sean afectados por las condiciones de las localidades de colección de las ranas. Se procedió a realizar los experimentos en las instalaciones del Laboratorio de Ecofisiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE.

5.3. EXPERIMENTOS DE DESECACIÓN

Se usó un sistema abierto de flujo de aire (Figura 1) para medir la tasa de pérdida de agua por evapotranspiración (Young et al., 2015). Este sistema estuvo conformado por 3 cámaras de vidrio interconectadas, en donde la cámara inicial y final llevaron un registrador automático de temperatura y humedad relativa (Hygrochron iButton DS1923, resolución 0.0625°C y 0.04% HR), los cuales tomaron datos cada 10 segundos. Estos registradores permitieron conocer las diferencias de temperatura y humedad relativa del flujo de aire antes y después de bañar la cámara experimental.

Los registradores fueron misionados y la información registrada se descargó en el computador mediante el programa OneWire versión 3.15.50 (OneWireViewer, 2010).

El flujo de aire fue fijado en 102 ml min⁻¹ y 330 ml min⁻¹, según el tamaño de la cámara experimental donde se colocaron a los individuos experimentales, para producir una velocidad de aire de 2.5 cm/s en las cámaras experimentales de 2.95 cm y 5.3 cm de diámetro respectivamente. Se conectó una bomba de aire de acuario a una columna secante de 20 cm de largo por 5.5 cm de diámetro de Drierite (8 mesh), y el flujo de aire fue controlado por un lector de flujo OMEGA (FLR1002-D), que se encontró a la salida del sistema de flujo.

5.4. EXPERIMENTOS DE PÉRDIDA DE AGUA

Antes de realizar los experimentos, cada rana fue hidratada y al ingresar a la cámara, el exceso de agua fue retirado con papel toalla, luego se procedió a oprimir ligeramente el abdomen de la rana para asegurarnos de que la vejiga estuviese vacía y evitar que afecte en los resultados de la humedad de salida (Pough et al., 1983). Se tomaron medidas del individuo: rostro-cloaca, el ancho del abdomen y la cabeza y la profundidad del abdomen, también se registró el peso inicial en una balanza electrónica (BOECO Germany BB1-41) con una precisión de 0.001g. Cada experimento constó de 3 fases con una duración de 2 horas. La primera fase fue de 30 minutos, en donde se creó una línea base de las condiciones del flujo de aire; la segunda fase fue de 1 hora, en donde se colocó al individuo en la cámara experimental central, tiempo en el que se esperó que la rana adopte una posición de conservación de agua y la última fase fue de 30 minutos. Donde se creó una línea base final,

sin la rana en la cámara central, para verificar que las condiciones vuelvan a su estado original.

Durante la fase dos (con la rana en la cámara experimental), se tomaron fotografías cada 10 segundos de las cuales se registró la siguiente información: fecha del experimento, hora desde que inicia el experimento cada 10 segundos, flujo de aire mostrado en el lector, postura (que tipo de actividad tiene la rana en esta foto, en donde S=sentada y M=movimiento, con respecto a la foto anterior), WCP (postura de conservación de agua, N=no, S=sí, C=casi) (Anexo 1), posición respecto a la cámara (E=entrada, M=medio, S=salida), y posición son respecto al flujo (F=favor, C=contra, T=transversal). Después de determinar esta fase se tomó el dato de la temperatura corporal en el dorso de la rana, mediante un termopar OMEGA HH378 y se registró su peso final.

5.5. MODELOS DE AGAR

Para poder determinar si existe resistencia cutánea para evitar la pérdida de agua por evapotranspiración, se comparó la tasa de desecación de las ranas vivas con las de modelos de agar al 3%, ya que presentan tasa de evaporación igual al agua libre (Rowley y Alford, 2009) en postura de conservación de agua. Se usó alginato con indicador de color (Max Print Cromático) para la creación de los moldes hechos con las ranas reales anestesiadas (las cuales al momento de ser anestesiadas fueron sacrificadas), dichos moldes permitieron la creación de los modelos de las ranas con una solución de agar al 3%. Los modelos contaron con la forma, tamaño y color mediante tinte vegetal correspondiente al de las ranas reales (Figura 2). Los especímenes experimentales posteriormente fueron depositados en la colección de herpetología del Museo de Zoología (QCAZ).

Para obtener la tasa de pérdida de agua por evapotranspiración de los modelos de agar, se realizó el mismo procedimiento que para las ranas vivas. Previamente los modelos fueron moldeados acordes a las medidas de las ranas utilizadas y se procedió a colocar esmalte de uñas transparente en la parte ventral, para simular que no están expuestos al flujo de aire. Los experimentos con los modelos de agar, se sometieron al flujo de aire por 30 minutos y se colocaron en la misma posición dentro de la cámara, con respecto al flujo de aire en las que las ranas reales adoptaron la postura de conservación de agua o se mantuvieron la mayor cantidad de tiempo sin moverse dentro de la cámara experimental.

Se realizó un escalamiento multidimensional no métrico (NDMS) y la Prueba de Spearman para determinar la correlación que existe entre las ranas vivas y los modelos de agar (Anexo 2 y 3).

5.6. CÁLCULO DE LAS TASAS DE PÉRDIDA DE AGUA POR EVAPOTRANSPIRACIÓN CUTÁNEA

La fórmula usada para calcular la tasa de pérdida de agua por evapotranspiración por hora fue:

$$EWL = \frac{(P_o - P_f) * 60}{T_f - T_o} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde EWL corresponde a la tasa de pérdida de agua por evapotranspiración (g h^{-1}), P_o representa el peso inicial, P_f es el peso final de la rana o modelo de agar (g); T_f es el tiempo final del experimento y T_o indica el tiempo inicial del experimento (min).

Withers y colaboradores en 1984, desarrollaron una fórmula alométrica, la cual permite calcular la superficie expuesta cuando la rana adquiere WCP), para así evitar que el tamaño de los individuos pueda generar sesgo. Esta fórmula fue utilizada por Buttemer y Thomas, (2003) obteniendo un valor estandarizado que permita comparar entre especies. La fórmula fue:

$$SA = 6.6W^{0.56} \quad (\text{Ecuación 2})$$

En donde SA corresponde al área de superficie expuesta (cm^2) y W representa el peso inicial de la rana (g).

Para obtener la tasa de EWLsa se utilizó la siguiente fórmula:

$$EWL_{sa} = \frac{EWL/3600}{SA} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde, EWL_{sa} representa la tasa de pérdida ajustada ($\text{g cm}^{-2}\text{s}^{-1}$), EWL la tasa de pérdida de agua (g h^{-1}) y SA corresponde al área de superficie expuesta (cm^2).

Para calcular la tasa de EWL en postura de conservación de agua (WCP), se utilizó una rutina de programación en R (R Core Team, 2016), la cual nos permitió calcular la tasa de EWL de las ranas vivas que asumieron WCP o se mantuvieron sin moverse en base de las diferencias de la humedad relativa entre la entrada y salida del flujo del aire, la temperatura y el flujo de aire cada 10 segundos que se obtiene de las fotografías durante el experimento.

5.7. RESISTENCIAS CUTÁNEAS

Para calcular la resistencia cutánea se usó la fórmula:

$$E_c = \frac{p}{r_i + r_b} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde E_c corresponde a la tasa de pérdida de agua ($\text{g cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), p representa el gradiente de densidad de vapor de agua, r_i representa la resistencia cutánea (s cm^{-1}) y r_b la resistencia de capa borde (s cm^{-1}) es el área expuesta. En el caso de los modelos de agar su resistencia cutánea es igual a cero; porque una superficie de agua no proporciona resistencia interna a la evaporación (Leighly, 1937 y Powell, 1940). Así la resistencia total (R_{Total}) a la desecación se convierte en la resistencia de la capa borde entre (organismo y ambiente) (Wygoda, 1988).

$$p = s_d(T_s) - RH \cdot s_d(T_a) \quad (\text{Ecuación 5})$$

En donde, p corresponde al gradiente de densidad de vapor de agua, (s_d) corresponde a la densidad de saturación de vapor del agua a la temperatura corporal (T_s), RH , representa la humedad relativa, s_d representa la densidad de saturación de vapor a la temperatura del aire (T_a).

5.8. DATOS AMBIENTALES

Se extrajeron datos de temperatura máxima y mínima y precipitación mensuales de las localidades de colección de los individuos experimentales, a partir de las capas de datos mensuales de temperatura y de precipitación disponibles en el Mapa de Ecosistemas del Ecuador (MAE, 2013). Los datos obtenidos de temperatura fueron multiplicados por 10, para ubicarlos dentro de la misma escala de la precipitación y así visualizar las diferencias entre las localidades de muestreo. La fluctuación de estas variables mensuales fueron graficadas con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, 1999). Los gráficos de las variables ambientales, se usaron para determinar cuáles son los períodos secos o lluviosos en los lugares donde *Pristimantis actites* e *Hyloxalus infraguttatus* fueron colectados (Figura 3 y 4).

6. RESULTADOS

6.1. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS

Los experimentos para *Pristimantis actites* se realizaron con 12 individuos, de los cuales obtuvimos los siguientes rangos de medidas: peso entre 0.62 y 22.33 g ($\bar{x}= 5.46 \pm 7.15$), SVL de 19.2 a 67.9 mm ($\bar{x}= 36.58 \pm 16.54$), ancho de la cabeza (Wh) de 4.4 a 28.3 mm ($\bar{x}= 13.94 \pm 7.64$), ancho del abdomen (Wa) de 6.1 a 33.7 mm ($\bar{x}= 16.07 \pm 9.08$) y la profundidad del abdomen (Ad) entre 6.3 y 19.9 mm ($\bar{x}= 11.57 \pm 4.98$) (Tabla 1).

Los experimentos para *Hyloxalus infraguttatus* se realizaron con 12 individuos, de los cuales obtuvimos los siguientes rangos de medidas: peso entre 0.8 y 1.32 g ($\bar{x}= 1.02 \pm 0.16$), SVL de 18.3 a 23 mm ($\bar{x}= 20.80 \pm 1.43$), ancho de la cabeza (Wh) de 6.3 a 7.9 mm ($\bar{x}= 7.34 \pm 0.78$), ancho del abdomen (Wa) de 8 a 11.6 mm ($\bar{x}= 9.10 \pm 1.33$) y la profundidad del abdomen (Ad) entre 7.3 y 9.3 mm ($\bar{x}= 8.38 \pm 0.69$) (Tabla 1).

Se determinó que las medidas de las ranas de *P. actites* con sus modelos de agar respectivos, se encontraban altamente relacionadas, con excepción en el ancho del abdomen ($\rho=0.61$) y en el caso de *H. infraguttatus* hubieron diferencias significativas en la correlación del ancho ($\rho= 0.31$) y profundidad ($\rho= 0.05$) del abdomen. Estas correlaciones se realizaron con la prueba de Spearman (ρ), la cual determinó que los valores de comparación entre especies y sus modelos podrían variar; ya que cuando se realizaron los moldes, las ranas vivas habían reducido el ancho del abdomen y por ende la profundidad del mismo, como causa del estrés al vivir en cautiverio (Anexo 2 y 3).

6.2. TASAS DE PÉRDIDA DE AGUA

Se determinaron las tasas brutas de pérdida de agua por hora para *P. actites* ($\bar{x}= 0.1658 \text{ g h}^{-1} \pm 0.11$) y para *H. infraguttatus* ($\bar{x}= 0.091 \text{ g h}^{-1} \pm 0.02$). Al comparar entre especies mediante la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, se determinó que existen diferencias significativas entre tasas, lo que significa que las dos especies pierden agua a tasas diferentes ($V= 66$; $p < 0.05$). Los detalles de los análisis estadísticos se encuentran en el Anexo 5.

El promedio de la tasa de EWL ajustada para *P. actites* fue de $\bar{x} = 3.42\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y para sus modelos de agar $\bar{x} = 4.698\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para *H. infraguttatus* $\bar{x} = 2.478\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y para sus modelos de agar $\bar{x} = 3.849\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Al comparar las tasas de EWL ajustada, se observaron diferencias entre especies ($V = 65$; $p < 0.05$) (Resultado del análisis en el Figura 6).

En los experimentos realizados con los modelos de agar se observó un flujo constante de humedad, tanto para *P. actites* como para *H. infraguttatus*, presentaron menor pérdida de humedad en comparación con las ranas vivas, debido a que los modelos de agar fueron diseñados en postura de conservación de agua y son estáticos (Figura 5).

Debido a que *H. infraguttatus* no logró ponerse en WCP, se calculó su tasa de pérdida de agua por evapotranspiración para el periodo más largo en que los individuos llegaron a permanecer estáticos dentro de la cámara experimental y fue en $\bar{x} = 46 \pm 10.39$ minutos y su tasa de pérdida de agua $\bar{x} = 3.59\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. *P. actites* logró adoptar WCP en $\bar{x} = 23.16 \pm 13.77$ minutos y la tasa de pérdida de agua en WCP para esta especie fue $\bar{x} = 2.28\text{E-}06 \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Mediante la prueba *t* de student se pudo determinar que si existen diferencias significativas entre especies ($t = -2.8784$; $p < 0.05$).

Para todas las tasas de pérdida de agua, se realizó la prueba de de homogeneidad de varianzas, Levene, para evaluar si existe variabilidad entre los dos grupos de especies *P. actites* e *H. infraguttatus* y la prueba de Shapiro wilk que permitió determinar si los datos tenían una distribución normal (Cayuela, 2011; Anexo 4).

6.3. RESISTENCIAS CUTÁNEAS

La resistencia cutánea (R_i) a la pérdida de agua para *P. actites* fue $\bar{x} = 2.50 \text{ s cm}^{-1}$ y la resistencia de capa borde (R_b) de sus modelos de agar respectivos $\bar{x} = 0.9301 \text{ s cm}^{-1}$.

La resistencia cutánea (R_i) para *H. infraguttatus* fue $\bar{x} = 1.05 \text{ s cm}^{-1}$, y la resistencia de capa borde (R_b) de sus modelos de agar respectivos $\bar{x} = 1.78 \text{ s cm}^{-1}$.

Estos datos evidencian que existen diferencias significativas entre especies ($V = 66$; $p < 0.05$; Anexo 7).

6.4. DATOS AMBIENTALES

P. actites habita en La Reserva Río Guajalito, se determinó que la temperatura máxima mensual es ~22 °C de junio a septiembre y la temperatura mínima es de 12 °C aproximadamente, excluyendo los meses de junio a agosto donde esta temperatura se incrementa a ~17°C. La precipitación varió, siendo enero-abril los meses más lluviosos con precipitaciones ~300 mm y junio-agosto los más secos con precipitaciones menores a 100 mm (Figura 3).

H. infragutttaus habita en La Reserva Manglares Churute, se determinó que la temperatura máxima mensual es ~32 °C en marzo, abril y diciembre y la temperatura mínima es de 22 °C aproximadamente en junio-septiembre. La precipitación varió siendo la época más lluviosa de enero-abril con precipitaciones de ~300 mm y los meses más secos junio, julio y noviembre, donde las precipitaciones son mínimas ~10 mm, es decir no hay presencia de lluvia (Figura 4).

7. DISCUSIÓN

7.1. TASAS DE PÉRDIDA DE AGUA

La pérdida de agua por evapotranspiración está relacionada con la humedad relativa del aire y la temperatura del ambiente externo en el cual residen los individuos, ya sea aire, suelo o agua (Hillman, 2009). El rol que desempeña la humedad en la actividad de las ranas es de gran importancia, ya que es un indicativo de la velocidad de la tasa de evaporación de sus fluidos corporales (Martof, 1953).

En los experimentos realizados se obtuvieron datos de los registradores automáticos de temperatura y humedad, los cuales nos indicaron que los picos de humedad se incrementan cuando existe mayor superficie expuesta. Esto es notorio en las ranas vivas porque presentan movimiento durante el experimento; en comparación con los modelos de agar, donde los valores de humedad se mantienen constantes al ser estáticos y estar diseñados en postura de conservación de agua (Figura 5).

Las tasas brutas de pérdida de agua, se obtuvieron mediante análisis gravimétricos, cuantificando cuánta agua perdió la rana en función de su peso perdido durante el experimento. Como la evaporación del agua está correlacionada con la superficie expuesta (Spotila y Berman, 1976) y *P. actites* es más grande que *H. infraguttatus*, entonces se esperaba que *P. actites* pierda más agua. En efecto, esto se constata cuando se comprueba que *P. actites* pierde más agua $\bar{x} = 0.1658 \text{ g h}^{-1}$ que *H. infraguttatus* $\bar{x} = 0.091 \text{ g h}^{-1}$; sin embargo se debe considerar que estos datos están influenciados por el comportamiento de cada rana durante el experimento.

Uno de los mecanismos comportamentales por parte de los anfibios para evitar la pérdida de agua, es adoptar postura de conservación de agua la cual consiste en acercar las extremidades hacia el cuerpo, bajar la cabeza y presionar la parte ventral sobre el sustrato (Figura 2; Heatwole et al., 1969; Pough, 1983) ayudándole a minimizar el área de la superficie expuesta y por ende la pérdida de agua. Este mecanismo fue identificado en *P. actites* mas no en *H. infraguttatus* a pesar de que se realizó el cambio de su ritmo circadiano. Por tal motivo se estimó la tasa de pérdida de agua en posición de conservación de agua, para el periodo que *H. infraguttatus* se mantuvo estático dentro de la cámara. Al comparar

la EWL en WCP para *P. actites* ($\bar{x}= 2.28\text{E}-06 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e *H. infraguttatus* ($\bar{x}= 3.59\text{E}-06 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Tabla 2; Tabla3), se determinó que existen diferencias significativas, las mismas que son explicadas por sus hábitos ecológicos (Tabla 4 y 5; Ver sección 7.2).

En la transición de la vida acuática a la terrestre, los anfibios enfrentaron el problema de mantenimiento de la humedad corporal (Sayer, 2005). Una especie que esté relacionada a fuentes de agua como lo es *H. infraguttatus* presenta menor riesgo a la desecación, porque tiene mayor acceso a la hidratación. Por el contrario una especie como *P. actites* que está expuesta a condiciones ambientales que favorecen a la evaporación por largos periodos, debe reemplazar la humedad perdida por la evaporación de la superficie por sus reservas dentro del cuerpo (Thorson y Svihla, 1943).

7.2. RESISTENCIAS CUTÁNEAS

La mayoría de anfibios presentan una piel altamente permeable y su resistencia cutánea a la pérdida de agua por evaporación es muy baja o no se puede distinguir de una superficie de agua libre, por lo cual estas especies han desarrollado comportamientos que les permiten evitar la desecación, por ejemplo, mediante la cercanía a fuentes de agua. A estos anuros se les conoce como anuros típicos (Buttemer, 1990).

La resistencia cutánea se considera la métrica más informativa de las tasas de pérdida de agua, ya que para ser calculada se toma en cuenta el periodo donde los individuos no presentan movimiento (Wygoda, 1984; Lillywhite et al., 1997) y por lo tanto se puede obtener datos de la tasa de pérdida de agua ajustada por la superficie expuesta (Figura 6), para así controlar los sesgos y comparar entre especies. Finalmente se complementa el cálculo con la tasa de pérdida de agua de los modelos de agar que como se mencionó actúan como modelos nulos (evaporación igual a una superficie de agua libre) (Spotila y Berman, 1976; Wygoda, 1984).

La resistencia cutánea puede ser explicada por el hábito ecológico de las especies. Estudios anteriores corroboran que especies arbóreas presentan resistencias más altas (Lillywhite, 2006; Hillman et al., 2009) en comparación a especies terrestres y acuáticas cuya resistencia es casi nula (Young et al., 2015), por ejemplo *Xenopus leavis*, una especie acuática, pierde agua al mismo ritmo que una superficie de agua libre (Wygoda, 1984).

Para especies con hábitos ecológicos terrestres los estudios son escasos, pero Young y sus colaboradores (2015) determinaron un rango de resistencia cutánea de 2.9 a 7.2 s cm⁻¹ para este tipo de anuros. Guevara (2017) y Maldonado (2017) obtuvieron valores de resistencia cutánea para *Pristimantis laticlavus* (1.72 s cm⁻¹) y para *Pristimantis unistrigatus* (0.719 s cm⁻¹), respectivamente. La resistencia cutánea de *P. actites* (2.22 s cm⁻¹), es comparable (dentro del rango) a otros individuos de este género previamente estudiados, ya que presentan hábitos ecológicos parecidos como el desarrollo directo y la presencia en áreas disturbadas.

De la especie de la familia Dendrobatidae se comparó con investigaciones realizadas por Romero (2013) y Morales (2019). Romero (2013) se basó en la ecología de *Hyloxalus yasuní* para determinar que no presenta riesgo a la desecación, debido a que siempre se encontraron individuos cerca de riachuelos o fuentes de agua. Cabe recalcar que esta investigación la realizó en el campo, llevando a cabo análisis de tolerancias térmicas. La conclusión de este estudio se basó en la poca pérdida de peso de los modelos de agar en los microhábitats de las especies. Morales (2019) determinó una resistencia cutánea cercana a cero para *Epipedobates boulengeri*, por lo cual estos datos son comparables con *H. infraguttatus* (1.05 s cm⁻¹) que presenta una resistencia cutánea baja y también se propone que ha adoptado mecanismos comportamentales, como la selección de microhábitats, para evitar la desecación.

Las resistencias cutáneas de las especies experimentales fueron significativamente diferentes. *P. actites* presentó una resistencia cutánea mayor, probablemente porque habitan en áreas abiertas o bosques secundarios (Lynch y Duellman 1997) donde cambios en la incidencia del viento o en la temperatura tienen un mayor efecto en su fisiología. Por lo tanto, al experimentar condiciones de desecación de manera constante son más propensos a la pérdida de agua. La ecología de *H. infraguttatus* la expone a estar cerca de cuerpos de agua, manteniéndola siempre hidratada, su pico de actividad como la reproducción está ligado a condiciones climáticas, es decir temporada lluviosa entre marzo y abril (Pazmiño, 2012). Por esta razón no se esperaría el desarrollo de un mecanismo de defensa contra la desecación, pero la presencia de resistencia cutánea se puede dar para enfrentar la estacionalidad de los bosques donde habita.

7.3. DATOS AMBIENTALES

Los eventos climáticos extremos, como las épocas de sequía pueden causar la pérdida de las poblaciones, al exceder los límites fisiológicos. Por lo tanto, la supervivencia dependerá si los organismos susceptibles pueden encontrar refugios que amortigüen estas condiciones (Scheffers et al., 2014). Los microhábitats (suelo, troncos, hoyos de los árboles, vegetación, entre otros) (Tabla 4 y 5), presentan un potencial extraordinario para amortiguar el clima y reducir la mortalidad (Scheffers et al., 2013), ya que pueden regular la temperatura y reducir la temperatura máxima (Scheffers et al., 2014; Shoo et al., 2011).

Estas propiedades de amortiguación de los microhábitats, probablemente están relacionadas con la lluvia. Cuando existe menos agua, menor es la capacidad de absorber calor, así que en áreas con variación estacional en la precipitación, los microhábitats pueden perder periódicamente su capacidad como refugios térmicos (Scheffers et al., 2013).

En el presente estudio, las localidades de muestreo son estacionales, exponiendo a las especies a condiciones de sequía y/o temperatura alta. En La Reserva Manglares Churute, donde está presente *H. infraguttatus* existe una marcada diferencia en la precipitación, entre los periodos enero-abril (lluvioso) y mayo-diciembre (seco), un patrón similar se observa para *P. actites* en la Reserva Río Guajalito, siendo enero-mayo (lluvioso) y junio-diciembre (seco) (Figura 3 y 4). Dichas características ambientales, pudieron funcionar como presiones evolutivas, para generar mecanismos comportamentales como por ejemplo, ser nocturno, adoptar postura de conservación de agua, o estar asociado a cuerpos de agua; al igual que mecanismos fisiológicos como resistencia cutánea (Pough et al., 1983; Vitt y Cadwell, 2013). Permitiendo que las poblaciones sean viables y tolerantes a vivir en áreas disturbadas como en el caso de *P. actites*.

8. CONCLUSIONES

Pristimantis actites asumió postura de conservación de agua, indicando el desarrollo de un mecanismo comportamental para evitar la pérdida de agua.

Hyloxalus infraguttatus no adquirió postura de conservación de agua, pese a que fue sometido al cambio de su ritmo circadiano, ya que al encontrarse asociada a ríos, quebradas y pozas, se asume que esta especie no está amenazada por la pérdida de agua.

La resistencia cutánea calculada para *Pristimantis actites* fue de 2.22 s cm^{-1} y para *Hyloxalus infraguttatus* fue de 1.05 s cm^{-1} , estas diferencias podrían asociarse al hábito ecológico de las ranas, ya que *P. actites* se encuentra en hábitats más vulnerables como son las zonas intervenidas; mientras que *H. infraguttatus* se encuentra en zonas cercanas a cuerpos de agua, por lo cual no necesita del desarrollo de un mecanismo de resistencia a la desecación.

La presencia de resistencia cutánea podría ser una estrategia para confrontar cambios en sus ambientes naturales, indicando que especies con resistencias menores serían más susceptibles a las variaciones generadas por el cambio climático.

El estudio de los microhábitats, donde están activas las especies, incluyendo las limitaciones fisiológicas es importante para realizar evaluaciones acertadas de vulnerabilidad en el futuro y predicciones de distribución geográfica en el tiempo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barinaga, M. (1990). Where have all the froggies gone?. *Science*, 247(4946), 1033–1035.
- Blaustein, A. R., Walls, S. C., Bancroft, B. A., Lawler, J. J., Searle, C. L., Gervasi, S. S., y Gervasi, S. S. (2010). Direct and Indirect Effects of Climate Change on Amphibian Populations. *Diversity*, 2(2), 281–313.
- Bovo, R., Navas, C., Tejado, M., Valença, S., Gouveia, S., Bovo, R. P., y Gouveia, S. F. (2018). Ecophysiology of Amphibians: Information for Best Mechanistic Models. *Diversity*, 10(4), 118.
- Buttemer, W. A. (1990). Effect of Temperature on Evaporative Water Loss of the Australian Tree Frogs *Litoria caerulea* and *Litoria chloris*. *Physiological Zoology*, 63(5), 1043–1057.
- Buttemer, W. A., y Thomas, C. (2003). Influence of temperature on evaporative water loss and cutaneous resistance to water vapour diffusion in the orange-thighed frog (*Litoria xanthomera*). *Australian Journal of Zoology*, 51(2), 111.
- Callery, E. M., Fang, H., y Elinson, R. P. (2001). Frogs without polliwogs: Evolution of anuran direct development. *BioEssays*, 23(3), 233–241.
- Cayuela, L. (2011). *Introducción a R. Área de Biodiversidad y Conservación*. Universidad Rey Juan Carlos, Deapatamental 1 D-I. 231. Madrid -España.
- Chew, R. M., y Dammann, A. E. (1961). Evaporative water loss of small vertebrates, as measured with an infrared analyzer. *Science*, 133(3450), 384–385.
- Coloma, L. A., Ortiz, D. A., Frenkel, C. y Pazmiño-Armijos, G. (2018). *Hyloxalus infraguttatus*. En: Ron, S. R., Yáñez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A. Ortiz, D.A. (Eds). Anfibios del Ecuador. [https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Hyloxalus infraguttatus](https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Hyloxalus_infraguttatus), acceso Domingo, 8 de julio de 2018.
- Denver, R. J., Glennemeier, K. A., y Boorse, G. C. (2002). Endocrinology of Complex Life Cycles: Amphibians. *Hormones, Brain and Behavior*, 469–XI.
- Díaz, M. (2018). *Comportamiento social, reproducción, cuidado parental y vocalización de Colostethus infraguttatus (Anura: Dendrobatidae)*. (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Donnelly, M. A., y Crump, M. L. (1998). Potential Effects of Climate Change on Two Neotropical Amphibian Assemblages. In *Potential Impacts of Climate Change on Tropical Forest Ecosystems* (pp. 401–421). Springer, Dordrecht.
- Dostalova, A., Montagnani, C., Hodálová, I., Jogan, J., Király, G., Feráková, V., y Bernhardt, K.-G. (2019). Amphibians on the IUCN Red List. Retrieved July 27, 2019.
- Duellman, W. E. (1992). Reproductive Strategies of Frogs. *Scientific American*, Vol. 267, pp. 80–87.

Fanjul, M. L., Hiriart, M., y Fernández de Miguel, F. (1998). *Biología funcional de los animales*. 1^{ra}. Madrid. Editorial Siglo XXI.

Guevara, V. (2017). *Tasas de pérdida de agua por evapotranspiración en dos especies de anfibios con hábitos ecológicos diferentes: Hypsiboas cinerascens (Anura: Hilidae) y Pristimantis unistrigatus (Anura: Craugastoridae)*. (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Heatwole, H., Torres, F., Blasini De Austin, S., y Heatwole, A. (1969). Studies on anuran water balance—I. Dynamics of evaporative water loss by the coqui, *Eleutherodactylus portoricensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 28(1), 245–269.

Hillman, S. S. (2009). Ecological and environmental physiology of amphibians. *BioScience*, 60(2), 155.

Hocking, D., y Babbitt, K. (2014). Amphibian Contributions to Ecosystem Services. *Herpetological Conservation and Biology*.

Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H., y Kuzmin, S. L. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404(6779), 752–755.

Kaufmann, K., y Dohmen, P. (2016). Adaption of a dermal in vitro method to investigate the uptake of chemicals across amphibian skin. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 10.

Leighly, J. (1937). A Note on Evaporation. *Ecology*, 18(2), 180–198.

Lillywhite, H. B., Mittal, A. K., Garg, T. K., y Agrawal, N. (1997). Integumentary structure and its relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *Journal of Zoology*, 243(4), 675–687.

Lillywhite, H. B. (2006). Water relations of tetrapod integument. *Journal of Experimental Biology*, 209(2), 202–226.

Lynch, J. D. (1979). A New Frog Species of the *Eleutherodactylus fitzingeri* Group from the Pacific Andean Versant in Ecuador. *Herpetologica*, Vol. 35, pp. 228–233.

Lynch, J. D y Duellman, W. E. (1997). *Frogs of the genus Eleutherodactylus (Leptodactylidae) in western Ecuador: Systematics, Ecology, and Biogeography*. Natural History of Museum. University of Kansas. USA.

MAE. (2013). *Mapa de Ecosistemas del Ecuador*. Disponible en: <http://mapainteractivo.ambiente.gob.ec/portal/>.

Malcom, J. R., Liu, C., Neilson, R. P., Hansen, L., y Hannah, L. (2006). Global Warming and Extinctions of Endemic Species from Biodiversity Hotspots. *Conservation Biology*, 20(2), 538–548.

Maldonado, G. A. (2017). *Tasas de pérdida de agua por evapotranspiración en dos especies de anfibios ecuatorianos con hábitos ecológicos diferentes: Hypsiboas cinerascens*

(*Anura: Hylidae*) y *Pristimantis unistrigatus* (*Anura: Craugastoridae*). (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Martof, B. (1953). Home Range and Movements of the Green Frog, *Rana clamitans*. *Ecology*, 34(3), 529–543.

Mooney, H., Larigauderie, A., Cesario, M., Elmquist, T., Hoegh-Guldberg, O., Lavorel, S., y Yahara, T. (2009). Biodiversity, climate change, and ecosystem services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 1(1), 46–54.

Ochoa-Ochoa, L. M., Rodríguez, P., Mora, F., Flores-Villela, O., y Whittaker, R. J. (2012). Climate change and amphibian diversity patterns in Mexico. *Biological Conservation*, 150(1), 94–102.

Pazmiño Otamendi, G. I. (2012). *Territorialidad, comportamiento social, reproducción y vocalización de Hyloxalus infraguttatus* (*Anura: Dendrobatidae*). (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Pough, F. H., Taigen, T. L., Stewart, M. M., y Brussard, P. F. (1983). Behavioral Modification of Evaporative Water Loss by a Puerto Rican Frog. *Ecology*, 64(2), 244–252.

Powell, R. W. (1940). Further experiments on the evaporation of water from saturated surfaces. *Chemical Engineering Research and Design*, 18(36/55).

Pyron, R. A. (2014). Biogeographic Analysis Reveals Ancient Continental Vicariance and Recent Oceanic Dispersal in Amphibians. *Systematic Biology*, 63(5), 779–797.

R. Core Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Romero-Barreto, P. G. (2013). *Requerimientos fisiológicos y microambientales de dos especies de anfibios* (*Scinax ruber* e *Hyloxalus yasuni*) *del bosque tropical de Yasuní y sus implicaciones ante el cambio climático*. (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (2019). Anfibios del Ecuador. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/> [acceso 21 de marzo 2019].

Rowley, J. J., y Alford, R. A. (2009). Desiccation and shelter-site use in a tropical amphibian: comparing toads with physical models. *Functional Ecology* 10: 193-200.

Sayer, M. D. J. (2005). Adaptations of amphibious fish for surviving life out of water. *Fish and Fisheries*, 6(3), 186–211.

Scheffers, B. R., Brunner, R. M., Ramirez, S. D., Shoo, L. P., Diesmos, A., y Williams, S. E. (2013). Thermal Buffering of Microhabitats is a Critical Factor Mediating Warming Vulnerability of Frogs in the Philippine Biodiversity Hotspot. *Biotropica*, 45(5), 628–635.

Scheffers, B. R., Edwards, D. P., Diesmos, A., Williams, S. E., y Evans, T. A. (2014). Microhabitats reduce animal's exposure to climate extremes. *Global Change Biology*, 20(2), 495–503.

Scheffers, B. R., Evans, T. A., Williams, S. E., y Edwards, D. P. (2014). Microhabitats in the tropics buffer temperature in a globally coherent manner. *Biology Letters*.

Seebacher, F., White, C. R., y Franklin, C. E. (2015). Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change*, 5(1), 61–66.

Sinsch, U. (1990). Migration and orientation in anuran amphibians. *Ethology Ecology & Evolution*, 2(1), 65–79.

Shoemaker, V y McClanahan, L. (1975). Evaporite water loss, nitrogen excretion and osmoregulation in phyllomedusine frogs. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 100(4) 331-345.

Shoo, L. P., Storlie, C., Vanderwal, J., Little, J., y Williams, S. E. (2011). Targeted protection and restoration to conserve tropical biodiversity in a warming world. *Global Change Biology*, 17(1), 186–193.

Spotila, J. R., y Berman, E. N. (1976). Determination of skin resistance and the role of the skin in controlling water loss in amphibians and reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 55(4), 407–411.

Thorson, T., y Svihla, A. (1943). Correlation of the Habitats of Amphibians with Their Ability to Survive the Loss of Body Water. *Ecology*, 24(3), 374–381.

Toledo, R., y Jared, C. (1993). Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 105(4), 593–608.

Tracy, C. R., Christian, K. A., y Tracy, C. R. (2010). Not just small, wet, and cold: effects of body size and skin resistance on thermoregulation and arboreality of frogs. *Ecology*, 91(5), 1477–1484.

Vitt, L. J., y Caldwell, J. P. (2013). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. 2^{da} edición. Editorial Academic Press. California-USA.

Wake, D. B. (1991). Declining amphibian populations. *Science*, 253(5022), 860–861.

Withers, P. C., Hillman, S. S., y Drewes, R. C. (1984). Evaporative water loss and skin lipids of anuran amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, 232(1), 11–17.

Wygoda, M. L. (1984). Low Cutaneous Evaporative Water Loss in Arboreal Frogs. *Physiological Zoology*, 57(3), 329–337.

Wygoda, M. (1988). Adaptive Control of Water Loss Resistance in an Arboreal Frog. *Herpetologica*, 44, pp. 251–257.

Yáñez-Muñoz, M. H., Páez-Rosales, N., Frenkel, C., Varela-Jaramillo, A. y Ron, S. R. (2018). *Pristimantis actites*. En: Ron, S.R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). Anfibios del Ecuador. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. [https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis actites](https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis_actites) [acceso 13 demarzo 2019].

Young, J. E., Christian, K. A., Donnellan, S., Tracy, C. R., y Parry, D. (2015). Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(5), 847–856.

10. FIGURAS

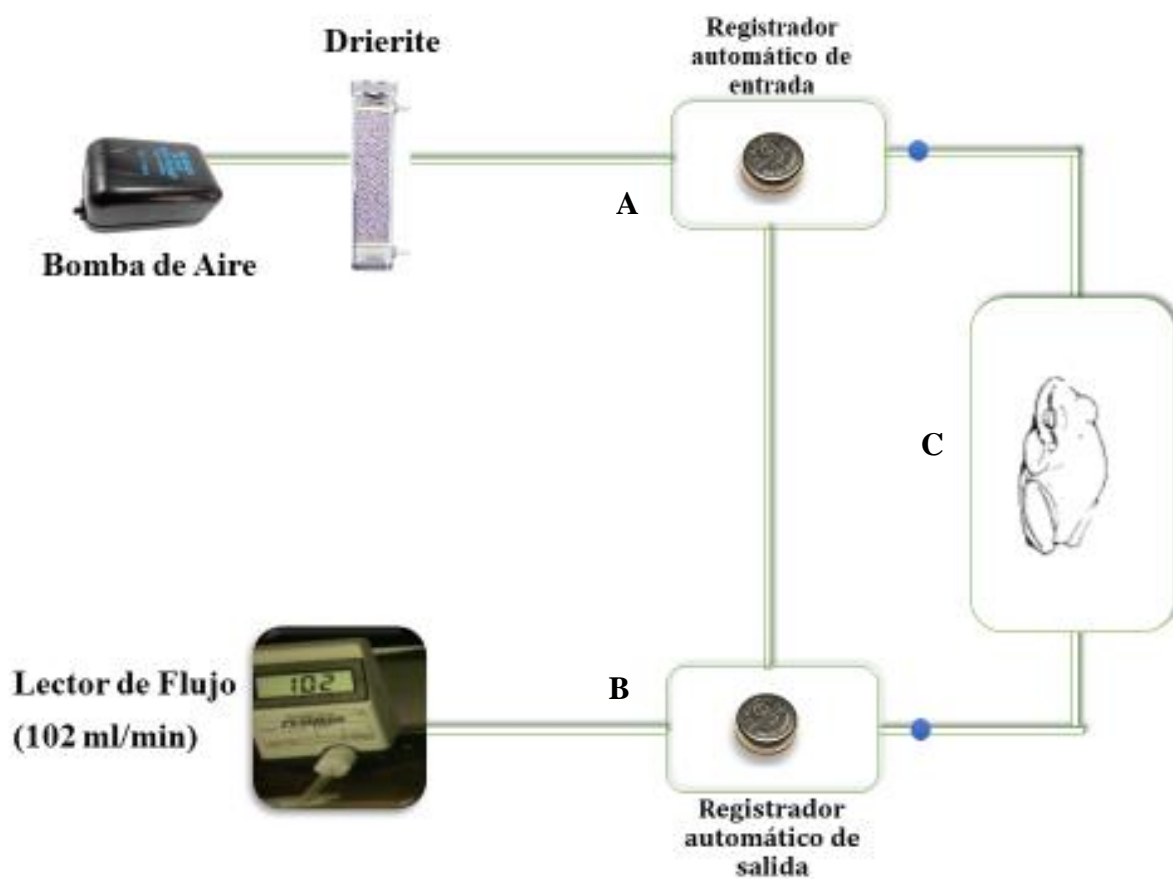


Figura1. Sistema de Desección. A) representa la cámara de entrada, B) representa la cámara de salida, las cuales llevan los registradores automáticos de temperatura y humedad y C) representa la cámara central donde se colocó al individuo (rana o modelo de agar), para el experimento (Shoemaker y McClanahan, 1975).

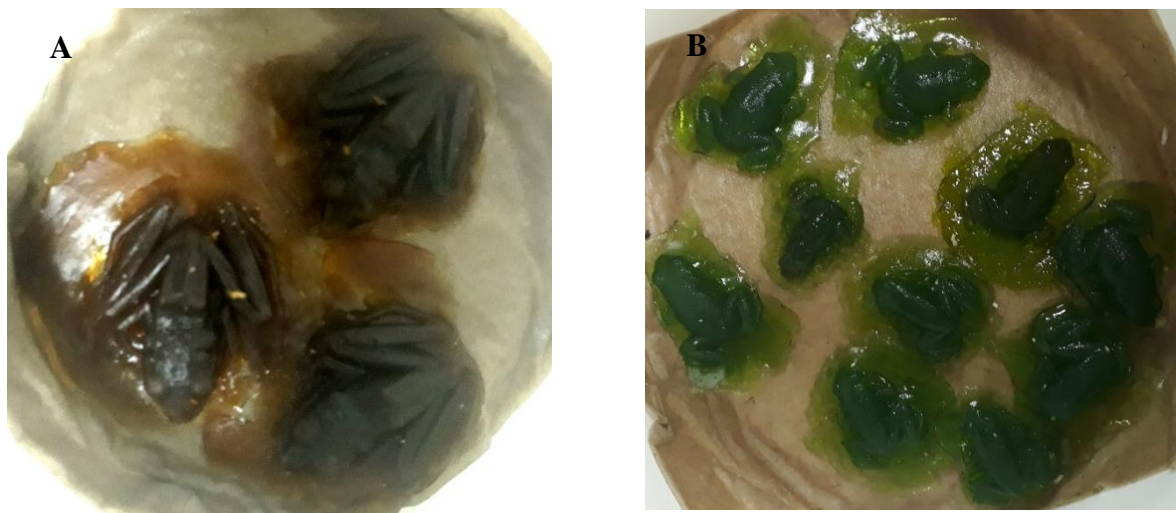


Figura 2. Modelos de agar. A) *Pristimantis actites*, B) *Hyloxalus infraguttatus*. Modelos realizados con la forma, tamaño y color de las ranas vivas de agar al 3%.

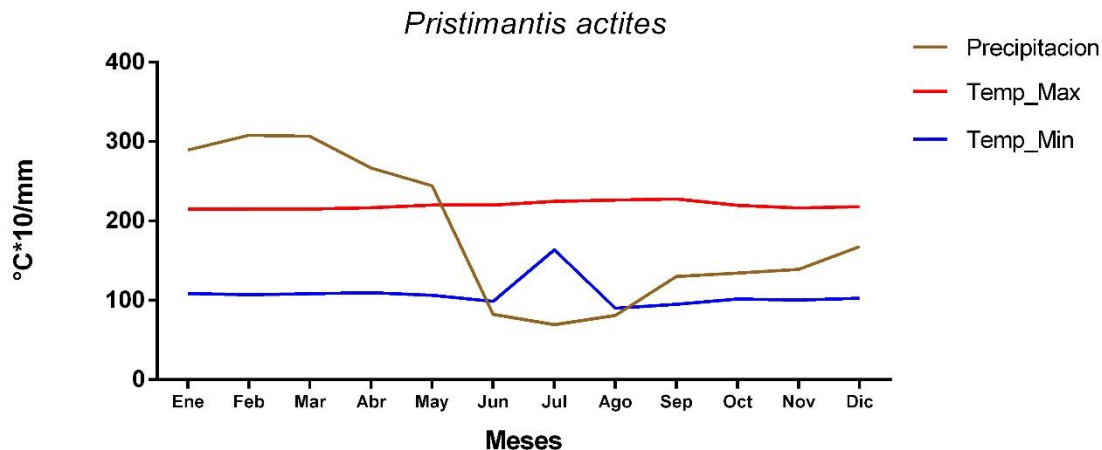


Figura 3. Valores mensuales de precipitación y temperaturas máximas y mínimas de las coordenadas registradas para la Reserva Río Guajalito. La variación de la precipitación indica la estacionalidad de este lugar con respecto a los meses del año. Las temperaturas se demuestran multiplicadas por 10.

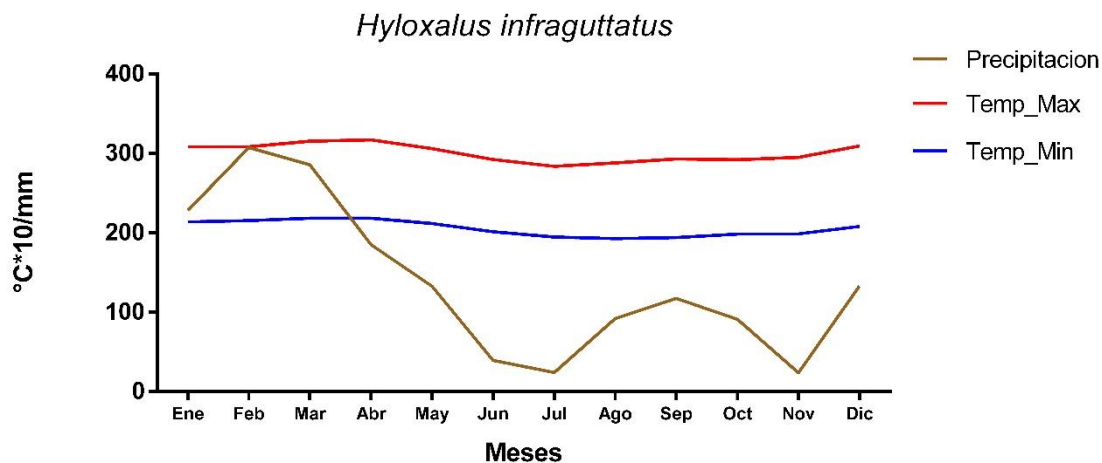


Figura 4. Valores mensuales de precipitación y temperaturas máximas y mínimas, de las coordenadas registradas para La Reserva Manglares Churute. La variación de la precipitación indica la estacionalidad de este lugar con respecto a los meses del año. Las temperaturas se demuestran multiplicadas por 10.

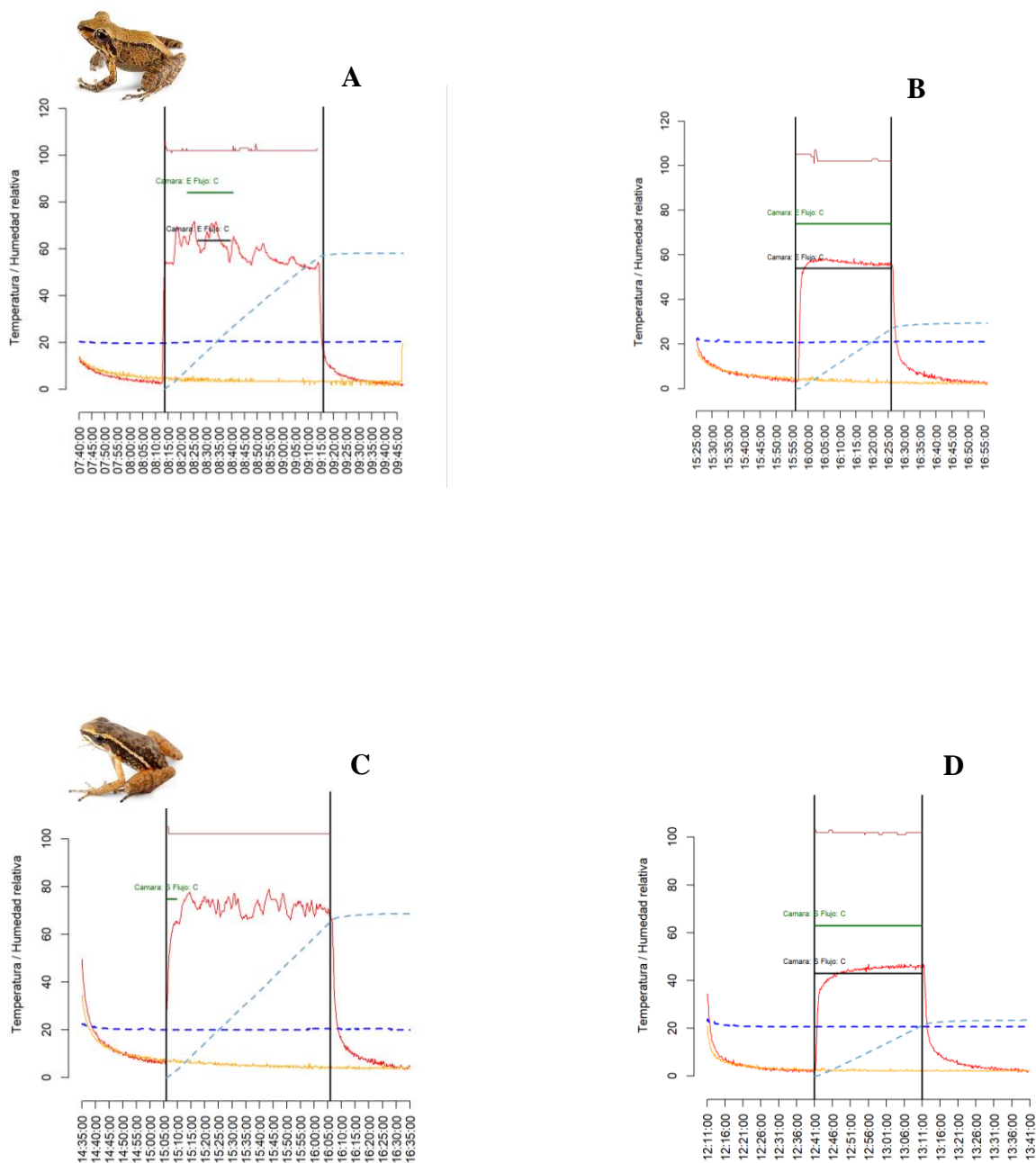


Figura 5. Fluctuación de humedad en los experimentos. A-B) *Pristimantis actites*, B-C) *Hyloxalus infraguttatus*. Los gráficos de la izquierda corresponden a las ranas vivas (A y C) y los de la derecha a los modelos de agar (B y D). La línea roja representa el flujo de humedad y las fluctuaciones el movimiento de la rana durante el experimento, la línea negra representa el tiempo donde la rana se mantuvo en posición de conservación de agua o estática, la línea azul representa la humedad relativa y la celeste representa la humedad relativa en postura de conservación de agua.

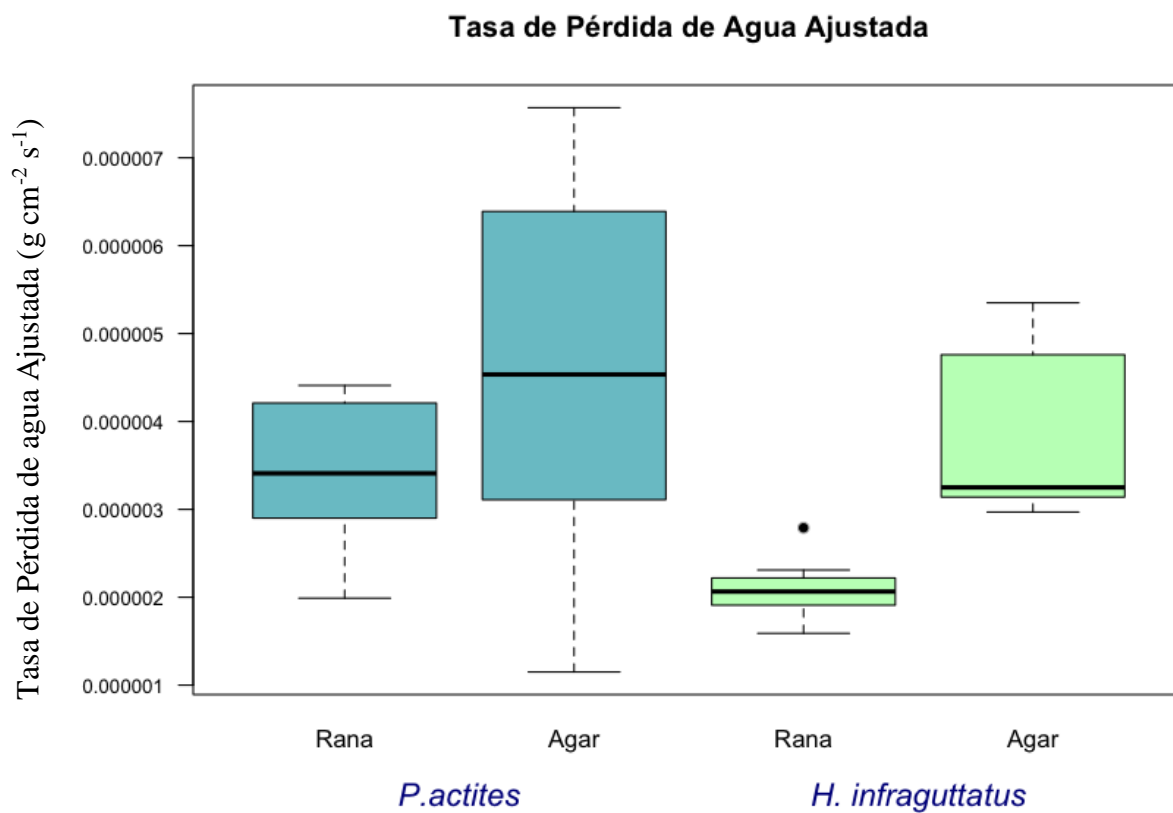


Figura 6. Tasa de pérdida de agua ajustada (g cm⁻² s⁻¹) para *P. actites* e *H. infraguttatus*. *P. actites* pierde más agua en comparación con *H. infraguttatus* y los modelos presenta una tasa mayor de EWL que las ranas vivas.

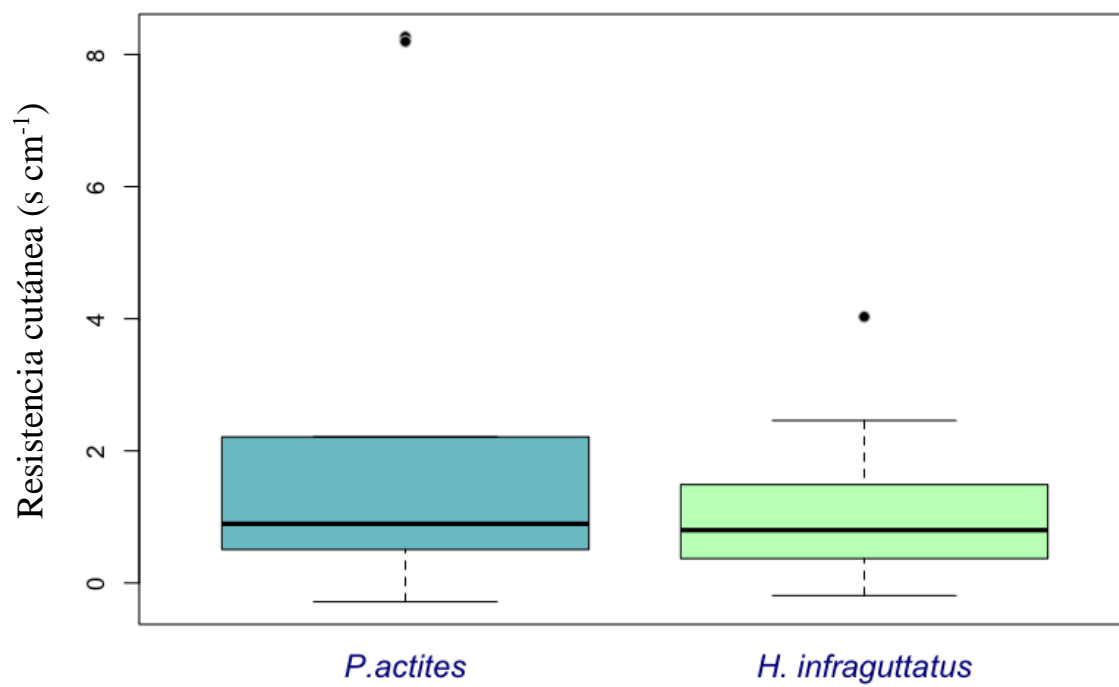


Figura 7. Resistencia cutánea a la pérdida de agua por evapotranspiración. *P. actites* presenta una resistencia mayor 2.22 s cm⁻¹ en comparación con *H. infraguttatus* 1.05 s cm⁻¹

11. TABLAS

Tabla 1. Masa y medidas corporales de los individuos vivos y modelos de agar.

<i>Pristimantis actites</i>	Masa	SVL	Wh	Wa	Ad
Rana	5.46 ± 7.15	36.58 ± 16.54	13.94 ± 7.64	16.07 ± 9.08	11.57 ± 4.98
Agar	4.35 ± 4.29	33.92 ± 10.85	12.85 ± 5.40	12.13 ± 3.36	10.39 ± 2.64
<i>Hyloxalus infraguttatus</i>					
Rana	1.02 ± 0.16	20.80 ± 1.43	7.34 ± 0.78	9.10 ± 1.33	8.38 ± 0.69
Agar	1.13 ± 0.06	19.75 ± 0.76	7.41 ± 0.23	9.94 ± 0.45	7.65 ± 0.22

Valores de la media y desviación estándar (\pm), para las medidas de masa, rostro-cloaca (SVL), Ancho de la cabeza (Wh), Ancho del abdomen (Wa) y Profundidad del abdomen(Ad).

Tabla 2. Tasas de pérdida de agua y valores de resistencia cutánea y capa borde para *Pristimantis actites*.

Rana					Modelo de agar				
Código	EWL (g h ⁻¹)	EWLsa (g cm ⁻² s ⁻¹)	EWLWCP (g cm ⁻² s ⁻¹)	Rc (s cm ⁻¹)	Código	EWL (g h ⁻¹)	EWLsa (g cm ⁻² s ⁻¹)	EWLWCP (g cm ⁻² s ⁻¹)	Rb (s cm ⁻¹)
Prisacti1	0.18	3.29E-06	0.00E+00	NA	Prisacti1_a	0.36	6.39E-06	1.20E-06	0.445
Prisacti2	0.08	4.25E-06	3.35E-06	0.507	Prisacti2_a	0.1	5.22E-06	2.79E-06	1.187
Prisacti3	0.09	3.52E-06	2.39E-06	0.712	Prisacti3_a	0.18	5.84E-06	1.65E-06	0.979
Prisacti4	0.08	4.21E-06	2.78E-06	1.059	Prisacti4_a	0.06	3.11E-06	2.50E-06	1.875
Prisacti5	0.09	4.41E-06	2.18E-06	2.212	Prisacti5_a	0.16	7.53E-06	3.06E-06	0.419
Prisacti7	0.27	1.99E-06	4.28E-06	8.267	Prisacti7_a	0.36	3.85E-06	2.15E-06	1.089
Prisacti8	0.43	4.10E-06	5.01E-06	8.197	Prisacti8_a	0.34	3.51E-06	2.02E-06	1.02
Prisacti11	0.12	2.90E-06	1.55E-06	0.926	Prisacti11_a	0.12	2.81E-06	1.30E-06	1.717
Prisacti12	0.13	2.83E-06	1.60E-06	-0.284	Prisacti12_a	0.54	1.15E-06	1.50E-06	0.247
Prisacti13	0.18	3.30E-06	1.31E-06	0.866	Prisacti13_a	0.44	7.57E-06	1.25E-06	0.323

Valores de la tasa de pérdida de agua bruta (EWL), ajustada (EWLsa) y en posición de conservación de agua (EWLwcp); además la resistencia cutánea (Rc) para los individuos vivos y Resistencia de capa borde (Rb) para los modelos de agar.

Tabla 3. Tasas de pérdida de agua y valores de resistencia cutánea y capa borde para *Hyloxalus infraguttatus*.

Código	Rana				Código	Modelo de agar			
	EWL (g h ⁻¹)	EWLSa (g cm ⁻² s ⁻¹)	EWLWCP (g cm ⁻² s ⁻¹)	Rc (s cm ⁻¹)		EWL (g h ⁻¹)	EWLSa (g cm ⁻² s ⁻¹)	EWLWCP (g cm ⁻² s ⁻¹)	Rb (s cm ⁻¹)
Hyloinfr1	0.08	2.09E-06	3.82E-06	-0.19	Hyloinfr1_a	0.08	3.14E-06	1.63E-06	2.08
Hyloinfr2	0.1	2.14E-06	3.87E-06	0.78	Hyloinfr2_a	0.12	4.76E-06	1.61E-06	1.73
Hyloinfr3	0.13	2.79E-06	5.06E-06	1.49	Hyloinfr3_a	0.08	3.19E-06	1.62E-06	2.17
Hyloinfr4	0.1	1.99E-06	3.60E-06	2.46	Hyloinfr4_a	0.08	2.97E-06	1.57E-06	2.5
Hyloinfr5	0.08	1.91E-06	3.47E-06	0.75	Hyloinfr5_a	0.08	3.11E-06	2.21E-06	1.23
Hyloinfr6	0.09	2.04E-06	3.71E-06	0.37	Hyloinfr6_a	0.08	3.19E-06	1.70E-06	2.46
Hyloinfr7	0.07	1.59E-06	2.90E-06	1.39	Hyloinfr7_a	0.14	5.35E-06	1.89E-06	1.13
Hyloinfr8	0.09	2.31E-06	4.20E-06	4.03	Hyloinfr8_a	0.08	3.31E-06	1.91E-06	1.98
Hyloinfr14	0.08	1.78E-06	3.24E-06	0.82	Hyloinfr14_a	0.12	4.63E-06	1.87E-06	1.48
Hyloinfr15	0.09	2.22E-06	4.04E-06	-0.03	Hyloinfr15_a	0.12	4.84E-06	2.28E-06	1.09

Valores de la tasa de pérdida de agua bruta (EWL), ajustada (EWLSa), cuando se mantuvo sentada (las ranas vivas no adquirieron WCP), además la resistencia cutánea (Rc) para los individuos vivos y resistencia de capa borde (Rb) para los modelos de agar.

Tabla 4. Información ecológica y de muestreo de *Pristimantis actites* registrados en la reserva Río Guajalito (Santo Domingo de los Tsáchilas).

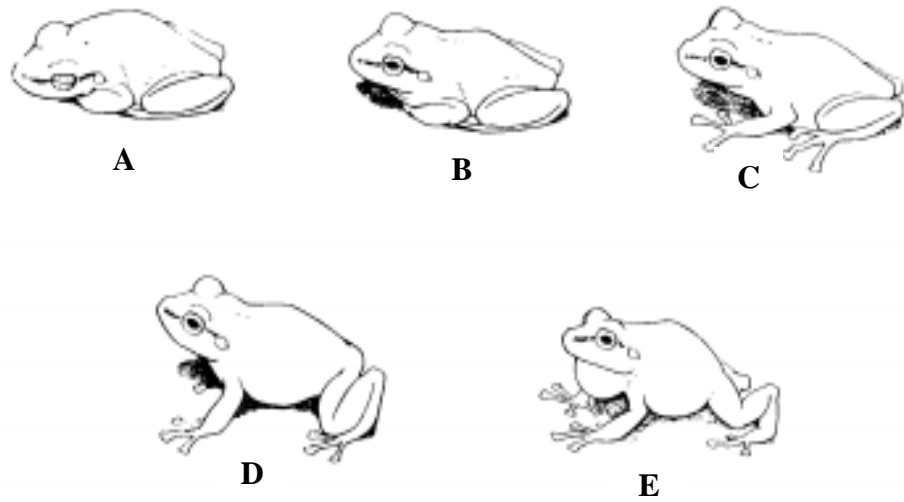
Latitud	Longitud	Altitud	Hora de muestreo	Datos ecológicos	Sexo
S -0.23697	O -78.81550	1822m	1:51	En el suelo del sendero	Hembra adulta
S -0.24015	O -78.81223	1836m	23:07	En el suelo, sobre hojarasca	Hembra adulta
S -0.2320	O -78.81915	1813m	1:25	En rama a 60cm del suelo, en el borde del sendero	Macho adulto
S -0.2270	O -78.8234	1785m	21:12	En una hierba a 50cmdel suelo, margen del río (Potrero)	Hembra subadulta
S -0.2356	O -78.81606	1827m	0:30	En una hoja a 15cm del suelo (Pared filtrando el agua)	Hembra subadulta
S -0.24041	O -78.74260	1917m	20:40	Perchado sobre vegetación herbácea, a 2m del río	Hembra subadulta
S -0.24482	O -78.80900	1824m	20:38	Perchado en una hierba a 40 cm del suelo	Macho subadulto
S -0.24352	O -78.74235	1973m	22:30	Perchado sobre musgo y hojarasca a un lado del sendero (Bosque secundario)	Hembra subadulta
S -0.24352	O -78.74235	1973m	22:40	Perchado sobre vegetación herbácea, a 10cm del suelo (Bosque secundario)	Hembra subadulta
S -0.24352	O -78.74235	1973m	22:35	Activo sobre la hojarasca, al borde del río (Bosque secundario)	Hembra subadulta
S -0.24274	O -78.81149	1854m	21:57	Perchado sobre un helecho a 10 cm del suelo	Hembra subadulta
S -0.2319	O -78.8199	1799m	23:41	A 2m de suelo activo y alerta	Hembra subadulta

Tabla 5. Información ecológica y de muestreo de *Hyloxalus infraguttatus* en Manglares-Churute (Guayas).

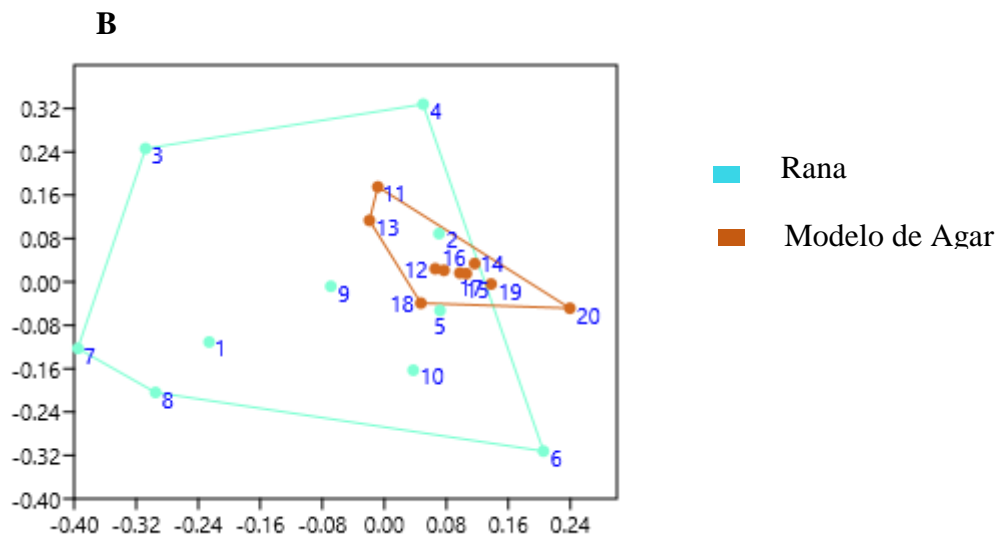
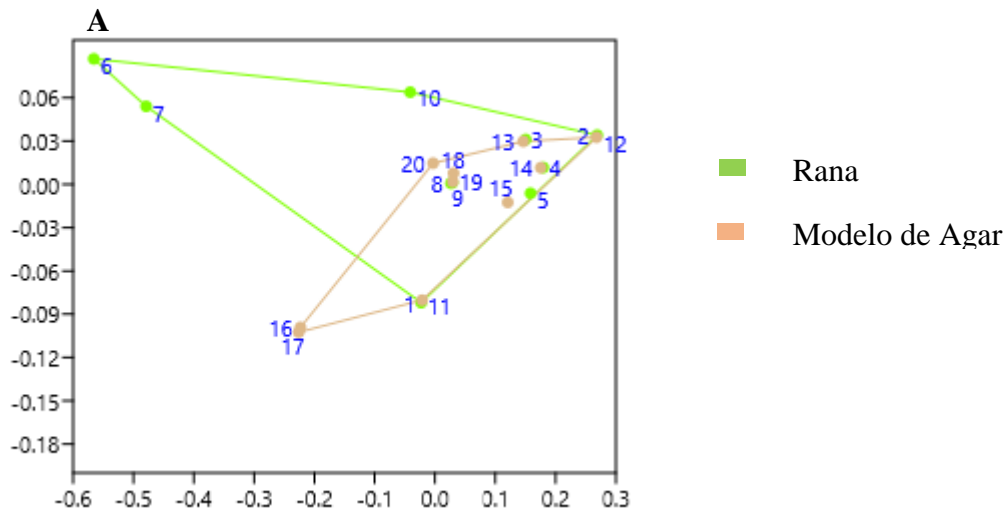
Latitud	Longitud	Altitud	Hora de muestreo	Datos ecológicos	Sexo
S -2.41900	O - 79.65022	43m	22:30	Sobre hojarasca, al borde de la quebrada	Hembra adulta
S -2.41900	O - 79.65022	43m	14:30	Sobre hojarasca, entre rocas al borde de la quebrada	Hembra adulta
S -2.41900	O - 79.65022	43m	15:00	Sendero Aulladores, cerro Pancho diablo	Hembra adulta
S -2.39841	O -79.64620	163m	22:32	Sobre hojarasca, junto a tronco caído	Hembra adulta
S -2.39841	O -79.64620	163m	21:46	Sobre una roca, al borde de la quebrada	Hembra adulta
S -2.73505	O -79.62734	178m	21:39	Sobre una roca, al borde del río	Hembra adulta
S -2.41900	O - 79.65022	43m	15:15	Sendero Aulladores, cerro Pancho diablo	Hembra adulta
S -2.41900	O - 79.65022	43m	15:35	Sendero Aulladores, cerro Pancho diablo	Hembra adulta
S -2.39841	O -79.64620	163m	22:01	Sobre una roca, al borde dela quebrada	Hembra adulta
S -2.41900	O - 79.65022	43m	16:00	Sendero Aulladores, cerro Pancho diablo	Hembra adulta
S -2.39841	O -79.64620	163m	22:38	Sobre hojarasca, junto a poza pequeña	Hembra adulta
S -2.39841	O -79.64620	163m	21:55	Sobre hojarasca, al borde de la quebrada	Hembra adulta

12. ANEXOS

Anexo 1. Posturas de las ranas durante la experimentación. A) Posición de conservación de agua, B) Posición de conservación de agua con el mentón levantado, C) Alerta baja, D) Alerta alta, E) Alerta muy alta (Pough et al., 1983).



Anexo 2. Escalamiento multidimensional no métrico (NDMS). A) *Pristimantis actites*, B) *Hyloxalus infraguttatus*, donde nos ilustra si existe o no correlación entre las medidas de las ranas vivas con las de los modelos de agar, de longitud rostro-cloaca, ancho de la cabeza, ancho del abdomen y profundidad del abdomen.



Anexo 3. Análisis de correlación (Rho de Spearman) de medidas corporales de *P. actites* e *Hyloxalus infraguttatus*.

<i>P. actites</i>	Rho de Spearman	<i>H. infraguttatus</i>	Rho de Spearman
SVL	0.98	SVL	0.52
Wh	1	Wh	1
Wa	0.61	Wa	0.31
Ad	0.88	Ad	0.05

SVL= longitud rostro cloaca, Wh= ancho de la cabeza, Wa= ancho del abdomen, Ad= profundidad del abdomen. El coeficiente de correlación Spearman (ρ) nos muestra que cuando el valor es cercano a 1 está correlacionado y cuando es más cercano a cero, la correlación es más débil.

Anexo 4. Prueba de Normalidad Shapiro Wilk para las tasas de pérdida de agua.

Ranas vivas		
	<i>Pristimantis actites</i>	<i>Hyloxalus infraguttatus</i>
EWL bruta	0.007	0.058
EWL Ajustada	0.681	0.002
EWL WCP	0.561	0.976
Modelos de agar		
EWL bruta	0.401	0.002
EWL Ajustada	0.669	0.012
EWL WCP	0.318	0.088

Shapiro-Wilk $p > 0.05$ indica una distribución normal; $p < 0.05$ no presenta distribución normal. EWL = Tasa de pérdida de agua por evapotranspiración, WCP = Postura de conservación de agua.

Anexo 5. Análisis de Mann Whitney Wilcoxon para las tasas de pérdida de agua bruta y ajustada entre especies.

Especie	EWL			EWLSa		
	(gh ⁻¹)	V	<i>p</i>	(g cm ⁻² s ⁻¹)	V	<i>p</i>
<i>P. actites</i>	0.165	66	0.03*	3.42E-06	65	0.04*
<i>H. infraguttatus</i>	0.091			4.69E-06		

EWL (Tasa de pérdida de agua bruta) y EWLSa (tasa de pérdida de agua ajustada),
*representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Anexo 6. Prueba *t* de student para las tasas de pérdida de agua en posición de conservación de agua (*P. actites*) y sentada (*H. infraguttatus*).

Tasas de pérdida de agua						
	Tratamientos	N	Mean	df	<i>t</i>	<i>p</i>
EWL						
WCP	<i>P. actites</i>	12	2.28E-06	16.58	-2.88	0.01 **
EWL	<i>H.</i>					
Sentada	<i>infraguttatus</i>	12	3.59E-06			

(**) $p < 0.01$

Anexo 7. Análisis de Mann Whitney Wilcoxon para la resistencia cutánea entre *P. actites* e *H. infraguttatus*.

Especie	<i>Ri</i> (s cm⁻¹)	V	<i>p</i>
<i>P. actites</i>	0.165	66	0.03*
<i>H. infraguttatus</i>	0.091		

Ri = resistencia cutánea; (*) $p < 0.05$