



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

¿Cómo sobreviven los lagartos de Patagonia al frío extremo? El caso de *Liolaemus pictus* y *Liolaemus lineomaculatus*

Tesis para obtener el título de Doctor en Biología

Biól. Nicolás R. Cecchetto

Directora: Dra. Nora R. Ibargüengoytía

Co-directora: Dra. Susana M. Medina

2021

En hábitats templados, polares y montañosos, los ectotermos deben pasar gran parte de su vida haciendo frente a los desafíos relacionados con temperaturas bajo cero; e incluso cuando las temperaturas son superiores a 0°C, el clima frío puede tener un efecto negativo en los umbrales de actividad y el rendimiento locomotor. Lagartos que habitan estos ambientes pueden responder a las bajas temperaturas de manera fisiológica, comportamental o mediante una combinación de ambas.

La respuesta fisiológica puede estar dada por mecanismos como la tolerancia al congelamiento o la evitación del congelamiento (por superenfriamiento). Mientras tanto, comportamentalmente, los lagartos pueden desplazarse hacia ambientes con climas más favorables, o elegir microambientes adecuados donde pasar los meses más fríos hasta reiniciar la actividad. Poblaciones de una misma especie que viven en entornos con climas diferentes pueden desarrollar distintas capacidades de resistencia al frío y de rendimiento locomotor, incluso si la separación geográfica (como en latitud o elevación) no es grande. No obstante, las diferencias climáticas entre las poblaciones pueden no representar precisamente lo que los lagartos experimentan en el micrositio donde eligen pasar los meses más fríos y los momentos de inactividad.

En esta tesis, se evaluó la resistencia al frío de dos especies de lagarto de Patagonia, *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* (Liolaemidae) a través de mecanismos fisiológicos y ecológicos. Con *L. pictus* se trabajó con dos poblaciones: en un **bosque de baja elevación** (700 msnm, San Carlos de Bariloche, provincia de Río Negro) y en un **bosque de mediana elevación** (1100 msnm, en Esquel, provincia de Chubut); mientras que con *L. lineomaculatus* se trabajó con una población localizada en una **estepa de alta elevación** (1800 msnm, en Esquel, provincia de Chubut) y otra población en una **estepa de alta latitud** (450 msnm, en Calafate, provincia de Santa Cruz).

Para poder evaluar la resistencia al frío y conocer las temperaturas mínimas y tasas de enfriamiento a la cuales están normalmente expuestas las lagartijas, se colocaron modelos de lagartijas conectados a *data-loggers* en potenciales refugios en los sitios de muestreo a lo largo de un año. La información obtenida fue analizada y comparada, evaluando la importancia ecológica de distintos tipos de refugio para cada uno de los ambientes. Se capturaron individuos en esos sitios de muestreo y se realizaron experimentos de tolerancia al frío, exponiendo a las lagartijas a temperaturas bajo cero con tasas de enfriamiento

controladas (basando tanto las tasas como las temperaturas mínimas en los valores iii obtenidos por los *data-loggers*). Luego, se realizaron análisis bioquímicos de los compuestos en sangre que podrían estar utilizando si fueran capaces de tolerar el congelamiento o evitarlo por superenfriamiento, comparando entre controles y tratamiento. Por otro lado, con otros individuos de *L. lineomaculatus* se realizaron pruebas de rendimiento locomotor, haciendo correr a las lagartijas a distintas temperaturas, con énfasis en temperaturas bajas, para poder evaluar y comparar entre poblaciones las distintas capacidades de desplazamiento y su posible asociación con el régimen térmico en el que vive cada población. Se dividieron las carreras en un componente de 0,15 m y un componente de 1,15 m.

En términos generales, del análisis del perfil térmico de refugios potenciales se observó que la elección de refugios adecuados podría permitir a los lagartos *Liolaemus pictus* pasar los meses más fríos en bosques de baja y mediana elevación sin recurrir a mecanismos fisiológicos como la tolerancia al congelamiento o el superenfriamiento. Por otro lado, los sitios de las poblaciones de *L. lineomaculatus* en estepas de alta latitud y elevación estuvieron expuestos a menores temperaturas y por mayor cantidad de tiempo que los sitios de *L. pictus*. Las poblaciones de *L. lineomaculatus* podrían pasar gran parte de los meses más fríos refugiados en condiciones relativamente estables, pero los datos obtenidos revelaron la ocurrencia de heladas ocasionales que podrían inducir a las especies a desarrollar mecanismos fisiológicos complementarios para poder sobrevivir. En todos los ambientes analizados se encontraron importantes diferencias térmicas entre potenciales refugios, a centímetros o metros de distancia entre sí. Los refugios adecuados pueden dar a los individuos una ventaja ecológica en las estaciones frías, cuando podrían ocurrir algunos días calurosos intermitentes, permitiéndoles así reanudar la actividad cuando otras especies pueden todavía estar en torpor.

Los análisis bioquímicos revelaron que en ambas especies el único compuesto que mostró diferencias de concentración en sangre por la exposición a temperaturas bajo cero fue la glucosa, que tendió a aumentar en los individuos enfriados y a disminuir en los individuos control. A pesar de no haber encontrado compuestos bioquímicos que cambien de concentración de manera ecológicamente significativa por la exposición a bajas temperaturas, *Liolaemus pictus* tiene un punto de superenfriamiento (donde una reacción exotérmica indica congelamiento) considerablemente bajo, similar al de *L. lineomaculatus* (-5,3°C para *L. pictus*; -5,8°C para *L. lineomaculatus* de Esquel y -7,5°C *L. lineomaculatus* de Calafate), a pesar de habitar ambientes con un régimen de temperatura menos frío.

Finalmente, de la comparación de las capacidades de rendimiento locomotor entre las poblaciones de *Liolaemus lineomaculatus*, los análisis de las curvas de rendimiento térmico (TPC por *termal performance curve*) mostraron curvas muy similares entre ambas poblaciones. En relación a las diferencias ambientales que se encontraron entre ambos sitios, se pudo observar una mayor amplitud de tolerancia térmica en la población de Esquel con respecto a la de Calafate y una forma marginalmente diferente de las curvas de rendimiento térmico en las carreras de 0,15 m, en donde la población de Calafate mostró una disminución exponencial más pronunciada que la de Esquel para valores de temperatura por encima de la T_{opt} .

Liolaemus pictus y *L. lineomaculatus* presentan estrategias comportamentales vinculadas al uso de refugios, a la termorregulación y a la locomoción que, en conjunto con respuestas fisiológicas, les posibilitan sobrevivir a las temperaturas ambientales bajo cero que ocurren en los bosques de baja y mediana elevación y en las estepas de alta latitud y elevación de la Patagonia. Esta tesis proporciona valiosa información sobre la interacción dinámica entre las estrategias ecológicas y los mecanismos fisiológicos que los animales deben equilibrar para sobrevivir a ambientes fríos y templados.

Abstract

v

In temperate, polar and mountainous habitats, ectotherms must spend much of their lives coping with the challenges associated with freezing temperatures; and even when temperatures are above 0°C, cold weather can have a negative effect on activity thresholds and locomotor performance. Lizards inhabiting these environments may respond to low temperatures physiologically, behaviorally, or by a combination of both.

The physiological response may be through mechanisms such as freezing tolerance or freeze avoidance (supercooling). Meanwhile, behaviorally, lizards may move to environments with more favorable climates, or choose appropriate microenvironments where they can spend the colder months until they resume activity. Populations of the same species living in environments with different climates may develop different cold hardiness and locomotor performance capabilities, even if the geographic separation (such as in latitude or elevation) is not great. However, climatic differences between populations may not represent precisely what lizards experience in the microsite where they choose to spend the coldest months and times of inactivity.

In this thesis, I studied the cold hardiness of two Patagonian lizard species, *Liolaemus pictus* and *L. lineomaculatus* (Liolaemidae) through physiological and ecological mechanisms. With *L. pictus*, I worked with two populations: in a low elevation forest (700 masl, San Carlos de Bariloche, Río Negro province) and in a medium elevation forest (1100 masl, in Esquel, Chubut province); while with *L. lineomaculatus* I worked with a population located in a high elevation steppe (1800 masl, in Esquel, Chubut province) and another population in a high latitude steppe (450 masl, in Calafate, Santa Cruz province).

In order to study cold resistance and to know the minimum temperatures and cooling rates to which lizards are normally exposed, we placed lizard models connected to data-loggers in potential refuges at the sampling sites over the course of a year. The information obtained was analyzed and compared, assessing the ecological importance of different types of refuges for each of the environments. I captured individuals at these sampling sites and conducted cold tolerance experiments, exposing lizards to sub-zero temperatures at controlled cooling rates (basing both rates and minimum temperatures on values obtained by data-loggers). I then performed biochemical analyses of the compounds in blood that they might be using if they were able to tolerate freezing or avoid it by supercooling, comparing between controls and treatment. On the other hand, with other individuals of *L. lineomaculatus* I performed locomotor

performance tests, making the lizards run at different temperatures, with emphasis on vi low temperatures, in order to evaluate and compare between populations the different displacement capacities and their possible association with the thermal regime in which each population lives. I divided the runs into a 0.15 m component and a 1.15 m component.

Overall, from the analysis of the thermal profile of potential refuges, I observed that the choice of suitable refuges could allow *Liolaemus pictus* lizards to spend the coldest months in low and medium elevation forests without resorting to physiological mechanisms such as freezing tolerance or supercooling. On the other hand, *L. lineomaculatus* population sites in high latitude and high elevation steppes were exposed to lower temperatures and for greater amounts of time than *L. pictus* sites. *L. lineomaculatus* populations could spend much of the colder months sheltered in relatively stable conditions, but the data obtained revealed the occurrence of occasional frosts that could induce the species to develop complementary physiological mechanisms in order to survive. In all the environments analyzed, I found important thermal differences between potential refuges, centimeters or meters apart. Appropriate refuges may give individuals an ecological advantage in cold seasons, when intermittent warm days may occur, allowing them to resume activity when other species may still be suffering in torpor.

Biochemical analyses revealed that in both species the only compound that showed differences in blood concentration due to exposure to freezing temperatures was glucose, which tended to increase in the cooled individuals and decrease in the control individuals. Despite not finding ecologically significant changes in the concentration of biochemical after exposure to low temperatures, *L. pictus* has a considerably low supercooling point (where an exothermic reaction indicates freezing), similar to that of *L. lineomaculatus* (-5.3°C for *L. pictus*; -5.8°C for *L. lineomaculatus* from Esquel and -7.5°C *L. lineomaculatus* from Calafate), despite inhabiting environments with a less cold temperature regime.

Finally, from the comparison of locomotor performance capabilities between *L. lineomaculatus* populations, the analysis of thermal performance curves (TPC for thermal performance curve) showed very similar curves between both populations. In relation to the environmental differences I found between sites, we were able to observe a greater thermal tolerance amplitude in the Esquel population with respect to the Calafate population and a marginally different shape of the thermal performance curves in the 0.15 m runs, where the Calafate population showed a steeper exponential decrease than the Esquel population for temperature values above the T_{opt} .

Liolaemus pictus and *L. lineomaculatus* exhibit behavioral strategies linked to refuge use, thermoregulation and locomotion that, in conjunction with physiological responses, enable them to survive the sub-zero environmental temperatures that occur in the low and medium elevation forests and high latitude and high elevation steppes of Patagonia. This thesis provides valuable information on the dynamic interaction between ecological strategies and physiological mechanisms that animals must balance to survive cold and temperate environments.

Índice

Introducción general.....	1
Objetivo General	6
Hipótesis generales.....	6
Estructura de la tesis.....	7
Figuras	9
Capítulo I: ¿Qué es frío para una lagartija? Análisis de potenciales refugios.....	11
Introducción	12
Materiales y métodos	14
Resultados	19
Discusión.....	22
Figuras y tablas	27
Material suplementario.....	39
Capítulo II: Respuestas fisiológicas al frío en <i>Liolaemus pictus</i> y <i>Liolaemus lineomaculatus</i> 41	
Introducción	42
Materiales y métodos	45
Resultados	54
Discusión.....	57
Figuras y tablas	63
Material Suplementario	73
Capítulo III: Capacidad de locomoción a bajas temperaturas.....	76
Introducción	77
Materiales y métodos	80
Resultados	83
Discusión.....	85
Figuras y tablas	91
Material Suplementario	96
Conclusiones y discusión general	102
Bibliografía general.....	108
Agradecimientos.....	130
Artículos de respaldo.....	131

Introducción general

Los ambientes con climas templado-fríos presentan restricciones térmicas que influyen en los tiempos de actividad, ecología, fisiología y el comportamiento de los ectotermos (Cowles & Bogert 1944), afectando diversos rasgos de la historia de vida tales como la fecundidad, el modo reproductivo (ovíparo o vivíparo), el crecimiento, la longevidad, la alimentación y la capacidad de almacenamiento de energía (Vitt & Caldwell 2014). Estas restricciones se tornan más pronunciadas hacia los polos, volviéndose fundamental para la supervivencia de las especies la coordinación del ciclo de vida con el climático, así como las adaptaciones fisiológicas que les permitan sobrevivir a las bajas temperaturas invernales (Shuter & Post 1990).

En este sentido, la supervivencia de ectotermos como los reptiles dependerá de la capacidad para responder comportamental y fisiológicamente, no sólo a las restricciones ambientales durante el tiempo de actividad, sino a las bajas temperaturas invernales, que pueden durar más de cinco meses cada año (Storey & Storey 1996; Piantoni et al. 2006; Gutiérrez et al. 2010). En climas templados y fríos, los reptiles pasan los meses más fríos del año en un estado de torpor denominado brumación, en el cual reducen su gasto energético al mínimo, dejando que la temperatura corporal disminuya y se deprima el metabolismo (Gavaud 1983). En algunas especies como *Hoplodactylus maculatus*, *Sceloporus occidentalis* y *S. variabilis*, existe además aclimatización a las bajas temperaturas, que permite a estos lagartos realizar un ajuste fisiológico previo al período de brumación a medida que se acercan las épocas de bajas temperaturas (Tsuji 1988; Tocher & Davison 1996).

La elección de microambientes también cumple un rol fundamental en la supervivencia a las bajas temperaturas, dado que podría evitar o aminorar los grandes costos energéticos implicados en las adaptaciones fisiológicas relacionadas con las temperaturas bajo cero, como la tolerancia al congelamiento o el superenfriamiento (Costanzo 2011; Berman et al. 2016). Si bien los reptiles presentan, como los mamíferos, control hipotalámico de la temperatura corporal, en reptiles la posibilidad de alcanzar las temperaturas adecuadas dependerá de las posibilidades de termorregular en función de la heterogeneidad ambiental que les permita asolearse o refugiarse. Así, los lagartos pueden, por medio del comportamiento, mantener su temperatura dentro de un rango de referencia denominado “set-point hipotalámico” (Hertz et al. 1993) manteniendo, en muchos casos, su temperatura corporal dentro de un rango estrecho (Medina et al. 2011), comparable al logrado por un

mamífero (Nelson et al. 1984). En invierno, debido a la reducción del metabolismo, los lagartos sólo podrían mantener un rango de temperaturas eligiendo refugios donde las temperaturas no descieran hasta valores letales o evitando la exposición al hielo (Costanzo et al. 1995a; Storey & Storey 1996). Sin embargo, durante las primeras heladas de otoño e invierno en ambientes de gran elevación o latitud, el riesgo de perecer por congelamiento parcial o total es alto, ya que incluso en un refugio adecuado las temperaturas pueden llegar a valores bajo cero (Costanzo & Lee 1995; Storey & Storey 1996; Hill et al. 2004) y la supervivencia va a depender de las adaptaciones fisiológicas del animal para sobreponerse a las bajas temperaturas.

El congelamiento del agua en los tejidos puede generar un aumento de la concentración de solutos a niveles tóxicos, aumentando la presión osmótica en el interior celular y generando cambios de pH (Mazur 1984; Muldrew et al. 2004) y, a nivel de órganos, el hielo detiene la función respiratoria y cardíaca, dejando los tejidos isquémicos e hipóxicos (Packard & Packard 2004). Por otra parte, al descongelarse, los animales pueden sufrir estrés oxidativo, dado que en general consumen sus reservas de energía durante el invierno (Murphy 1983). Numerosas especies de serpientes y lagartos poseen moderada resistencia a congelamientos superficiales que no llegan al núcleo corporal, pero sufren consecuencias asociadas que pueden ser letales (Lowe et al. 1971; Storey 2006). Las consecuencias más graves que pueden surgir luego de un congelamiento parcial corresponden a un conjunto de lesiones celulares que se traducen en deficiencias en el funcionamiento de los órganos, llevando a la muerte debido a una severa discordancia muscular que impide la locomoción (Lowe et al. 1971). El tejido nervioso es muy sensible al stress por congelamiento (Bakhach 2009) y la lesión puede evidenciarse en el comportamiento a través de problemas funcionales como el letargo, falta de estímulo por tacto y ausencia de algunas respuestas reflejas (Costanzo et al. 1995c; Burke et al. 2002). El grado de daño neurológico dependerá del tiempo y grado de exposición al frío que haya sufrido el animal, y de sus capacidades intrínsecas (Costanzo et al. 2008).

De esta manera, las adaptaciones fisiológicas, bioquímicas y biofísicas a las temperaturas extremadamente bajas permiten resistir disminuciones en la temperatura corporal por debajo del punto de congelación de los líquidos corporales, y pueden integrarse en dos tipos de respuestas, “evitación del congelamiento” y “tolerancia al congelamiento” (Storey & Storey 2017). En la “evitación del congelamiento” los animales, independientemente de las disminuciones en la temperatura externa, mantienen en estado

líquido sus fluidos corporales incluso a temperaturas muy bajas mediante un mecanismo denominado “superenfriamiento”, que permite la continuidad de los procesos metabólicos (Lowe et al. 1971; Costanzo & Lee 1995). No obstante, el estado de superenfriamiento es sumamente inestable, ya que la probabilidad de congelamiento espontáneo de una solución aumenta a medida que disminuye la temperatura, y ante la presencia de centros de nucleación de cristales de hielo (Storey & Storey 1996; Costanzo et al. 2008). El superenfriamiento es principalmente eficiente a temperaturas congelantes menos extremas (ya que para estabilizar el estado líquido, los animales deben evitar principalmente el contacto con agentes externos que promuevan la nucleación de cristales y posibiliten el congelamiento por inoculación) y en el caso de animales de pequeño tamaño, dado que al aumentar el volumen aumentan también las probabilidades de un inicio de cristalización en algún punto del cuerpo (Costanzo et al. 2008). Entre las adaptaciones utilizadas por los ectotermos para disminuir su punto de enfriamiento se encuentran la incorporación en sangre de proteínas anticongelantes y/o compuestos crioprotectores como glucosa, urea y diferentes aminoácidos, la deshidratación, y el camuflar o eliminar los centros de nucleación de cristales de hielo (Storey & Storey 1996). Estos centros de nucleación de cristales de hielo (o INA, por *Ice Nucleating Agents*) actúan orientando las moléculas de agua en una configuración geométrica que favorece el crecimiento o la formación de cristales de hielo (Vali 1996).

La “tolerancia al congelamiento” en ectotermos se caracteriza por el mantenimiento del citoplasma de las células en estado líquido, permitiendo la formación de hielo en el compartimiento extracelular, evitando así el choque osmótico por formación de cristales y la posterior ruptura de las organelas y membranas celulares (Storey & Storey 1996). La supervivencia durante la tolerancia al congelamiento depende de la proporción de agua corporal que se congele, determinada a su vez por la osmolaridad de los fluidos corporales. Se establece que un animal es tolerante al congelamiento si puede sobrevivir al congelamiento y descongelamiento de una cantidad de líquido corporal biológica y ecológicamente significativa, bajo condiciones térmicas y durante períodos que simulen su exposición a bajas temperaturas en la naturaleza (Baust 1991). Las adaptaciones relacionadas con la tolerancia al congelamiento incluyen el control de los eventos de formación de núcleos de hielo (por control de la localización de INAs), manejo de la redistribución de agua y solutos, hipometabolismo, regulación de sistemas de defensa anti-oxidantes, y expresión de genes relacionados con la homeostasis y la reparación somática (Mazur 2004; Yancey 2005). En vertebrados, la tolerancia al congelamiento se ha estudiado en anfibios anuros y caudados, en serpientes, en lagartos y en tortugas (Hill et al. 2004; Storey 2006). El lagarto común europeo

Zootoca vivípara presenta un nivel de tolerancia al congelamiento de relevancia ecológica, dado que puede sobrevivir con el 50% de su líquido corporal congelado por al menos 24 horas (Voituron et al. 2002b). Aunque la mayoría de las especies de climas templados o fríos utilizan bien la tolerancia o bien la evitación del congelamiento, algunas especies pueden elegir cuál de las dos emplear, recurriendo a la que resulte más eficiente ante las condiciones fisiológicas y ambientales (Costanzo et al. 2008).

Las poblaciones que enfrentan diferentes intensidades de clima frío pueden presentar diferentes adaptaciones ecofisiológicas (Mathies & Andrews 1995; Ibargiengoytía & Cussac 1998; Olsson & Shine 1999), comportamentales (Castilla et al. 1999), o ambas, ligadas a la supervivencia en esos ambientes extremos. La dependencia termodinámica de las funciones fisiológicas implica que dichas funciones van a fluctuar con las variaciones ambientales, a menos que respuestas fisiológicas y ecológicas amortigüen dicho efecto o que la temperatura corporal sea regulada independientemente de la ambiental (Costanzo 2011; Bowker et al. 2013). En muchas especies se ha observado la capacidad de generar cambios reversibles a corto plazo en las funciones fisiológicas relacionadas con la supervivencia al frío (Seebacher 2005) y que la distribución altitudinal o latitudinal puede afectar las capacidades y patrones de estas adaptaciones reversibles (Tsuji 1988; Tocher & Davison 1996).

La capacidad de supervivencia a las inclemencias climáticas en ambientes con climas templado-fríos estará dada también por la posibilidad de ajustar las curvas de rendimiento locomotor según las temperaturas ambientales. El rendimiento y la resistencia en la locomoción influyen directamente la adecuación de los individuos, dado que afectan la dispersión, las actividades de forrajeo, la posibilidad de evitar depredadores, así como los comportamientos relacionados con la dominancia social y la reproducción (Bennett 1980; Christian & Tracy 1981; Snell et al. 1988; Robson & Miles 2000; Perry et al. 2004). Por lo tanto, la locomoción es un parámetro sujeto a fuertes presiones de selección natural, y de gran interés para estudiar posibilidades de adaptación en gradientes con distintas temperaturas ambientales. Existen en la bibliografía estudios de respuestas comportamentales a temperaturas bajo cero (Costanzo et al. 1999; Weeks & Espinoza 2013), pero son muy escasos los trabajos donde se estudien respuestas fisiológicas a través del análisis de curvas de rendimiento locomotor a bajas temperaturas. Estas curvas pueden estar definidas por la temperatura óptima (T_{opt}), la amplitud térmica de rendimiento óptimo (B_{80} = amplitud de valores de temperatura corporal sobre el cual el lagarto puede correr a al menos 80% de su

velocidad máxima, B_{95} , V_{\max} = velocidad máxima), y las temperaturas críticas corporales máximas y mínimas (CT_{\max} y CT_{\min} , respectivamente; Huey et al. 2012).

5

El género *Liolaemus*, por su gran versatilidad para ocupar una amplia variedad de ambientes, ha conseguido sobrevivir en las mayores latitudes conocidas para lagartos en el hemisferio sur, como el caso de *L. magellanicus*, desde 49°S, 72°O (Santa Cruz) a 54°S, 68°O (Tierra del Fuego, Cei 1988; Scolaro 2005). Sin embargo, es muy poco lo que se conoce aún acerca de los mecanismos que utilizan las diversas especies de este género para sobrevivir a las grandes variaciones estacionales de la temperatura y, específicamente, a las bajas temperaturas del invierno. Los estudios se han limitado a la descripción de las temperaturas mínimas voluntarias y críticas que los lagartos pueden tolerar sin perjuicio para su integridad física (Espinoza & Tracy 1997; Ibargüengoytía 2005; Bonino et al. 2011). Estudios previos del Laboratorio de Ecofisiología e Historia de vida de Reptiles y otros autores muestran que el largo período de brumación que experimentan los reptiles en Patagonia reduce el período de actividad, afectando diversos aspectos de su historia de vida (Piantoni et al. 2006; Boretto & Ibargüengoytía 2009; Boretto et al. 2018). Por ejemplo, numerosas especies de lagartos presentan un crecimiento comparativamente lento y madurez sexual tardía (6-8 años, Piantoni et al. 2006; Gutiérrez et al. 2010; Kubisch et al. 2012). Algunas especies ajustan los tiempos de termorregulación (asoleo) y las principales fuentes de calor (tigmotermia vs. heliotermia) compensando de esta forma las bajas temperaturas ambientales y los cortos tiempos de actividad (Gutiérrez et al. 2010; Medina et al. 2012). En esta tesis se eligieron dos especies con un tamaño corporal similar, alopátricas, con diferencias sustanciales en los microambientes que habitan pero cuyas poblaciones son colindantes en parte de su distribución. Estudié dos poblaciones por especie localizadas en un gradiente altitudinal y latitudinal, con diferente rigurosidad ambiental, con temperaturas bajo cero por más de 90 días al año. *Liolaemus pictus* (Fig. 1.a) tiene amplia distribución en los Andes patagónicos de las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut de Argentina (39-43°S y 520-1600 msnm, Scolaro 2005), así como desde las costas de Chile central (~35°S) al Norte de la Patagonia de Chile, (~43°S), y se trabajará con una población de bosque de baja elevación en San Carlos de Bariloche y otra población en un ambiente más frío, situada en un bosque de mediana elevación cerca de Esquel. Mientras tanto, *L. lineomaculatus* (Fig. 1.b) se encuentra en los Andes del noroeste de la de Neuquén (39°S), en elevaciones de hasta 1800 msnm, llegando hasta la provincia de Santa Cruz (400 msnm 51°S; Cei 1988; Scolaro 2005) y se trabajará con una población de la estepa altoandina en Esquel y otra población en un ambiente más frío en una estepa de mayor latitud en Calafate. Estas especies comparten parte de su distribución,

viviendo en alopatría: *L. pictus* habita hasta el límite de la vegetación achaparrada, donde se encuentra *L. lineomaculatus* que, en cambio, no ingresa al bosque, y se encuentra en las cumbres, donde la vegetación es achaparrada y caracterizada por matas en cojín. Estos ambientes plantean una diferencia sustancial durante los meses más fríos del año, donde *L. pictus* tiene disponible como refugios los troncos caídos, arbustos y rocas del bosque, mientras que *L. lineomaculatus* no cuenta con refugios tan atemperados y tiene sólo disponibles roquedales, lajas y matas en cojín, es decir, está más expuesto a la nieve y las heladas.

Objetivo General

El objetivo de esta tesis es avanzar en el conocimiento de las adaptaciones ecológicas (como la variedad de potenciales refugios de invierno y sus características térmicas), termofisiológicas y bioquímicas asociadas al clima frío en especies de lagartos que habitan diferentes grados de rigurosidad climática en Patagonia, Argentina en función de la latitud y elevación. Para ello, se toman como modelo de estudio dos especies de liolaémidos: *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus*.

Hipótesis generales:

Hipótesis 1:

Los lagartos de climas fríos presentan respuestas ecológicas, fisiológicas o ambas que les permiten la supervivencia a temperaturas bajo 0°C presentes durante la mayor parte del invierno y esporádicamente en otoño y primavera.

Predicción 1:

Liolaemus pictus y *L. lineomaculatus* utilizan refugios (microhábitats) térmicos que reducen el riesgo de congelamiento y presentan, además, mecanismos fisiológicos, como la tolerancia al congelamiento y la capacidad de superenfriamiento, que les posibilitan sobrevivir a las bajas temperaturas del hábitat.

La variación en la temperatura ambiental asociada a gradientes altitudinales y latitudinales y a los tipos de potenciales refugios presentes afectan las respuestas ecológicas y fisiológicas de los lagartos resultando en diferencias interpoblacionales en cuanto a la capacidad de tolerancia al clima frío, donde las poblaciones de mayor elevación o latitud tendrán una mayor capacidad de tolerar el frío.

Predicción 2:

Las poblaciones de *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* de alta elevación o latitud muestran mayor capacidad de tolerancia al frío que las poblaciones de elevaciones o latitudes relativamente bajas, por lo que la temperatura de congelamiento, el CT_{min} , T_o y B_{80} disminuyen en función de la elevación o latitud.

Estructura de la tesis

Capítulo I

A través de *data-loggers* conectados a modelos de PVC simulando las propiedades de lagartijas (previamente calibrados para cada especie), se analizó la disponibilidad de temperaturas de potenciales refugios en los meses más fríos del año y potenciales refugios temporarios en la temporada activa para *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* en los sitios de captura utilizados en esta tesis, representando ambientes ecológicamente distintos.

Particularmente, se analizaron las temperaturas en potenciales refugios en un bosque de baja elevación, en San Carlos de Bariloche (41° 9' S, 71° 18' O; 780 msnm) y en un bosque de mediana elevación (42° 49' S, 71° 15' W; 1100 msnm) en una montaña en las cercanías de Esquel, donde se puede encontrar a *L. pictus*; y en la estepa altoandina de la misma montaña de Esquel (42° 49' S, 71° 15' W; 1800 msnm), y en una estepa a alta latitud, en Calafate (50° 15' S, 71° 29' W; 450 msnm; Fig. 2), donde se puede encontrar a *L. lineomaculatus*.

Se indagó la existencia de un patrón general o múltiples patrones de regímenes térmicos entre los sitios de muestreo en los potenciales refugios analizados durante el invierno y los momentos de inactividad intermitente en otoño / primavera para las lagartijas en los distintos ambientes estudiados. Para ello, se utilizó el concepto de grados-día, utilizando

distintos valores de referencia dependiendo de la época analizada, para poder realizar comparaciones directas de los regímenes térmicos entre los distintos sitios de muestreo.

8

Capítulo II

Se estudiaron las respuestas fisiológicas (y, particularmente, bioquímicas) de *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* a temperaturas bajo cero. Para ello, se utilizaron los valores obtenidos a campo previamente, exponiendo de esta manera a los individuos a valores mínimos de temperatura y tasas de enfriamiento que se relacionen con los que realmente experimentarían en invierno en sus respectivos sitios. Se obtuvieron para ambas especies los valores del “punto de superenfriamiento”, un parámetro que indica la temperatura a la cual los individuos de la especie se congelan. Se evaluó también si al menos alguna de las poblaciones de las dos especies analizadas tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas bajo cero por superenfriamiento, tolerancia total o parcial al congelamiento, o una combinación de ambas.

Finalmente, se estudió si hubo cambios en la concentración de metabolitos que, mediante una búsqueda bibliográfica, se encontraron asociados con la supervivencia a temperaturas bajo cero en especies de ambientes similares o más fríos (proteínas anticongelantes, urea, glucosa, lactato), indagando si alguna de las dos especies analizadas utilizaba alguno de estos metabolitos para sobrevivir los inviernos de Patagonia. Se compararon individuos enfriados con individuos controles y, para aquellos metabolitos que era posible, se compararon las concentraciones al principio y al finalizar los experimentos.

Capítulo III

Se realizó una comparación de las capacidades de rendimiento locomotor entre las poblaciones de *Liolaemus lineomaculatus*, una situada en la estepa altoandina en una montaña de Esquel, y la otra en una estepa en Calafate, a mayor latitud. Para ello, se realizaron carreras en un dispositivo que permitía medir la velocidad de las lagartijas a 8 temperaturas distintas, haciendo énfasis en temperaturas cercanas a los valores de temperatura crítica mínima (CT_{Min}) de cada población. Se obtuvieron también los valores de CT_{Min} y CT_{Max} , y con estos 10 valores de temperatura se construyeron curvas de rendimiento locomotor térmico. Estas curvas se construyeron utilizando modelos aditivos generalizados mixtos, que permitieron obtener curvas para cada población a partir de las curvas de rendimiento térmico individuales, considerando la variabilidad inter-individual.

Figuras

Figura 1. Especies analizadas a lo largo de esta tesis. A la izquierda, un individuo de *Liolaemus pictus* y a la derecha un individuo de *L. lineomaculatus*.

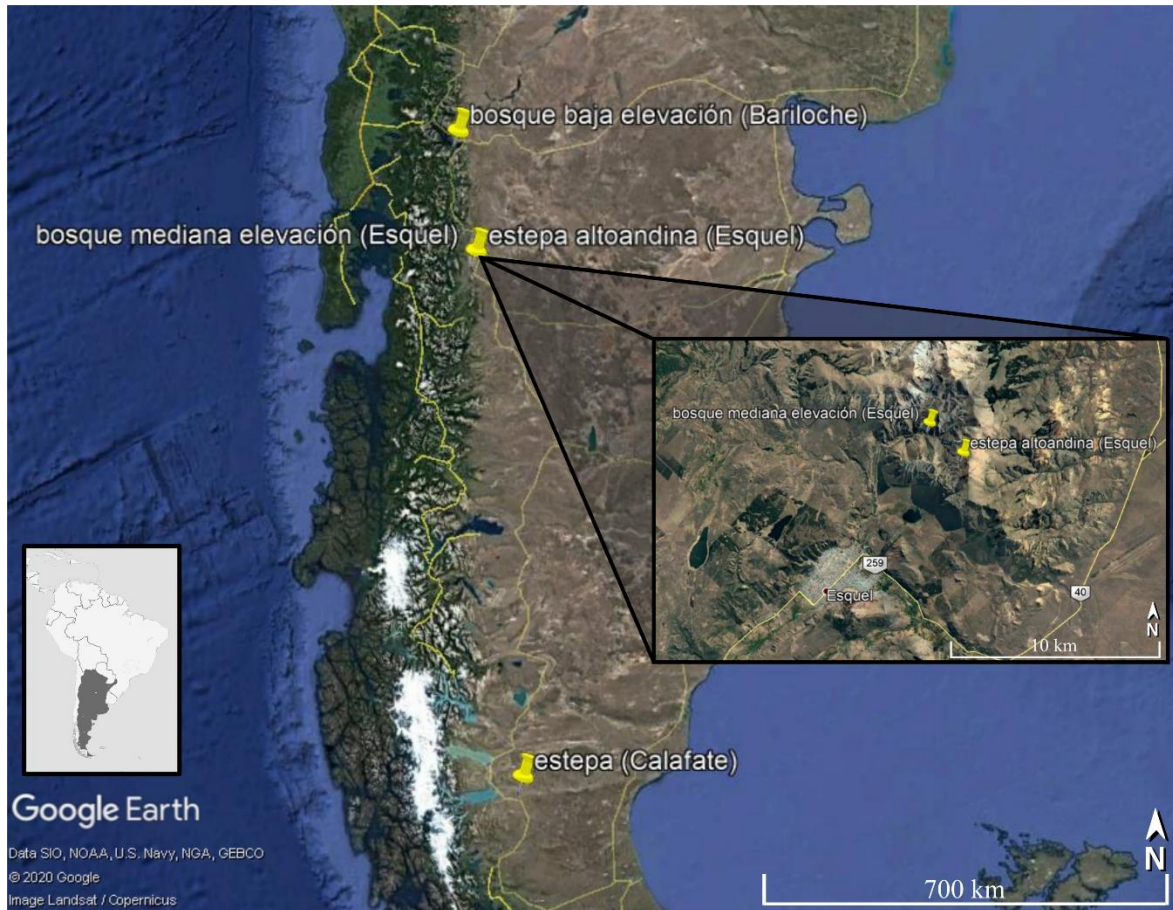


L.pictus



L.lineomaculatus

Figura 2. Mapa con los sitios de muestreo para los experimentos realizados durante esta tesis, representando dos sitios para *Liolaemus pictus* (**bosque a baja elevación**, en San Carlos de Bariloche, y **bosque a mediana elevación**, en una montaña cerca de Esquel) y dos sitios para *L. lineomaculatus* (**estepa altoandina**, en la misma montaña cerca de Esquel pero a mayor elevación, y en la **estepa** en las cercanías a la localidad de Calafate).



Capítulo I: ¿Qué es frío para una lagartija patagónica? Análisis de potenciales refugios

11

“En un agujero en el suelo, vivía una *lagartija*.”

J.R.R. Tolkien

Resultados parciales de este capítulo han sido publicados en:

- _Cecchetto, N. R., Medina, S. M., Taussig, S., & Ibarzüengoytía, N. R. (2019). The lizard abides: cold hardiness and winter refuges of *Liolaemus pictus argentinus* in Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Zoology*, 97(9), 773-782.
- _Cecchetto, N. R., Medina, S. M., & Ibarzüengoytía, N. R. (2020). Running performance with emphasis on low temperatures in a Patagonian lizard, *Liolaemus lineomaculatus*. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- _Cecchetto, N. R., Medina, S. M., Baudino, F., & Ibarzüengoytía, N. R. (en revisión). Wintertime tales, how the lizard *Liolaemus lineomaculatus* endures the temperate cold climate of Patagonia, Argentina.

Las temperaturas bajo cero son un peligroso desafío para la mayoría de los animales, y aún más para los ectotermos (Cowles & Bogert 1944); pocas especies de reptiles pueden soportar las duras condiciones de las altas latitudes y elevaciones, donde el paisaje está cubierto de nieve y las horas de luz diurna se reducen en los meses más fríos del año. Además, en el caso de los lagartos, el clima frío puede poner en riesgo la supervivencia de los individuos, incluso con temperaturas superiores a 0°C, ya que los animales pueden encontrarse con temperaturas lo suficientemente bajas como para obstaculizar su rendimiento físico, impidiéndoles escapar de depredadores o buscar refugio donde entrar en brumación, exponiéndose a bajas temperaturas (Christian & Tracy 1981). Cowles y Bogert (1944) definieron el término "Mínimo Térmico Crítico (CT_{Min})" como el "punto térmico en el que el animal pierde su capacidad de coordinar y escapar de las condiciones que lo llevarán rápidamente a la muerte." La temperatura media anual disminuye con la elevación y la latitud (Körner 2007; Colwell et al. 2008), y en ambientes montañosos los cambios de temperatura tanto a nivel macro (por ejemplo, escala de paisaje) como micro (por ejemplo, bajo un arbusto o una roca) son abruptos (Warner 2009). Sin embargo, la capacidad de animales ectotermos para habitar estos duros entornos depende más de la disponibilidad de refugios que de la calidad del hábitat térmico de la zona (Monasterio et al. 2009). Dado que a menudo los refugios son necesarios para la brumación, la reproducción y la protección contra las temperaturas ambientales extremas, la disponibilidad de refugios adecuados muchas veces es un recurso limitante para poblaciones de animales, especialmente ectotermos (Huey 1991).

La calidad de microambientes como refugios para distintas especies varía de acuerdo a los requerimientos fisiológicos de la especie, a qué tan accesibles son estos refugios, y a su tamaño y estructura (Kinlaw 1999; Beck & Jennings 2003). Por ejemplo, se encontró una fuerte asociación entre la disminución de las poblaciones de la serpiente *Hoplocephalus bungaroides* en Australia con la pérdida de refugios adecuados (Shine et al. 1998) y con un aumento de la densidad de la vegetación que afectó negativamente a las condiciones térmicas (Pringle et al. 2003). En particular, los animales que bruman dependen en gran medida de estructuras térmicamente estables que estén protegidas de depredadores, variaciones climáticas extremas y otras perturbaciones (Huey 1991; Kinlaw 1999; Williams et al. 2015). En este sentido, los lagartos pueden soportar cambios de temperatura y períodos bajo cero seleccionando refugios que atenúen estas temperaturas (Weisrock & Janzen 1999). Este es el caso de, por ejemplo, *Zootoca vivipara* en Siberia oriental, que necesita cavidades estables

hechas por escarabajos o raíces descompuestas para sobrevivir en los meses más fríos del año (Berman et al. 2016). Una posible métrica para determinar la calidad térmica de microhábitats son los grados-días (*sensu* Lindsey & Newman 1956), que son la suma de las diferencias de valores de temperatura con respecto a un valor de referencia a lo largo de un tiempo determinado. De esta manera, los grados-días explican tanto la magnitud como la duración de las temperaturas que experimentarían los lagartos que ocupan tal microhábitat, en relación con un único parámetro (el valor de referencia elegido). Esta métrica permite una comparación directa de los regímenes térmicos entre diferentes sitios para muchas especies o poblaciones de especies (Guisan & Hofer 2003; Schwanz & Janzen 2008; Murphy et al. 2010; Boyero et al. 2011; Graae et al. 2012; Mitchell et al. 2012).

El clima en el centro y sur de Patagonia es frío-semiárido, con precipitaciones en las laderas de barlovento de los Andes, que disminuyen de oeste a este, en las laderas del sotavento (Garreaud et al. 2009). Este gradiente es visible en la vegetación, desde el oeste de Patagonia con bosques de *Nothofagus* de baja y mediana elevación, frecuentemente habitados por *Liolaemus pictus*, hasta la estepa en el este, donde se puede encontrar a *L. lineomaculatus* (Scolaro 2005), y la vegetación dominante son gramíneas y arbustos (Peri & Lasagno 2010). En el altoandino Patagónico, por encima de los 1600 msnm, el clima es frío y seco, con precipitaciones en forma de nieve o de granizo en cualquier época del año. Aquí se puede encontrar a *L. lineomaculatus*, y la vegetación se muestra similar a la estepa, con una gran abundancia arbustos bajos, compactos, y dispersos, con abundante suelo desnudo y rocas (Cabrera 1971). De esta manera, a menos que encuentren un refugio invernal adecuado, los lagartos experimentarían temperaturas ambientales bajo cero durante largos períodos en los bosques y estepas de Patagonia, bajo una capa de nieve que a veces alcanza una altura considerable (>1m). Adicionalmente, los lagartos patagónicos se beneficiarían en gran medida de mecanismos que les permitieran estar activos a bajas temperaturas, incluso a niveles de rendimiento subóptimos. De esta forma, los lagartos podrían aprovechar los escasos e irregulares recursos térmicos disponibles durante las temporadas de transición entre el invierno y el verano, mediante la elección de microambientes (por ejemplo, madrigueras, grietas, cobertura vegetal) donde las temperaturas fueran más cálidas que la temperatura del aire, y extendiendo así, las horas de actividad.

En este capítulo, se analizó la variabilidad térmica de refugios disponibles para las dos especies seleccionadas de *Liolaemus* en los distintos ambientes que podrían estar utilizando para pasar el invierno y las temporadas de transición: bosques de baja y mediana altitud, y

estepas de altoandino y a gran latitud. Este análisis permitirá conocer las temperaturas mínimas y máximas que las lagartijas podrían experimentar a lo largo del año en estos potenciales refugios, ayudando así a responder la pregunta: ¿qué es frío para una lagartija patagónica? a los fines de poder diseñar de manera ecológicamente apropiada los experimentos posteriores.

Propongo que:

H) El régimen térmico, tanto de los microambientes expuestos como de los potenciales refugios, varía en función de la elevación y de la latitud, por lo que los lagartos que habitan altas elevaciones y latitudes están expuestos a temperaturas más bajas y por más tiempo que los lagartos que habitan a elevaciones y latitudes relativamente menores.

Por lo tanto, para los sitios de captura de las poblaciones y especies de *Liolaemus* estudiadas, se predice la existencia de un contraste entre sitios en los microambientes expuestos y los potenciales refugios, que irá decreciendo en calidad térmica (con menor cantidad de grados-día por encima del mínimo térmico crítico de cada especie y mayor cantidad de grados-día por debajo de cero) del bosque de baja elevación al bosque de mediana elevación, luego la estepa altoandina y, finalmente, la estepa de Calafate.

Materiales y métodos

Áreas de estudio y temperaturas corporales

Se analizó la temperatura ambiental de los sitios de captura de las poblaciones a estudiar de *Liolaemus pictus* y de *L. lineomaculatus*, para el periodo correspondiente al año previo a las capturas relacionadas a los experimentos de enfriamiento y de rendimiento locomotor. Para *L. pictus*, los sitios fueron un bosque de baja elevación en San Carlos de Bariloche (41° 9' S, 71° 18' O; 780 msnm) y un bosque a mediana elevación en una montaña cerca de Esquel (42° 49' S, 71° 15' W; 1100 msnm, Fig. 1); mientras que para *L. lineomaculatus*, los sitios fueron la estepa altoandina de la misma montaña cerca de Esquel pero a mayor elevación (42° 49' S, 71° 15' W; 1800 msnm), y una estepa cerca de Calafate a mayor latitud (50° 15' S, 71° 29' W; 450 msnm, Fig. 1). Cabe señalar que estos ambientes son representativos de los extremos de la distribución latitudinal y altitudinal para cada especie.

Se obtuvo información sobre el entorno térmico al que se enfrenta *Liolaemus pictus* tanto en San Carlos de Bariloche como en Esquel a través de estaciones meteorológicas cercanas a la ubicación de las poblaciones (base de datos de la NASA, <http://power.larc.nasa.gov/>). A partir de estas bases de datos, se obtuvieron valores de la temperatura media diaria del aire (2 m sobre el suelo) para Esquel en el bosque de mediana elevación, y tanto del aire como del suelo para San Carlos de Bariloche. Para los sitios correspondientes a *L. lineomaculatus* de Calafate y el altoandino de Esquel (>1600 msnm) no se pudieron encontrar datos de estaciones meteorológicas que estuvieran lo suficientemente cerca de los sitios de muestreo como para que la información sea precisa, pero se dejó un modelo de PVC por sitio no cubierto, expuestos a la variación ambiental a nivel del sustrato. Cabe aclarar que las temperaturas obtenidas por estaciones meteorológicas proveen de temperaturas ambientales, mientras que los modelos de PVC expuestos a la variación ambiental proveen de temperaturas operativas. Estos valores se utilizan solamente como punto de referencia para cada sitio ya que son conceptualmente distintos y, por lo tanto, no se realizan comparaciones entre ellos.

Adicionalmente, para tener una idea más detallada de los desafíos que las montañas y estepas de la Patagonia traen a estas especies a nivel de microambiente, se colocaron modelos de PVC de lagartos conectados a *data-loggers* (HOBO TEMP® H8) en una variedad de potenciales refugios en los sitios de captura.

Potenciales refugios

Potenciales refugios en San Carlos de Bariloche (bosque de baja elevación)

Dadas las características del bosque andino patagónico (Speziale et al. 2010), se predice que en San Carlos de Bariloche, *Liolaemus pictus* podría pasar los meses más fríos del año refugiado bajo la hojarasca, arbustos, rocas y troncos, con protección de la caída de nieve por el dosel (Fig. Suplementaria 1.a). En este sitio se colocaron cuatro modelos durante el año previo a los experimentos de enfriamiento en marzo 2020 (mayo 2019 a mayo 2020). Estos modelos se colocaron en diferentes lugares para determinar las temperaturas de los posibles refugios en los que la especie podría pasar el invierno (particularmente, enterrados ~10 y ~15 cm bajo tierra; bajo una roca y bajo un arbusto). En la Fig. 3 se puede observar un corte de la toma de datos del *data-logger* conectado a los modelos de los refugios potenciales de “bajo

roca” y “enterrado ~10 cm” en enero 2020, a causa de que el *data-logger* dejó de funcionar, por lo cual para la comparación con los valores de temperatura corporal de las capturas en marzo 2020 se utilizaron sólo los otros dos modelos.

Potenciales refugios en Esquel (bosque de mediana elevación)

Dadas las características del bosque andino patagónico (Speziale et al. 2010), se predice que en una montaña cerca de Esquel, para el sitio de bosque de mediana elevación, *Liolaemus pictus* podría brumar de manera similar que en los bosques de baja elevación, utilizando como refugio la hojarasca, los arbustos, las rocas y troncos, con protección de la caída de nieve por el dosel, si bien los árboles suelen ser más bajos que en el bosque de baja elevación (Fig. Suplementaria 1.b). Mientras tanto, en el límite con la estepa altoandina la especie sólo podría pasar el invierno enterrada bajo el suelo suelto cerca de las raíces de los arbustos o bajo las rocas cubiertas de nieve. En estos sitios se colocaron los modelos de PVC entre abril y noviembre del 2016, previo al experimento de enfriamiento de verano 2016-2017. Tres modelos fueron colocados en el bosque de *Nothofagus* de elevación media (1100 msnm), y otros tres en el límite con la estepa altoandina (1400 msnm), cubriendo los extremos de la cordillera donde las poblaciones seleccionadas de *L. pictus* habitan en esa montaña. Se colocaron los modelos en diferentes lugares intentando representar la disponibilidad de refugios en ambos puntos: en el bosque de *Nothofagus*, enterrado ~10 cm bajo un árbol, enterrado ~10 cm bajo un árbol casi completamente seco y muerto, y enterrado ~10 cm bajo un tronco; mientras que en el sitio límite con la estepa, bajo una roca de aproximadamente un metro de radio y bajo dos tipos de arbustos (*Mulinum spinosum* y *Berberis spp.*), enterrado ~10 cm y ~ 15 cm, respectivamente.

Potenciales refugios en Esquel (estepa altoandina)

Dadas las características de la estepa altoandina de Esquel (Ferreira et al. 1998), se predice que *Liolaemus lineomaculatus* podría encontrar refugio en las numerosas madrigueras abandonadas de pequeños mamíferos (como los roedores del género *Ctenomys*) o enterrado bajo rocas, arbustos o gramíneas (Fig. Suplementaria 1.c). En este sitio se colocaron seis modelos de lagartos entre marzo de 2017 y enero de 2018, previo a los experimentos de rendimiento locomotor y enfriamiento, correspondientes a los veranos 2016-2017 y 2018-2019, respectivamente. Los modelos fueron colocados bajo un arbusto (*Mulinum spinosum*),

enterrado 10 cm bajo un arbusto de menor cobertura (*Berberis spp.*), tapado con tierra bajo una roca de aproximadamente 15 cm de radio, enterrado ~ 10 cm, enterrado ~15 cm y uno sobre el suelo, sin estar tapado por nada (modelo expuesto).

Potenciales refugios en Calafate (estepa)

En las estepas de Calafate, el terreno es una llanura, un campo abierto con numerosos arbustos y gramíneas, pero casi no hay rocas para que los lagartos se escondan bajo ellas (observación personal, Fig. Suplementaria 1.d). En este sitio se colocaron cuatro modelos entre marzo de 2017 y enero de 2018, previo a los experimentos de enfriamiento y rendimiento locomotor, correspondientes al verano 2017-2018. Los modelos fueron colocados bajo un arbusto (*Mulinum spinosum*), enterrado ~ 10 cm, enterrado ~15 cm y un modelo expuesto de la misma manera que en Esquel en la estepa altoandina, con fines comparativos.

Parámetros térmicos y horarios de actividad para los experimentos de rendimiento locomotor

Para los análisis de los potenciales refugios correspondientes a los experimentos de rendimiento locomotor, se consideró el *tiempo activo* para los lagartos como el período comprendido entre las 09:00 y las 19:00 horas, utilizando como referencia estudios previos acerca de la misma especie *Liolaemus lineomaculatus* (Medina 2010; Medina et al. 2011). Se descartaron los datos del invierno en estos análisis, dado que los lagartos bruman durante esa estación debido a las bajas temperaturas constantes, las nevadas y los días más cortos (Medina 2010). Sin embargo, el objetivo de incluir en estos análisis datos de las estaciones de transición entre la inactividad invernal y la actividad plena en verano (otoño y primavera) fue evaluar si los lagartos podrían correr (o caminar) durante los infrecuentes días cálidos del otoño y la primavera, cuando la temperatura podría permitir horas intermitentes de actividad.

En los análisis de potenciales refugios y modelos de lagartos de PVC expuestos que se corresponden con los experimentos de rendimiento locomotor, los valores de temperatura y grados-día, cuyo cálculo se detallará más adelante, fueron analizados en el contexto de parámetros relacionados con el rendimiento locomotor y que serán desarrollados en mayor detalle en el Capítulo III, en relación a dichos experimentos. Los parámetros utilizados son cuatro: la amplitud del rendimiento (**B₈₀** y **B₉₅**), que son los rangos de temperaturas corporales a los que el rendimiento es mayor o igual al 80% y 95% del rendimiento máximo, respectivamente; la amplitud de tolerancia térmica (**TTB**), definida como la diferencia entre el

mínimo térmico crítico (CT_{Min}) y el máximo térmico crítico (CT_{Max}); y finalmente el parámetro T_{opt} que es la temperatura a la cual el rendimiento es máximo u óptimo.

18

Modelos de PVC y calibración

Todos los modelos fueron hechos con tubería de PVC ($1,5 \times 8$ cm de sección) que luego fueron sellados en los extremos con silicona (Fastix®) para imitar el tamaño, reflectancia, termodinámica y forma de los cuerpos de los lagartos. Se validaron los modelos en sucesivas calibraciones, usando un lagarto vivo de cada especie y un modelo al lado. Para ello se expusieron el lagarto y el modelo a una secuencia de temperaturas moviendo el modelo para imitar las diferentes posiciones que el lagarto tomó bajo las diferentes temperaturas. Para la calibración, se usó una lámpara de calentamiento y un pequeño terrario (ver ejemplo de calibración en Fig. Suplementaria 2). Después de esta calibración, se realizó una regresión entre el modelo y la temperatura corporal del lagarto (*Liolaemus pictus*: R^2 ajustado = 0,846; $n = 2863$; Pendiente = 1,09; Intervalo de confianza = 1,05 – 1,14; *L. lineomaculatus*: R^2 ajustado = 0,92; $n = 2510$; Pendiente = 0,912; Intervalo de confianza = 0,88 - 0,94), y se ajustaron los valores de temperatura obtenidos por los modelos a campo con la curva de calibración de manera acorde, para que los valores de temperatura utilizados en los análisis reflejen esta calibración.

Grados-día y eventos de temperaturas bajo cero

Para determinar la “calidad térmica” de los potenciales refugios, se aplicó el concepto de grados-días (*sensu* Lindsey & Newman 1956), utilizando como referencia los valores 0°C (el punto de fusión del agua a 1 atm), y la media de la CT_{Min} de cada población, para ambas especies. En este estudio, los valores de referencia elegidos fueron 0°C y CT_{Min} para inferir con qué frecuencia y durante cuánto tiempo los individuos de *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* estarían sometidos a temperaturas por debajo del punto de fusión del agua y por encima de la CT_{Min} , respectivamente, durante el período evaluado. Los valores de CT_{Min} se obtuvieron experimentalmente en cada caso, excepto para el sitio de bosque de baja elevación en San Carlos de Bariloche para *L. pictus*, para el cual se utilizó el valor obtenido para una población de ese sitio por Kubisch et al. (2011) de $6,91^\circ\text{C}$.

Se utilizaron los grados-días para comparar entre los diferentes refugios potenciales, y se calculó utilizando la fórmula:

$$GDR0 = \sum_{i=1}^n |(Ti - 0) / 48|$$

Donde GDR0 es Grado-Día de Refugio para 0°C, y Ti se refiere a los valores de temperatura registrados por debajo de 0°C (cada 30 minutos), y

$$GDRCT_{Min} = \sum_{i=1}^n |(Ti - CT_{Min}) / 48|$$

Donde GDRCT_{Min} es el Grado-Día de Refugio para CT_{Min} y Ti se refiere a los valores de temperatura registrados por encima de CT_{Min} (cada 30 minutos).

Por último, se evaluaron también los episodios de temperaturas bajo cero que cada modelo registró durante el período analizado, tanto la cantidad de episodios como la duración de cada uno (es decir, el número de horas consecutivas que el potencial refugio estuvo ante temperaturas inferiores a 0°C).

Análisis estadísticos

Las comparaciones de la temperatura corporal media a campo (T_b) con la temperatura en los refugios potenciales en el mes de captura se realizaron con un test t apareado, y comparaciones entre los grados-día de los potenciales refugios con un test χ^2 . El umbral (alfa) de significancia para los valores p se fijó en 0,05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático estadístico R, versión 3.5.3.

Resultados

*Temperatura ambiental y temperatura corporal media a campo (T_b) de *Liolaemus pictus* y calidad térmica de los potenciales refugios (grados-días) en San Carlos de Bariloche (bosque de baja elevación)*

La temperatura del aire en San Carlos de Bariloche entre mayo 2019 y mayo 2020 alcanzó en el mes de julio un valor mínimo de las medias diarias de -6,42°C y a nivel del sustrato de -10,72°C, mientras que la temperatura media diaria más baja registrada por los

modelos de lagartos de PVC fue de 1.34°C . El valor absoluto más bajo registrado por los modelos de lagartos de PVC fue de 0.25°C (Fig. 3).

La temperatura corporal media a campo (T_b) fue de $31,05 \pm 2,43^{\circ}\text{C}$ ($n = 20$ machos adultos), significativamente superior a las temperaturas de marzo 2020 (mes de captura) en los refugios potenciales de bosque de baja elevación, que fueron de $11,80 \pm 2,22^{\circ}\text{C}$ (Test- t , $t_{1;19} = 34,95$; $p < 0,001$) y $11,7 \pm 1,43^{\circ}\text{C}$ ($t_{1;19} = 35,19$; $p < 0,001$; Fig. 4) para los potenciales refugios de “bajo arbusto” y “enterrado 15 cm”, respectivamente.

No hubo registros de temperaturas bajo cero en este sitio para este período, con lo cual los análisis de grados-día bajo cero y eventos bajo cero no fueron realizados.

Del análisis de grados-día para los refugios potenciales por encima de CT_{Min} ($GDRCT_{\text{Min}} = 6,91^{\circ}\text{C}$), la distribución de grados-día fue heterogénea entre los potenciales refugios, siendo “bajo una roca” el refugio de mayor calidad térmica con respecto a CT_{Min} y “enterrado ~ 15 cm” el de menor calidad térmica (test $\chi^2_3 = 174,5$; $p < 0,001$; Fig. 5).

*Temperatura ambiental temperatura corporal media a campo (T_b) de *Liolaemus pictus* y calidad térmica de los potenciales refugios (grados-días) en Esquel (bosque de mediana elevación)*

La temperatura del aire entre abril y noviembre del 2016 alcanzó valores mínimos medios diarios de $-3,75^{\circ}\text{C}$ en el mes de julio, mientras que la temperatura media diaria más baja registrada por los modelos de lagartos de PVC fue de $-1,7^{\circ}\text{C}$, también en julio. El valor absoluto más bajo registrado por los modelos de lagartos de PVC fue de -3°C , en julio (Fig. 6).

La temperatura corporal media a campo (T_b) de *Liolaemus pictus* en el bosque de mediana elevación fue de $25,79 \pm 2,38^{\circ}\text{C}$ ($n = 17$ machos adultos), superior a los valores de temperatura en abril 2016 (mes de captura) en los refugios de baja elevación (media \pm DE = $7,00 \pm 1,59^{\circ}\text{C}$; Test- t , $t_{1;39} = 25,94$; $p < 0,001$) y de los refugios de alta elevación (media \pm DE = $10,41 \pm 2,18^{\circ}\text{C}$; $t_{1;28} = 34,28$; $p < 0,001$; Fig. 7).

Del análisis de grados-día para los potenciales refugios para valores debajo de 0°C ($GDR0$), el refugio con menos días-grado por debajo de 0°C fue enterrado ~ 10 cm bajo un árbol, a 1100 msnm (cero grados-día); y el refugio con más días-grado por debajo de 0°C fue enterrado ~ 10 cm bajo un tronco seco, a 1100 msnm (18,25 grados-día) (test $\chi^2_5 = 40,41$; $p < 0,001$; Fig. 8). Por otro lado, del análisis de grados-día para los potenciales refugios por

encima de 5°C (la CT_{Min} de la población, $GDRCT_{Min}$), la distribución de los grados-día fue homogénea entre los potenciales refugios de cada sitio, con una mayor cantidad a 1400 msnm ($195,42 \pm 6,07$ grados-día) que a 1100 msnm ($56,74 \pm 8,02$ grados-día; test $\chi^2_5 = 230,4$; $p < 0,001$).

El número de horas consecutivas en que cada modelo registró temperaturas inferiores a 0°C varió entre todos los diferentes refugios potenciales para el bosque de mediana elevación de Esquel, de 0 a 28 veces, y entre 0,5 y 377,5 horas por debajo de 0°C (Tabla 1).

Temperatura ambiental de Liolaemus lineomaculatus y calidad térmica de los potenciales refugios (grados-días) en la estepa altoandina de Esquel y la estepa de Calafate

Entre marzo 2017 y enero 2018, en Esquel, el modelo de lagarto de PVC expuesto (fuera de los refugios potenciales) alcanzó un valor mínimo de -8,70°C, mientras que la temperatura más baja registrada por los modelos de lagartos de PVC en los potenciales refugios fue de -6,58°C, ambos valores en el mes de junio. El modelo expuesto en Calafate alcanzó durante el mismo período que en Esquel un valor mínimo de -8,91°C, mientras que la temperatura más baja registrada por los modelos de lagartos de PVC en los potenciales refugios fue de -3,37°C, en el mes de julio (Fig. 9).

Del análisis de grados-día para GDR_0 en Esquel, el refugio con menos días-grado inferiores a 0°C fue el que correspondió al modelo enterrado ~ 10 cm en el suelo (3,34 grados-día); y el refugio con más días-grado inferiores a 0°C fue el que correspondió al modelo colocado debajo de un arbusto (21,95 grados-día). Mientras tanto, en Calafate, el refugio con menos grados-días bajo 0°C fue el enterrado ~ 15 cm en el suelo (9,15 grados-días); y el refugio con más grados-días bajo 0°C fue el enterrado ~ 10 cm en el suelo (108,78 grados-días; test $\chi^2_7 = 1611,1$; $p < 0,001$; Fig. 11).

Los modelos de lagartos de PVC en potenciales refugios de Calafate tuvieron entre 7 y 194 episodios en los que registraron temperaturas consecutivas por debajo de 0°C que duraron entre 1 y 3427 horas. Mientras tanto, en Esquel, los modelos de lagartos de PVC pasaron entre 7 y 69 episodios de temperaturas por debajo de 0°C que duraron entre 1 y 103 horas (Tabla 2).

El modelo de lagarto de PVC expuesto (colocado en el suelo, fuera de los refugios potenciales) entre marzo 2017 y enero 2018 en Esquel pasó un mayor porcentaje (24%) del tiempo a temperaturas dentro del rango de tolerancia térmica (TTB), las temperaturas B_{80} , B_{95} y T_{opt} obtenidas para estos lagartos, que el modelo de PVC expuesto en Calafate (Tabla 3). Los grados-días dentro de la TTB fueron casi cuatro veces más altos para los potenciales refugios de Esquel que para los potenciales refugios de Calafate (test $\chi^2_9 = 650,55$; $p < 0,001$; Fig. 11).

Discusión

Para *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus*, dónde pasar el invierno es crucial en la supervivencia a los riesgos asociados a las temperaturas bajas de Patagonia. Se pudo comprobar el contraste predicho entre los sitios, con lo cual no se puede rechazar la hipótesis propuesta. En los bosques subantárticos de baja y mediana elevación, *L. pictus* puede encontrar diversas alternativas para utilizar como refugios que le permiten soportar las frías condiciones ambientales sin recurrir a grandes inversiones fisiológicas, tanto en invierno como en primavera y otoño: como por ejemplo entre troncos, árboles y arbustos (donde la tierra que rodea a las raíces se encuentra lo suficientemente suelta como para permitir que los lagartos se entierren rápida y fácilmente), rocas u hojarasca. Entre los bosques de elevación baja y media y el límite con la estepa altoandina, los lagartos *L. pictus* pueden encontrar refugios con temperatura mayor a cero durante la mayor parte del año (Fig. 5, Tabla 1); además, la elevación demostró ser un débil predictor de la temperatura mínima en áreas con disponibilidad relativamente heterogénea de potenciales refugios disponibles (Lookingbill & Urban 2003; Dobrowski et al. 2009). Sin embargo, contrariamente a lo predicho, las temperaturas en los potenciales refugios del bosque a mediana elevación fueron más bajas que las temperaturas en el sitio de alta elevación, a fines de mayo y a principios de septiembre (Fig. 3). Los bosques refrescan la superficie del suelo de manera directa mediante sombreado e, indirectamente, mediante la evapotranspiración en los días más calurosos de la primavera y el otoño. Sin embargo, cuando la nieve comienza a acumularse durante el invierno, esta mantiene la superficie del suelo más caliente que la temperatura del aire. Durante la primavera, la nieve cumple la doble función de reflejar la radiación entrante y de absorber el calor latente durante el proceso de derretimiento, lo que mantiene el suelo a una temperatura

estable, si bien más fría que la del aire (Graae et al. 2012). Por lo tanto, después de que la nieve comienza a derretirse, el dosel protegería los refugios en el bosque, mientras que los refugios ubicados tanto en el sitio al límite con la estepa altoandina como en los sitios de *L. lineomaculatus*, ubicados en las estepas altoandina y cerca de Calafate, quedarían relativamente más expuestos a las bajas temperaturas.

Además, encontré que en los potenciales refugios hay diferencias notables en los episodios en que la temperatura desciende por debajo de 0°C, la duración de esos episodios y la gama de temperaturas disponibles entre los potenciales refugios, para ambas poblaciones de *L. pictus* y para ambas poblaciones de *L. lineomaculatus*. Esta diferencia podría reflejar una amenaza muy diferente de episodios de congelación y descongelación para los lagartos, según el refugio elegido y la elevación. La gran variación térmica de potenciales refugios “viables”, en términos de episodios bajo cero, entre sitios (entre el bosque de mediana elevación y el sitio de alta elevación, y entre la estepa altoandina en Esquel y la estepa en Calafate), así como dentro de cada sitio, implica que los lagartos podrían escapar del congelamiento eligiendo un refugio adecuado, con la posibilidad de reubicarse desplazándose a cortas distancias (es decir, durante unos pocos metros, cuando las temperaturas fueran superiores a la CT_{Min}).

El uso de refugio probablemente depende en gran medida de la época del año. Si bien el uso de un refugio con menor cobertura (como, por ejemplo, bajo una roca o un arbusto) puede ser más riesgoso que el uso de un refugio más protegido (como, por ejemplo, enterrado ~15 cm) durante el invierno, en otoño y primavera estos sitios menos cubiertos pueden ofrecer la posibilidad de breves pulsos de actividad. Por ejemplo, se encontró que, aunque la cantidad de grados-día por debajo de 0°C fue mayor en el sitio al límite de la estepa de alta elevación con respecto al bosque de mediana elevación, la cantidad de grados-día por encima de la CT_{Min} fue también mayor en el sitio al límite de la estepa de alta elevación (Fig. 5), sugiriendo que los lagartos que usan refugios a tales elevaciones pasarían más tiempo por encima de la media de CT_{Min} para la especie. Esto permitiría a lagartos en esos refugios percibir mejor el fotoperiodo y aprovechar los ocasionales días soleados disponibles en los meses más fríos del año para actividades como la búsqueda de alimento, la fuga de depredadores o el traslado a otro refugio, como en el caso de *Liolaemus signifer* (Pearson 1954).

Por otro lado, *Liolaemus lineomaculatus* en las estepas cuenta con menos heterogeneidad en cuanto al tipo de refugios que *L. pictus*: mayormente, rocas y arbustos de baja altura. Es interesante que en las estepas de Calafate no se pudo encontrar tantas rocas

como en la estepa altoandina en Esquel (Fig. 2), y esto es relevante, ya que las rocas demostraron ser refugios de alta calidad térmica en invierno en ambientes similares (Fig. 5), variando en su eficiencia y en cómo la seleccionan los individuos para refugiarse según el grosor (Webb & Shine 1998; Kearney & Predavec 2000), y como corredores y amortiguadores térmicos en ambientes de baja calidad térmica (Thompson et al. 2018). En sitios como las estepas que disponen de menos opciones de refugios que en los bosques, y donde la cobertura de nieve es significativa, el cambio climático antropogénico podría amenazar la estabilidad de la temperatura del suelo durante el invierno, mantenida por la cubierta de nieve. El término "subniveo" describe el espacio bajo la cubierta de nieve que proporciona estabilidad térmica y sirve como hábitat donde especies de numerosos taxa (como invertebrados, anfibios, reptiles y pequeños mamíferos) pueden retirarse e incluso algunas especies como ciertos invertebrados y roedores pueden permanecer activas (Pauli et al. 2013). Mientras tanto, el aumento global de las temperaturas en invierno ya ha alterado características clave de la nieve, como la profundidad, la densidad y la extensión en todo el mundo (Rupp et al. 2013), y estudios experimentales han demostrado que ante los escenarios de reducción de cobertura y profundidad de nieve relacionados con las proyecciones de aumento de la temperatura por el cambio climático mundial, las temperaturas del suelo se volverían inestables y estarían expuestas a pulsos de frío extremo (Petty et al. 2015). Esta inestabilidad de las temperaturas del suelo durante las rachas de calor del invierno probablemente dejará a los organismos con respuestas estacionalmente programadas más vulnerables en el futuro, especialmente si pierden su capacidad de tolerancia al frío (Lundquist et al. 2013; Williams et al. 2015). De hecho, investigadores han descubierto que después de inviernos cálidos, las tortugas recién nacidas que sobreviven el invierno (*Chrysemis picta*) consumen más reservas energéticas y emergen en peores condiciones fisiológicas que tortugas recién nacidas de inviernos más fríos (Muir et al. 2014).

Adicionalmente, la estructura de la vegetación y la topografía del terreno pueden causar grandes diferencias en la temperatura del suelo y la desaparición de la nieve en distancias cortas (Ford et al. 2013). En este capítulo exploré la calidad térmica de los potenciales refugios para lagartos en reducidas áreas de cada lugar de muestreo, representando una muestra de las opciones que los individuos podrían elegir cada año previo al invierno y en las estaciones de transición, permitiendo la actividad intermitente (Fig. 11). Dado que *Liolaemus lineomaculatus* habita en ambientes más fríos que *L. pictus* (en elevaciones o latitudes más altas), es poco probable que pueda pasar la mayor parte del invierno a temperaturas superiores a los 0°C como *L. pictus*. Sin embargo, a pesar de que la calidad

térmica de los potenciales refugios varió mucho entre sitios (estepa altoandina de Esquel y estepa de Calafate) y dentro de cada sitio, en términos generales los potenciales refugios pasaron muy poco tiempo a temperaturas cercanas o inferiores a las de los puntos de superenfriamiento (PSE, la temperatura a la cual el animal tiene una reacción exotérmica que indica el congelamiento de los fluidos corporales) de cada población (Fig. 9). Se encontró que, a pesar de que los potenciales refugios seleccionados estuvieron enterrados a profundidades moderadas (~10-15 cm, que se consideraron apropiadas, ya que estas especies no tienen adaptaciones morfológicas para cavar a grandes profundidades), los animales estarían al resguardo de las temperaturas del aire en la superficie. Esto es consistente con trabajos anteriores que encontraron que 10 cm de sustrato causan un significativo amortiguamiento térmico en los lugares donde se recogían colonias subterráneas de distintas especies de hormigas invasoras (Baudier et al. 2015), y con resultados con la tortuga de caja del este, *Terrapene carolina*, que sobrevive el invierno en Ohio enterradas a profundidades promedio de 4–5 cm y máximas de 14 cm (Claussen et al. 1991).

El largo período de brumación (letargo invernal en los vertebrados ectotermos (*sensu* Mayhew 1965) que experimentan los reptiles de la Patagonia reduce el período de actividad, afectando a múltiples aspectos de su historia de vida, como el crecimiento (Gutiérrez et al. 2013) y los ciclos reproductivos (Ibargüengoytía & Cussac 1998). La asignación de energía para estas especies es vital para compensar tanto los lentos ciclos de vida de los lagartos patagónicos (Boretto et al. 2018) como las camadas relativamente grandes (3–6 para *Liolaemus pictus* -Ibargüengoytía & Cussac 1996- y 3–4 para *L. lineomaculatus* -Medina & Ibargüengoytía 2010-) que tienen entre fines de verano y comienzos del otoño, lo cual no les deja mucho tiempo para alimentarse luego de los partos y reponer energía hasta el comienzo de la brumación. De esta manera, es posible que la supervivencia de *L. pictus* y *L. lineomaculatus* dependa en mayor medida de mecanismos de comportamiento (elección de micrositio) que de mecanismos fisiológicos.

Se detectaron diferencias entre las estepas altoandina y la cercana a Calafate respecto a la calidad térmica ambiental dentro y fuera de los refugios potenciales que *Liolaemus lineomaculatus* podría utilizar durante las intermitentes horas de actividad en otoño y primavera. En las estepas altoandinas de Esquel, los lagartos pasaron la mayor parte (95%) del otoño, la primavera y el comienzo del verano dentro de su amplitud de tolerancia térmica (TTB), el rango de temperaturas que permiten movimiento en el animal, situado entre sus extremos térmicos críticos (CT_{Min} y CT_{Max}). A su vez, los lagartos en las estepas altoandinas

de Esquel podrían haber pasado un 14% de su tiempo en el rango B_{80} para carreras de 0,15 m y 26% para carreras de 1,05 m ubicados dentro de los potenciales refugios. En contraste, en las estepas de Calafate, los lagartos pasaron sólo el 71% del tiempo de actividad durante los mismos meses dentro de su TTB, 5% dentro del rango B_{80} para carreras de 0,15 m y 8% para carreras de 1,05 m. El mismo patrón se puede observar para el rango B_{95} y para T_{opt} , tanto en las carreras de 0,15 m (carreras cortas, considerando el dispositivo que se utilizó para medirlas) como en las de 1,05 m (carreras largas, de toda la longitud del dispositivo para las carreras). Por lo tanto, los lagartos de Esquel podrían habitar un ambiente que proporciona una mejor calidad térmica para el rendimiento locomotor.

Cabe destacar que el muestreo de los potenciales refugios no tuvo en cuenta la frecuencia relativa de todos los potenciales refugios disponibles, ni se pudieron desplegar suficientes modelos para obtener réplicas de cada potencial refugio en cada sitio, por lo que ciertos tipos de refugios podrían estar sobrerrepresentados y otros subrepresentados. No obstante, la homogeneidad del entorno (especialmente en las estepas) permitió cubrir los microambientes más representativos incluso con pocos modelos.

Los bosques, montañas y estepas de la Patagonia representan un lugar ideal para el estudio de cómo los lagartos pueden soportar situaciones en las que hay nieve o lluvia la mayor parte del año, con temperaturas que caen rápidamente durante la noche, incluso en verano. Considerando las muy bajas temperaturas ambientales que tanto *Liolaemus pictus* como *L. lineomaculatus* enfrentan la mayor parte del año, la capacidad de superar las limitaciones ambientales podría depender principalmente de los refugios térmicamente adecuados. Los refugios adecuados pueden además dar a los individuos una ventaja ecológica en las estaciones frías, cuando podrían ocurrir algunos días calurosos intermitentes, permitiéndoles así reanudar la actividad cuando otras especies pueden todavía estar sufriendo el torpor. Sin embargo, los conocimientos sobre los refugios invernales de los ectotermos siguen siendo escasos, incluso cuando la información es pertinente para determinar las ubicaciones o incluso micro ubicaciones (como ciertos tipos de rocas, bajo troncos de árboles específicos) en las que los responsables de políticas de conservación deberían hacer esfuerzos de protección.

Figura 3. Temperaturas del sustrato y del aire en el bosque de baja elevación (780 msnm) de San Carlos de Bariloche, Argentina. Los registros fueron obtenidos mediante modelos de PVC de lagartijas colocados en los potenciales refugios de *Liolaemus pictus* entre mayo de 2019 y abril de 2020.

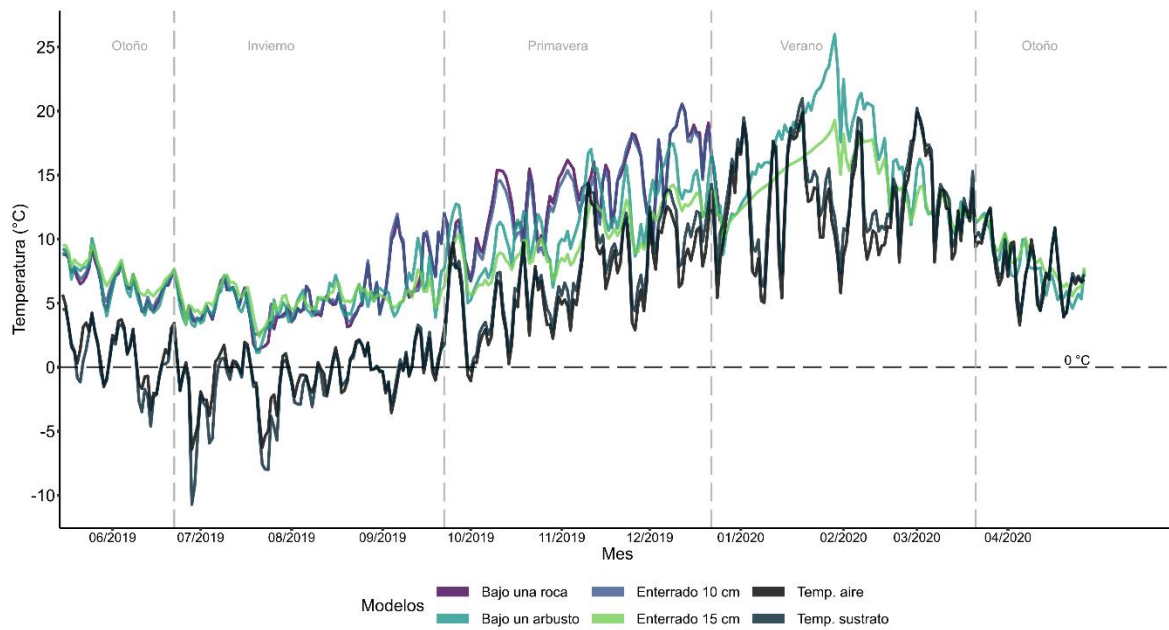


Figura 4. Resumen de temperaturas de los potenciales refugios en el sitio en San Carlos de Bariloche, en el bosque de baja elevación (7800 msnm), para el mes de captura (marzo), y la Tb de campo de *Liolaemus pictus*. La mediana (línea negra horizontal) y la media (rombos) están representadas en todos los grupos. Cada caja representa el 50% de los valores centrales de cada grupo; el límite hasta donde llegan los bigotes (líneas verticales) inferiores y superiores representa los cuartiles superiores e inferiores (1ro y 4to), valores atípicos representados como asteriscos. Las diferentes letras sobre las cajas indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (valor p).

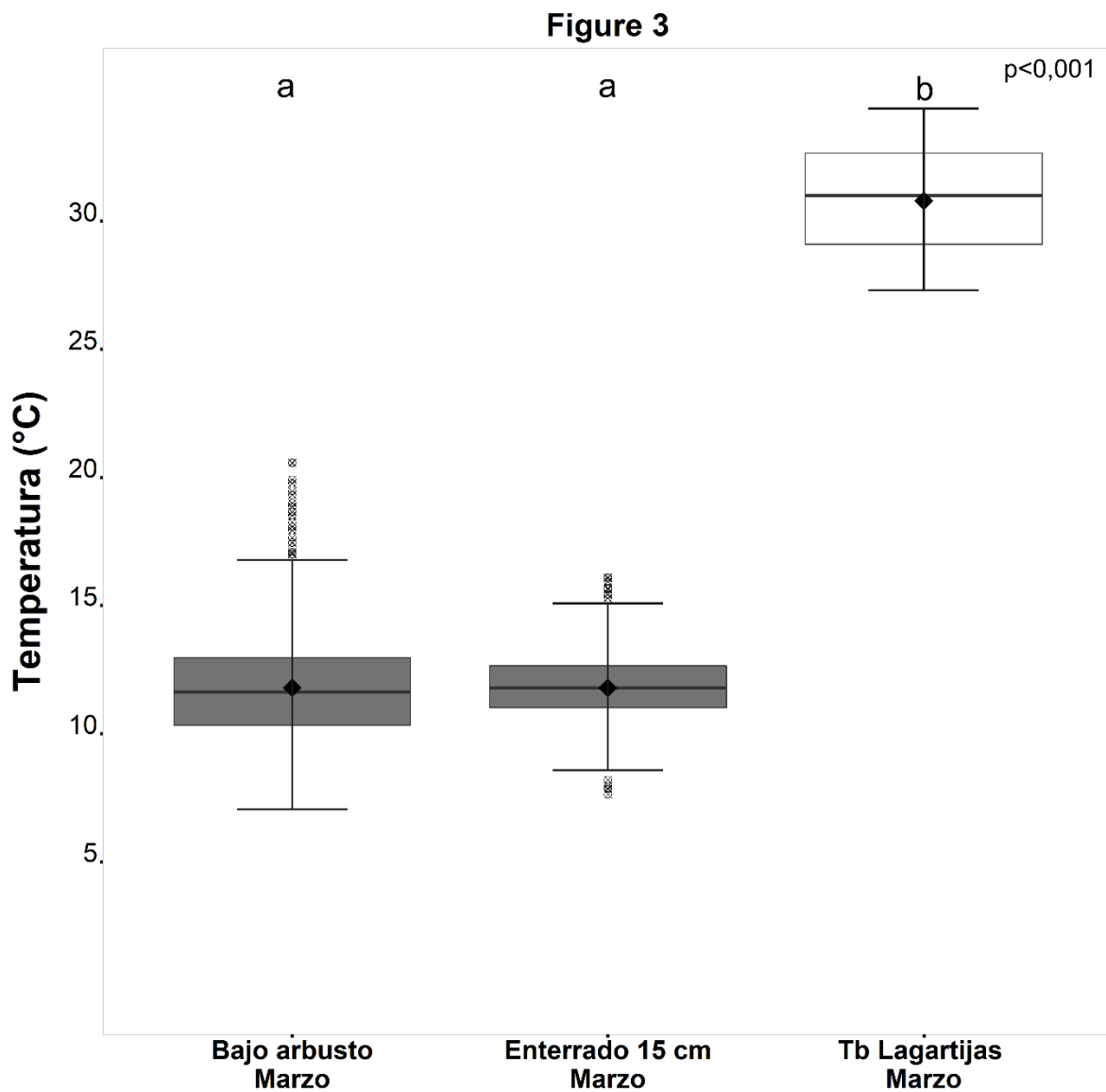


Figura 5. Calidad térmica de los posibles refugios de *Liolaemus pictus* (grados-día) 29 en el sitio en San Carlos de Bariloche, en el bosque de baja elevación (780 msnm). Los valores de los grados-día por encima de 6.91°C (CT_{Min}) están representados para cada refugio potencial.

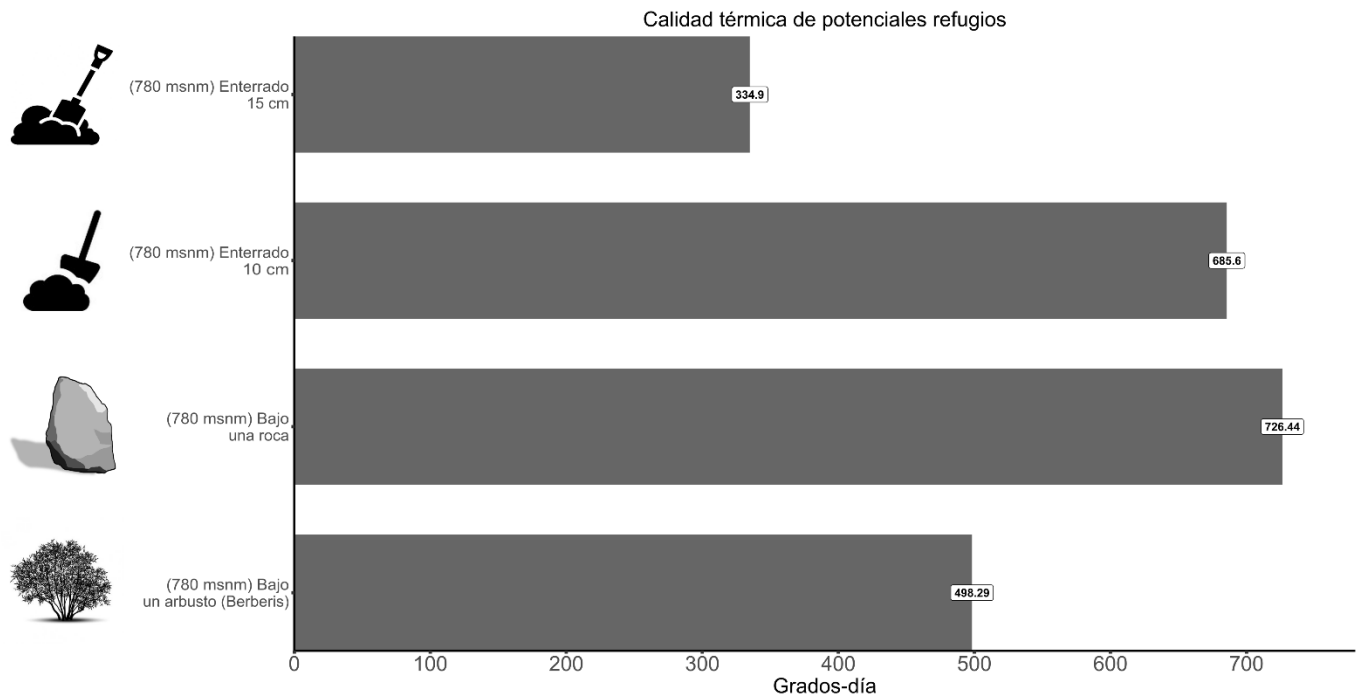


Figura 6. Temperatura en el sitio cerca de Esquel, Argentina, entre abril 2016 y enero 2017. Los valores corresponden a temperaturas del aire y registros obtenidos a través de los modelos de PVC de lagartijas colocados en los potenciales refugios de *Liolaemus pictus*, en A) el bosque de mediana elevación (1100 msnm) y B) límite con la estepa altoandina (B, 1400 msnm).

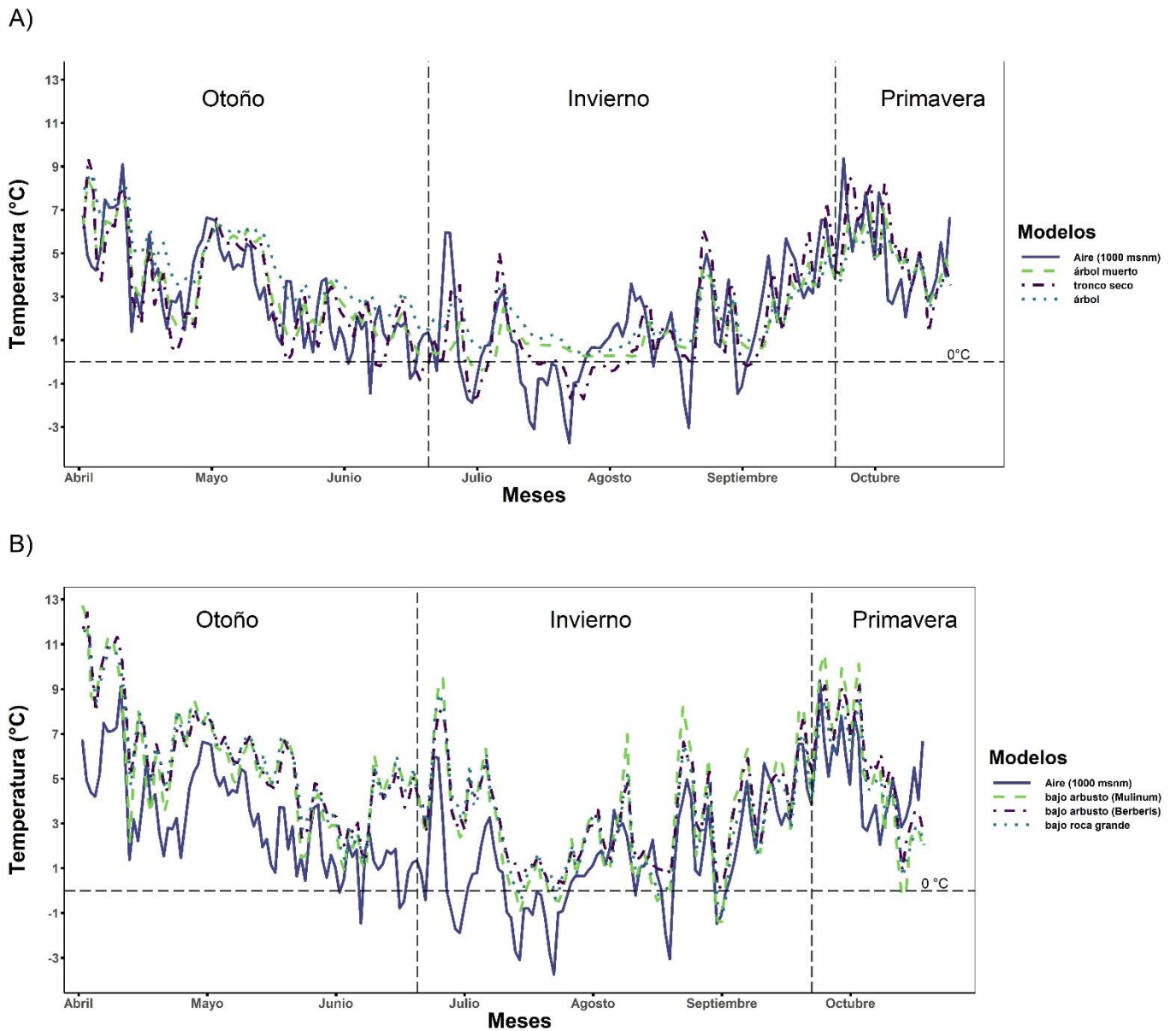


Figura 7. Resumen de temperaturas de los potenciales refugios en el sitio cerca de Esquel, en el bosque de mediana elevación (1100 msnm, cajas color gris claro) y el límite con la estepa altoandina (1400 msnm cajas color gris oscuro) para el mes de captura (abril), y la T_b de campo de *Liolaemus pictus*. La mediana (línea negra horizontal) y la media (rombos) están representadas en todos los grupos. Cada caja representa el 50% de los valores centrales de cada grupo; el límite hasta donde llegan los bigotes (líneas verticales) inferiores y superiores representa los cuartiles superiores e inferiores (1ro y 4to), *valores atípicos* representados como asteriscos. Las diferentes letras sobre las cajas indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (valor p).

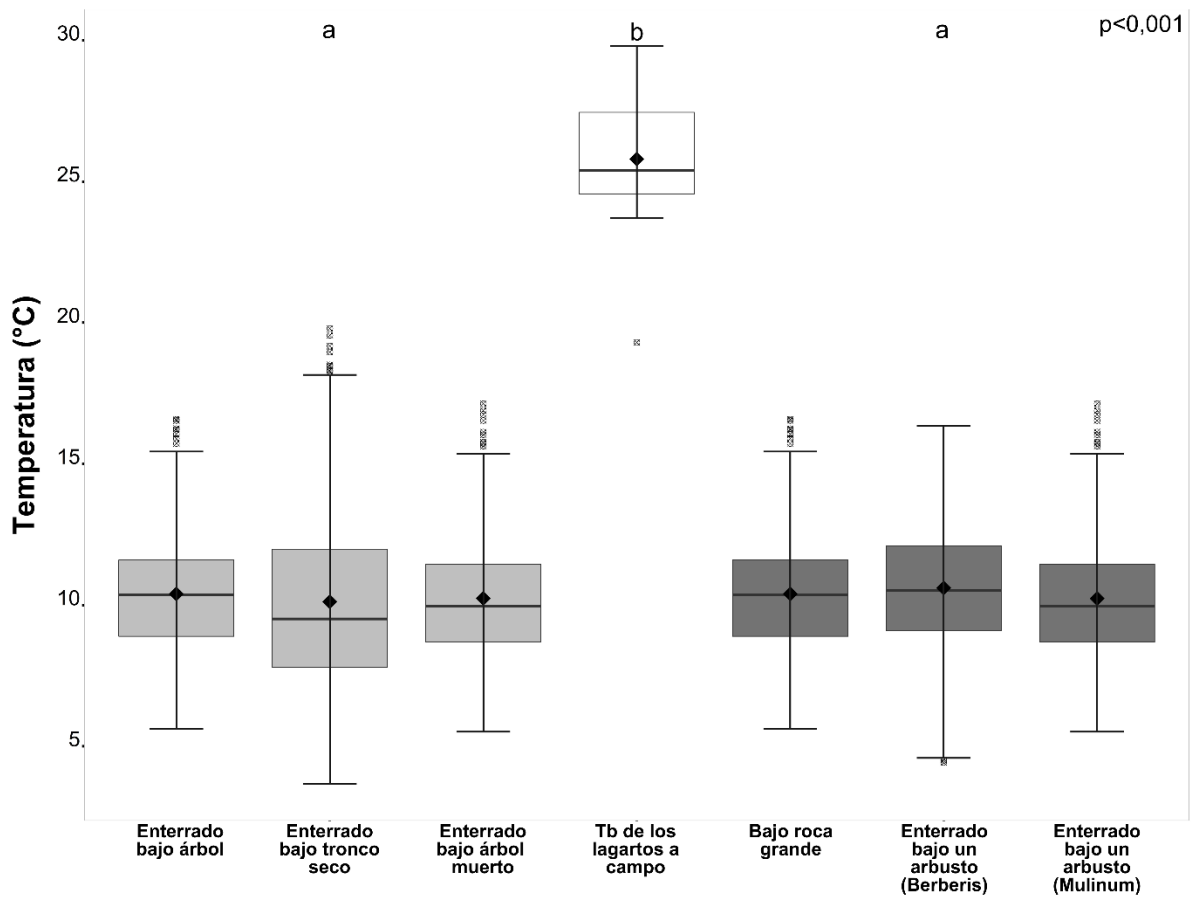


Figura 8. Calidad térmica de los posibles refugios de *Liolaemus pictus* (grados-día) 32
 en el sitio cerca de Esquel, en el bosque de mediana elevación (1100 msnm) y límite con la
 estepa altoandina (1400 msnm). Los valores de los días-grado por debajo de 0°C (gris claro)
 y los días-grado por encima de 5°C (CT_{Min}, gris oscuro) están representados para cada refugio
 potencial.

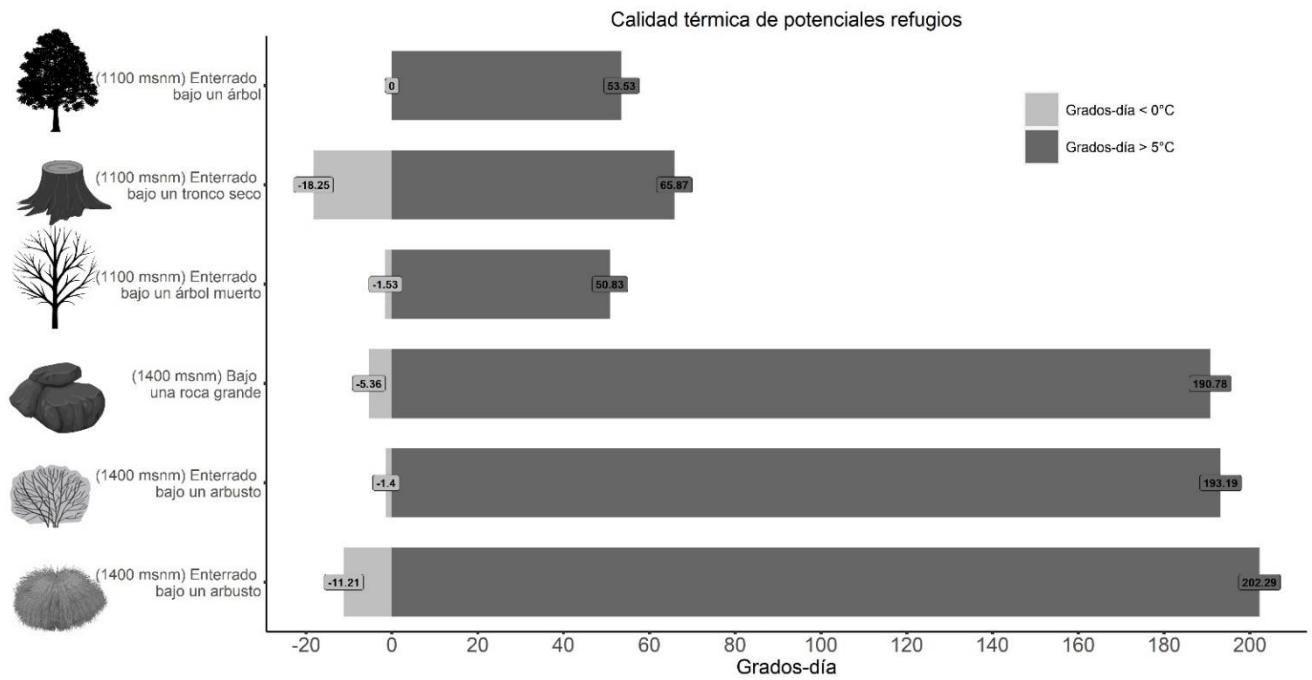


Figura 9. Temperatura en los sitio cerca de Esquel y Calafate, Argentina, entre marzo de 2017 y enero de 2018. Los valores corresponden a registros obtenidos a través de los modelos de PVC de lagartijas que fueron expuestos a las variación ambiental y aquellos modelos colocados en los potenciales refugios de *Liolaemus lineomaculatus*, en A) estepa altoandina de Esquel (1800 msnm) y B) estepa de Calafate (450 msnm).

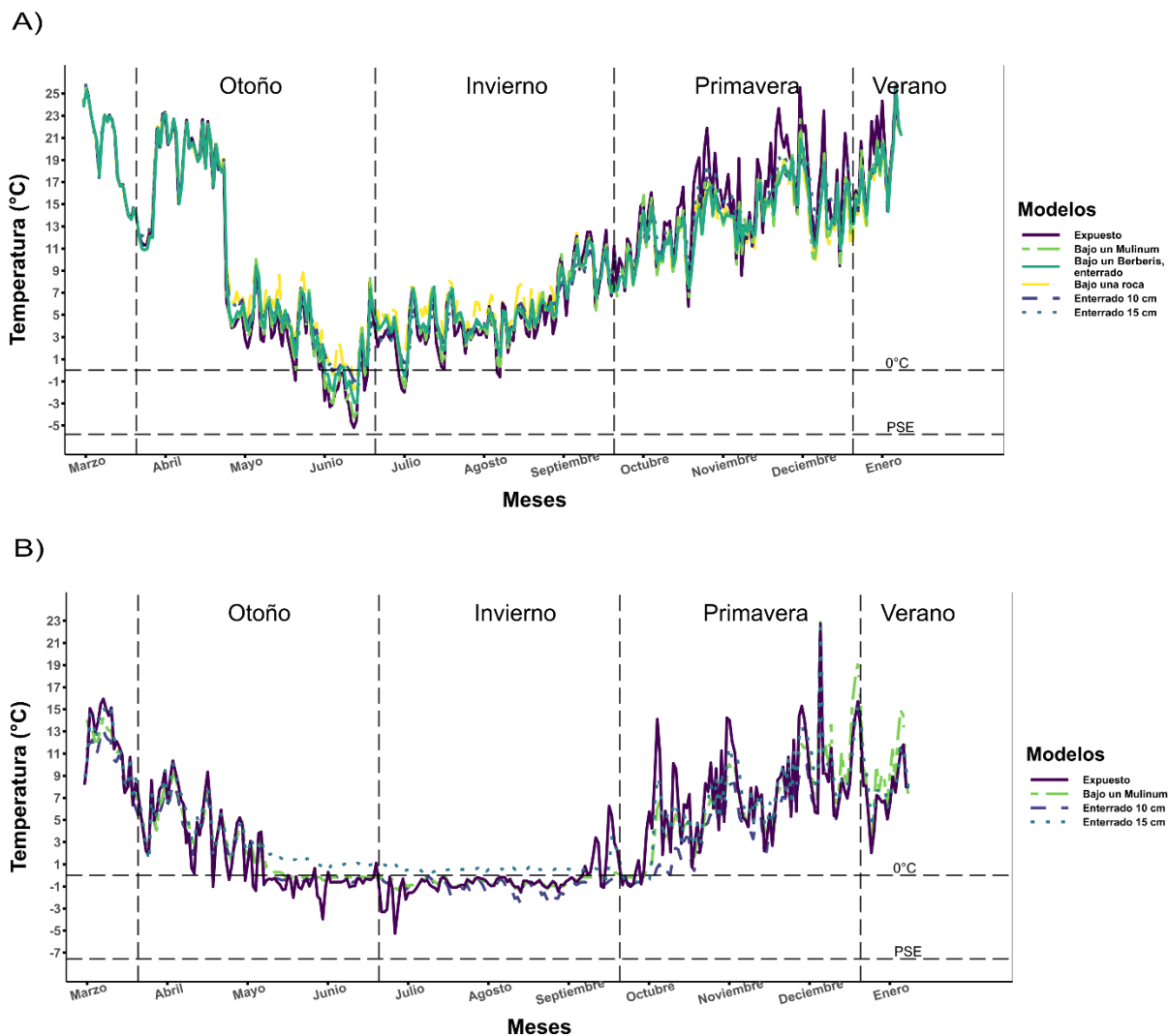


Figura 10. Calidad térmica de los potenciales refugios de *Liolaemus*

lineomaculatus (grados-día) en los sitios en la estepa altoandina de Esquel (1800 msnm, gris oscuro) y en la estepa de Calafate (450 msnm, gris claro). Los valores de los grados-día superiores al CT_{Min} e inferiores al CT_{Max} de cada población están representados para cada refugio potencial.

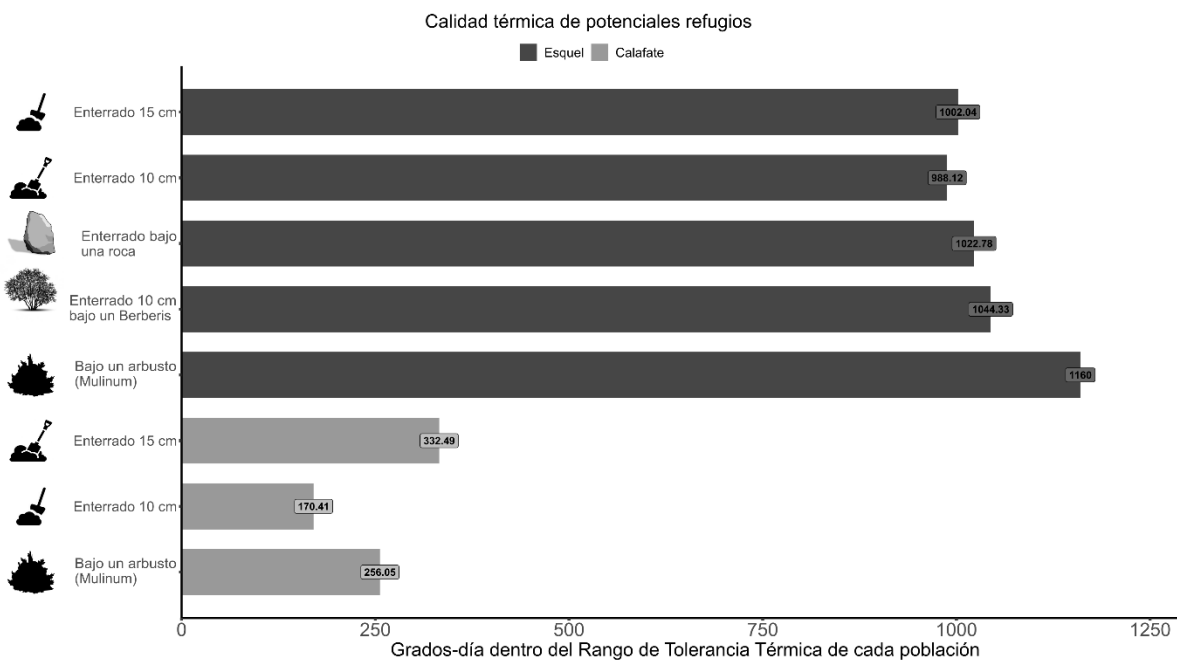


Figura 11. Calidad térmica de los potenciales refugios de *Liolaemus lineomaculatus* (grados-día) en los sitios en la estepa altoandina de Esquel (1800 msnm, gris oscuro) y en la estepa de Calafate (450 msnm, gris claro). Los valores de los grados-día inferiores a 0°C están representados para cada refugio potencial.

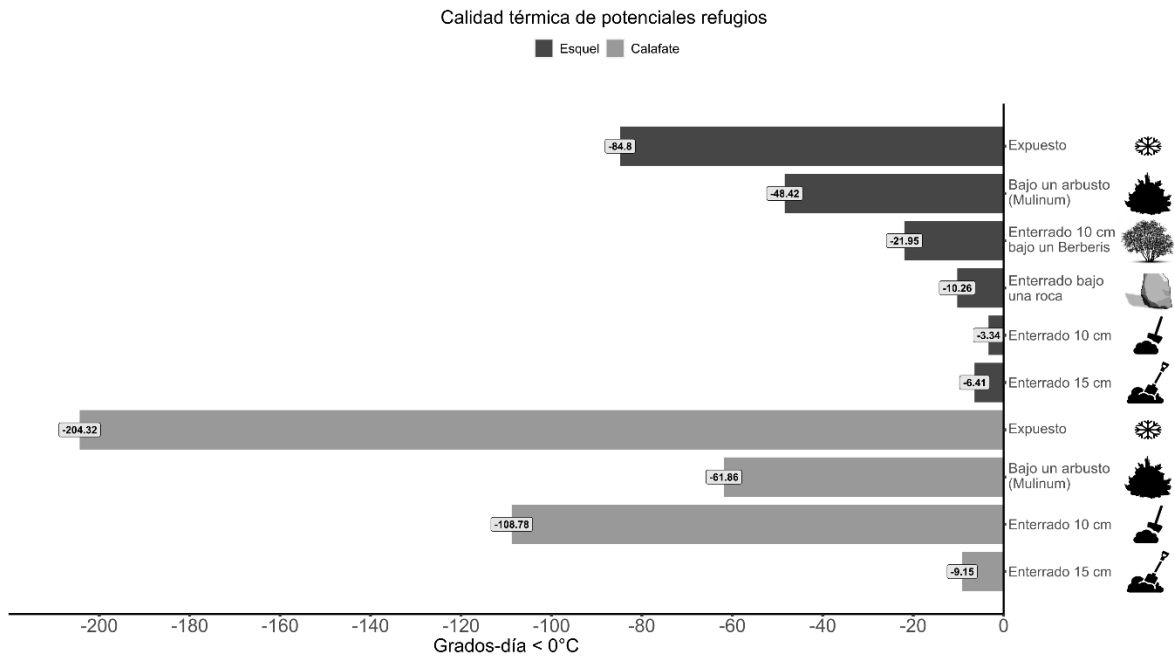


Tabla 1. Resumen de la información obtenida de los seis modelos de lagarto de PVC, colocados en los potenciales refugios de *Liolaemus pictus*, en el sitio cerca de Esquel, en el bosque de mediana elevación y el límite con la estepa altoandina. Número de episodios a temperaturas bajo cero, mínimo, media \pm desvío estándar (DE) y máximo número de horas consecutivas con temperaturas bajo 0°C en un solo episodio, y temperatura mínima registrada para cada potencial refugio.

Sitio	Localización del modelo	Número de episodios con temperaturas bajo 0°C	Media (\pm DE) (horas)	Mínimo y máximo (horas) ¹	Temperaturas mínimas y máximas (°C)
Bosque mediana elevación (1100 msnm)	Bajo un árbol muerto, enterrado ~10 cm	1	146,5	146,5	-0,68 a 10,15
	Bajo un tronco seco, enterrado ~10 cm	15	60,25 (97)	1,5–377,5	-2,28 a 11,37
	Bajo un árbol, enterrado ~10 cm	0	-	-	0,25 a 9,34
Límite con la estepa altoandina (1400 msnm)	Bajo un arbusto (<i>Mulinum spinosum</i>), enterrado ~10 cm	28	11 (23)	0,5 – 93,5	-2,19 a 22,66
	Bajo un arbusto (<i>Berberis sp.</i>), enterrado ~15 cm	8	7,25 (6)	0,5 – 16	-0,99 a 23,01
	Bajo una roca de ~1m de radio	19	10,5 (8)	0,5 – 20,5	-1,73 to 21,51

¹Números mínimo y máximo de horas consecutivas con temperaturas bajo 0°C en un episodio

Tabla 2. Resumen de la información obtenida de los seis modelos de lagarto de

PVC, colocados en los potenciales refugios de *Liolaemus lineomaculatus*, en los sitios de Esquel y Calafate. Número de episodios a temperaturas bajo cero, mínimo, media \pm desvío estándar (DE) y máximo número de horas consecutivas con temperaturas bajo 0°C en un solo episodio, y temperatura mínima registrada para cada potencial refugio.

Sitio	Localización del modelo	Número de episodios con temperaturas bajo 0°C	Media (\pm DE) (horas)	Mínimo y máximo (horas) ¹	Temperaturas mínimas y máximas (°C)
Calafate	Expuesto	177	21,5 (102,5)	1-1266	-8,91 to 44,89
	Bajo un arbusto (<i>Mulinum spinosum</i>)	7	463,5 (1050,5)	9-2937	-1,97 to 31,93
	Enterrado ~10 cm	13	276 (928)	2-3427	-3,37 to 32,76
	Enterrado ~15 cm	194	3 (18,5)	1-257	-1,97 to 30,71
Esquel	Expuesto	118	7,5 (7)	1-43	-8,70 to 48,37
	Bajo un arbusto (<i>Mulinum spinosum</i>)	69	8 (8,5)	1-45	-6,58 to 39,32
	Enterrado bajo un arbusto (<i>Berberis spp.</i>) ~10 cm	25	13 (15)	1-72	-4,56 to 30,70
	Bajo una roca de ~15 cm de radio	23	9 (7)	1-21	-3,33 to 30,69
	Enterrado ~10 cm	7	20,5 (34)	2-100	-1,61 to 30,90
	Enterrado ~15 cm	7	26 (33)	8-103	-2,88 to 30,67

¹Números mínimo y máximo de horas consecutivas con temperaturas bajo 0°C en un episodio

Tabla 3. Horas de actividad dentro del rango de los parámetros de rendimiento

locomotor de cada población y el porcentaje del total de horas de actividad que representan.

Tiempo de actividad (horas) dentro del rango (porcentaje del total)			
	Parámetro poblacional	Esquel	Calafate
	Rango de tolerancia térmica (TTB)	2262 (95%)	1693 (71%)
Carreras de 0.15 m	Rango B ₈₀	329 (14%)	123 (5%)
	Rango B ₉₅	135 (6%)	51 (2%)
	T_{opt}	28 (1%)	11 (1%)
Carreras de 1.05 m	Rango B ₈₀	615 (26%)	188 (8%)
	Rango B ₉₅	243 (10%)	67 (3%)
	T_{opt}	44 (2%)	11 (1%)
TOTAL		2378	

Figura suplementaria 1. Fotos de los cuatro sitios de muestreo, **a)** bosque de baja elevación, en San Carlos de Bariloche, **b)** bosque de mediana elevación, cerca de Esquel, **c)** estepa altoandina de Esquel, y **d)** estepa de Calafate

a) Bosque Bariloche



b) Bosque Esquel



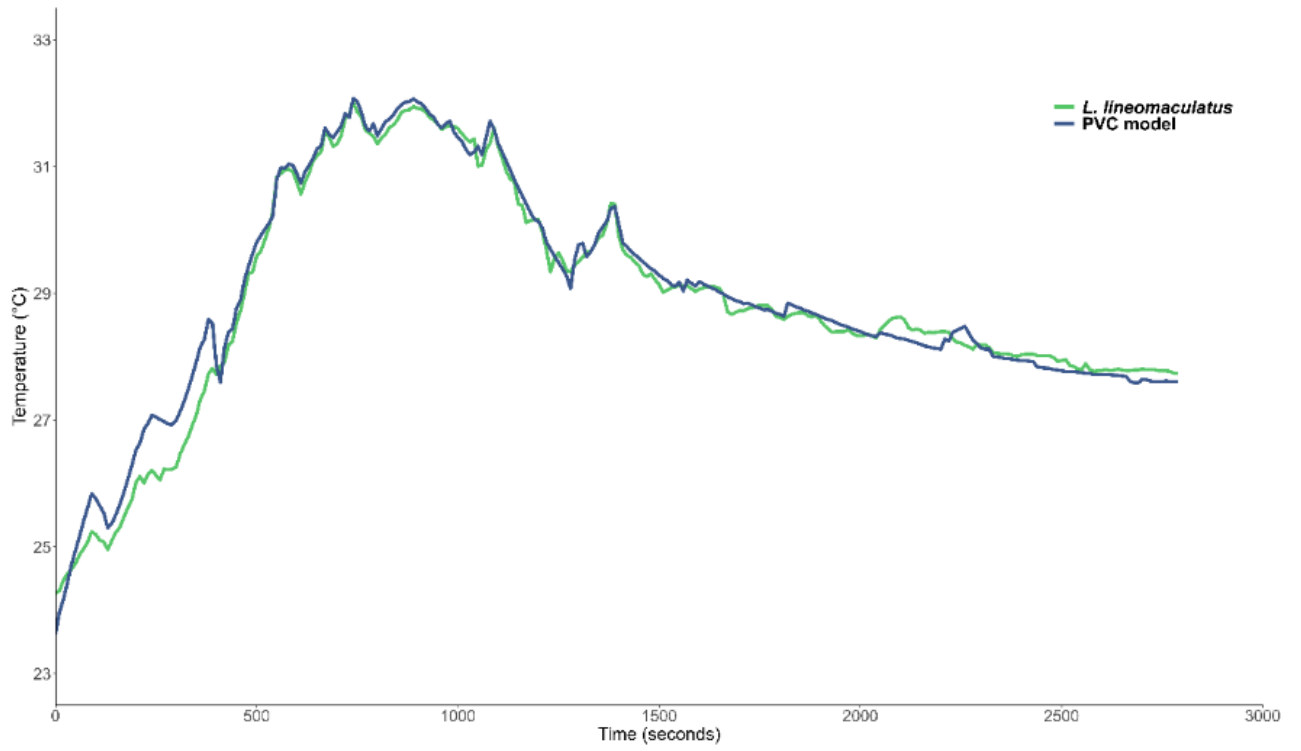
c) Estepa Esquel



d) Estepa Calafate



Figura suplementaria 2. Calibración del modelo de PVC (línea azul) correspondiente a *Liolaemus lineomaculatus* (línea verde).



Liolaemus pictus* y *Liolaemus lineomaculatus

“En este mundo, sólo el invierno es seguro.”

George R.R. Martin

Resultados parciales de este capítulo han sido publicados en:

Cecchetto, N. R., Medina, S. M., Taussig, S., & Ibarzüengoytía, N. R. (2019). The lizard abides: cold hardiness and winter refuges of *Liolaemus pictus argentinus* in Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Zoology*, 97(9), 773-782.

Cecchetto, N. R., Medina, S. M., Baudino, F., & Ibarzüengoytía, N. R. (en revisión). Wintertime tales, how the lizard *Liolaemus lineomaculatus* endures the temperate cold climate of Patagonia, Argentina.

En hábitats templados, polares y montañosos, los lagartos deben pasar la mitad o más de su vida haciendo frente a desafíos relacionados con las bajas temperaturas ambientales y los factores de estrés asociados con el invierno (Medina & Ibarguengoytía 2010). Incluso cuando las temperaturas ambientales son superiores a 0°C, el clima frío puede tener un efecto negativo en los umbrales de actividad. Las temperaturas inferiores al Mínimo Térmico Crítico (CT_{Min})" (*sensu* Cowles & Bogert 1944) impiden a los animales escapar de los depredadores (Christian & Tracy 1981) o forrajear para obtener reservas energéticas para la hibernación (Tattersall et al. 2012). En estos ambientes con climas fríos se han descrito diversos mecanismos para sobrevivir a las bajas temperaturas invernales, que permiten evitar daños irreparables causados por las bajas temperaturas, como los provocados por la formación de cristales de hielo dentro de las membranas celulares (Costanzo & Lee 1995). Así, cuando las temperaturas alcanzan valores inferiores a 0°C, los lagartos pueden responder adoptando uno de los dos mecanismos fisiológicos comúnmente utilizados por vertebrados terrestres que viven en este tipo de ambientes: la “tolerancia al congelamiento” o la evitación del congelamiento, mediante “superenfriamiento.”

La “tolerancia al congelamiento” es un mecanismo a través del cual el animal sobrevive a la conversión de fluidos corporales en cristales que permanecen en forma sólida durante un período de tiempo variable, ha sido observada en diversos taxa de herpetozoos como anfibios anuros y urodelos (Schmid 1982; Berman et al. 1984), serpientes (Costanzo et al. 1988), lagartos (Claussen et al. 1990) y tortugas (Costanzo et al. 1995b). Existe, además, una gran variación entre especies y poblaciones en cuanto a grado relativo de congelamiento de los fluidos corporales, duración del congelamiento, y la tolerancia a los episodios de congelación y descongelación (Voituron et al. 2002b; Berman et al. 2016). Mientras tanto, mediante el “superenfriamiento,” el individuo "puede permanecer descongelado a temperaturas inferiores a la temperatura de cristalización de equilibrio de sus fluidos corporales" (Costanzo et al. 1995c). Este mecanismo implica un menor estrés fisiológico que la tolerancia al congelamiento (Costanzo et al. 2008), pero las soluciones superenfriadas son metaestables (Sømme 1982), y existe el riesgo de congelación espontánea a temperaturas inferiores al punto de congelación de equilibrio (Salt 1966). Así, el congelamiento espontáneo puede tener consecuencias potencialmente letales (Storey & Storey 1996), y existe también el riesgo de cristales de hielo entrando en contacto con el animal, provocando la cristalización de los fluidos internos, si bien algunos animales cuentan con adaptaciones en el tegumento para

evitarlo (Willard et al. 2000). Algunos mecanismos alternativos al superenfriamiento dentro de la estrategia de evitación al congelamiento son la vitrificación, un proceso en el cual los fluidos corporales pasan a un estado amorfo, caracterizado por la rápida ordenación de las moléculas al enfriarse a temperaturas extremas (Sformo et al. 2010); y la deshidratación crioprotectora, común en diversos grupos de invertebrados que pasan el invierno en sustratos congelados (Holmstrup et al. 2002). La deshidratación suele acompañar también al superenfriamiento cuando el animal se encuentra rodeado de hielo, ya que la presión de vapor del agua superenfriada es mayor que la del hielo, con lo cual el agua tiende a salir del cuerpo no congelado hasta que la presión de vapor interna alcanza la de su entorno congelado. A pesar de sus diferencias, tanto la tolerancia al congelamiento como la evitación del congelamiento requieren una temperatura estable para mejorar las posibilidades de supervivencia de los individuos que invernan (Pauli et al. 2013).

Las poblaciones de una misma especie que viven en entornos con climas diferentes pueden desarrollar diferentes capacidades para resistir el frío, incluso si la separación geográfica (como, por ejemplo, en latitud o elevación) no es grande; sin embargo, no hay una pauta o correlación clara. Algunos estudios muestran un efecto de la latitud o la elevación en los parámetros de resistencia al frío de los ectotermos terrestres, como CT_{Min} (Tsuji 1988), si bien cabe aclarar que la latitud puede no tener relación directa con la temperatura ambiental, ya que pueden darse efectos microclimáticos que amortigüen el cambio a nivel macro (Cruz et al. 2005). Por otro lado, se observaron cambios entre poblaciones del gecko de Darwin (*Homonota darwinii*) en los valores de CT_{Min} , de manera correlacionada con la temperatura ambiental de dichas poblaciones, pero no se encontró ningún patrón en relación con la latitud (Weeks & Espinoza 2013). Además, también hay estudios que muestran diferencias interpoblacionales en las capacidades de resistencia al frío que no pudieron explicarse por la severidad del invierno en las condiciones ambientales actuales (Michels-Boyce & Zani 2015), diferencias que se explican mejor por otros factores como aclimatación experimental, humedad ambiental, modo de reproducción (Spellerberg 1972; Costanzo et al. 2004; Voituron et al. 2004), o incluso ninguna diferencia en absoluto entre poblaciones viviendo en climas contrastantes (Gvozdík & Castilla 2001; Yang et al. 2008).

En los bosques y estepas de Patagonia, Argentina, la temperatura desciende a valores de congelación por períodos prolongados (de horas a días) durante los meses fríos de otoño e invierno, y la capa de nieve puede alcanzar una altura considerable (>1m), especialmente en ambientes ubicados en altas elevaciones o latitudes. Los estudios sobre la supervivencia de los

lagartos en la Patagonia a bajas temperaturas están mayormente relacionados con las temperaturas mínimas voluntarias y críticas (CT_{Min}) que los lagartos soportan sin comprometer su integridad física con ajustes fisiológicos (por ejemplo, *Homonota darwini*; Espinoza & Tracy 1997) o con la selección conductual de microambientes más cálidos (*Phymaturus tenebrosus*; Ibarzüengoytía 2005). En este capítulo, se analizó la resistencia al frío a través de mecanismos fisiológicos para *Liolaemus pictus*, una especie que se distribuye en los Andes patagónicos de Neuquén, Río Negro y Chubut (39-43°S y 520-1600 msnm, Scolaro 2005) y de *L. lineomaculatus*, que vive en los altos Andes del noroeste de la Patagonia en la provincia de Neuquén (39°S), en elevaciones de hasta 1800 msnm, hasta las tierras bajas de la provincia de Santa Cruz (400 msnm 51°S; Cei 1988; Scolaro 2005).

Proponemos las siguientes hipótesis:

H1) Las especies de lagartijas de ambientes con climas frío o templado-frío poseen mecanismos de tolerancia al frío, tales como la tolerancia al congelamiento o el superenfriamiento para poder sobrevivir los meses más fríos del año.

Predecimos que los lagartos patagónicos *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* se congelarán al ser expuestos a temperaturas inferiores a cero durante al menos 12 horas y que comenzarán a moverse lentamente cuando se incrementa la temperatura a valores por encima de su CT_{Min} , indicando tolerancia al congelamiento.

Alternativamente, estos lagartos patagónicos, al estar expuestos durante más de 12 horas a temperaturas inmediatamente superiores a la de cristalización, permanecerán sin congelarse y, si someten a temperaturas por encima de su CT_{Min} , comenzarán a moverse, indicando superenfriamiento.

H2) Tanto *Liolaemus pictus* como *L. lineomaculatus* han desarrollado respuestas fisiológicas bioquímicas que permitirán mecanismos de tolerancia al frío.

De esta manera, se predice que la exposición experimental a temperaturas bajo cero por más de 12 horas induce a que los individuos *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* muestren un aumento en la concentración plasmática de moléculas potencialmente crioprotectoras (urea, glucosa, lactato, proteínas totales), con respecto a individuos que no fueron expuestos a tales temperaturas extremadamente bajas.

H3) La capacidad de resistencia al frío varía intraespecíficamente entre distintas poblaciones de lagartijas y la resistencia al frío aumenta con la elevación y/o con la latitud.

A partir de esta hipótesis, se predice que las poblaciones de *Liolaemus pictus* y de *L. lineomaculatus* que ocupan los hábitats más fríos (el bosque de mediana elevación en Esquel para *L. pictus* y la estepa de Calafate para *L. lineomaculatus*) presentan valores de punto de superenfriamiento y de CT_{Min} menores que aquellas poblaciones de climas menos rigurosos (bosque de baja elevación de San Carlos de Bariloche y estepa altoandina de Esquel).

Materiales y métodos

Áreas de estudio y métodos de campo

Se capturaron lagartijas de *L. pictus* y *L. lineomaculatus* en los **cuatro** sitios de muestreo, todos adultos machos a los fines de simplificar lo más posible los análisis bioquímicos posteriores, dado que era el primer estudio de este tipo que se hacía para estas especies. Los sitios fueron: **1)** los bosques de baja elevación, en San Carlos de Bariloche ($41^{\circ} 7' S$, $71^{\circ} 23' O$, 780 msnm, marzo 2020, $n = 20$); **2)** los bosques de mediana elevación, en una montaña cerca de Esquel ($42^{\circ} 49' S$, $71^{\circ} 15' W$; 1100 - 1400 msnm, abril 2016, $n = 17$); **3)** la estepa altoandina, en la misma montaña de Esquel ($42^{\circ} 49' S$, $71^{\circ} 15' W$; 1800 msnm, marzo 2019, $n = 19$); y **4)** la estepa de Calafate ($50^{\circ} 15' S$, $71^{\circ} 29' O$; 450 msnm.; fines de febrero 2018, $n = 20$). Los lagartos fueron capturados a mano o con un lazo, y se midió la temperatura corporal (T_b) inmediatamente después de la captura, utilizando un termómetro digital ($\pm 0,1^{\circ}C$; Omega 871A, termopar tipo K 9; Stanford, CT) conectado a una sonda de catéter introducida aproximadamente 1 cm dentro de la cloaca. Se manipularon a los lagartos por la cabeza y la cadera para poder tomar la temperatura dentro de los 10 segundos de la captura y así evitar la transferencia de calor de la mano al individuo.

Todos los lagartos utilizados para estos experimentos se capturaron con permisos de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Provincia de Río Negro (Resolución # 1255-2019), la Dirección de Fauna Silvestre de la Provincia de Chubut (Permiso # 0460/16 MP; Disposición # 11/2016; Disposición # 23/ 2019) y la Dirección de Fauna Silvestre de la Provincia de Santa Cruz (Expediente # 492.337/17; Disposición # 20).

Al realizar los experimentos, se siguieron los lineamientos de ASIH/HL/SSAR para el manejo de anfibios y reptiles vivos, así como las regulaciones detalladas en la Ley Nacional

Argentina #14346. Se decidió el sacrificio de los individuos considerando que el volumen mínimo de sangre requerido para poder detectar cambios en la concentración de todas las variables bioquímicas seleccionadas (urea, glucosa, lactato, proteínas totales, albúmina) requería que los ejemplares fueran sacrificados. Luego de haber realizado un experimento por especie en el cual no se detectaron cambios en la mayoría de las variables bioquímicas seleccionadas, se decidió no seguir explorando las variables que no presentaron cambios en sus concentraciones. Esto permitió no sacrificar más animales, y se realizaron sólo punciones en la vena caudal que permitían obtener suficiente sangre como para detectar cambios en la glucosa, el lactato, o ambas, permitiendo devolver a los individuos al su sitio de captura después de los experimentos dado que todos los estudios se realizar en condiciones de máxima asepsia. Las metodologías para sacrificio empleadas fueron decapitación (en el caso de los individuos enfriados, decapitación luego de enfriamiento) y congelamiento (pequeñas submuestras con el propósito de determinar la capacidad de tolerar el congelamiento en la especie). La decapitación se encuentra dentro de las recomendaciones de guías para la eutanasia de animales por ser las menos cruentas, como la “Guía para cuidado y uso de animales de experimentación” emitida por INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Versión 1), la guía de la AVMA (American Veterinary Medical Association, 2020) y el congelamiento está propuesto como tal por numerosos científicos del mundo que trabajan con reptiles y anfibios (Lillywhite et al. 2017).

Experimentos de laboratorio

Se llevó los lagartos al laboratorio donde se midió la longitud hocico-cloaca (LHC) y la masa corporal (Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5), usando un calibre digital Vernier ($\pm 0,02$ mm) y la balanza Ohaus Scot Pro ($\pm 0,01$ g), respectivamente.

Todas las tasas de enfriamiento utilizadas en estos experimentos se basaron en una combinación entre las tasas de enfriamiento obtenidas a partir de los modelos de PVC de los lagartos colocados en los sitios de muestreo (ver Capítulo I) y los valores de tasas de enfriamiento de bibliografía (Tabla Suplementaria 1). Se utilizaron las tasas más lentas posibles en relación con lo que el lagarto estaría experimentando a campo para minimizar la posibilidad de un *shock* térmico por tasas demasiado rápidas (Costanzo et al. 1991a), pero evitando tasas que sean tan lentas que no reflejen lo que sucede en sus potenciales refugios.

Se comenzaron los experimentos con una prueba de punto de superenfriamiento (PSE) para la población de *Liolaemus pictus* de bosque de baja elevación, en San Carlos de Bariloche y para ambas poblaciones de *L. lineomaculatus* (como se indicó en materiales y métodos, para la población de *L. pictus* de bosque de mediana elevación esta prueba no se pudo realizar). Se conectaron los lagartos a un Módulo de Adquisición de Datos Omegas TC-08 (Termopar USB de 8 canales, $\pm 0,01^\circ\text{C}$) por medio de termocuplas ultrafinas (1 mm), para registrar la temperatura corporal. Dichas termocuplas se colocaban fijas en el abdomen y no dentro de la cloaca, siguiendo las indicaciones de Costanzo et al (2008), donde indica que se debe evitar colocar las termocuplas en cloaca a temperaturas debajo de 0°C , ya que pueden iniciar el congelamiento. Se seleccionaron dos pequeños subconjuntos de animales ($n_{\text{bosque de baja elevación, San Carlos de Bariloche}} = 5$; $n_{\text{estepa altoandina, Esquel}} = 6$; $n_{\text{estepa, Calafate}} = 5$; Tabla Suplementaria 2, Tabla Suplementaria 3) y se determinaron los PSE. Se colocaron los lagartos individualmente en contenedores de plástico seco, ubicados en un congelador vertical con puerta de vidrio al cual se le realizó una modificación con un Arduino que permitía regular tasas de enfriamiento a 18°C durante 30 minutos (hasta que se alcanzó la estabilidad y las T_b llegaron a 18 grados). La prueba de PSE consistió en una primera etapa, en la que los lagartos se enfriaron de 18°C a 0°C a una tasa estable de $-0,5^\circ\text{C}\cdot\text{hora}^{-1}$ (esta etapa duró 36 horas). Más tarde, los lagartos continuaron enfriándose a una tasa de $-0,25^\circ\text{C}\cdot\text{hora}^{-1}$ hasta que se alcanzó una reacción exotérmica en cada lagarto (es decir, hasta que todos los lagartos mostraron un episodio de congelamiento, evidenciado por un pico de temperatura generado por la reacción exotérmica de la cristalización de los fluidos corporales que se podía observar en el dispositivo de toma de datos de temperatura). Entonces, la temperatura más baja (es decir, la temperatura correspondiente a la última reacción exotérmica) se mantuvo durante 12 horas para asegurar el congelamiento total del cuerpo. Finalmente, los lagartos se descongelaron lentamente a una tasa de $2,5^\circ\text{C}\cdot\text{hora}^{-1}$, hasta que alcanzaron por lo menos los valores de CT_{Min} de cada población, y luego se sacaron del congelador y se comprobaron sus signos vitales (protocolo adaptado de Costanzo et al. 2008; Berman et al. 2016; Storey & Storey 2017). Esta prueba permite establecer si estos lagartos son tolerantes al congelamiento, al tiempo que proporciona el punto de superenfriamiento, entendido como la temperatura más baja antes de un pico de congelamiento, que indica la liberación del calor latente de cristalización (*sensu* Costanzo et al. 2008).

Para determinar el mínimo térmico crítico (CT_{Min}), adaptando el protocolo de Vicenzi et al (2017), se colocó a los lagartos individualmente en contenedores de plástico transparente ($15 \times 10 \times 5$ cm) en un congelador vertical con puerta de vidrio al cual se le realizó una modificación con un Arduino que permitía regular tasas de enfriamiento. Luego, se bajó la temperatura de la temperatura ambiente ($\sim 20^\circ\text{C}$) a 0°C a una tasa estable de $1^\circ\text{C} / 5$ min como parte de la prueba de enfriamiento. Para medir la temperatura corporal, se conectaron los lagartos a un Módulo de Adquisición de Datos Omegas TC-08 (termocuplas USB de 8 canales, $\pm 0,01^\circ\text{C}$) por medio de una termocupla ultrafina (0,08 mm) con mediciones cada segundo que se fijó a la cloaca de cada individuo. Se observó a lagartijas durante todo el experimento y, tan pronto como empezaron a alcanzar valores de $\sim 7^\circ\text{C}$, la temperatura corporal a la que el individuo ya no era capaz de enderezarse cuando se le colocaba sobre su región dorsal se registró como CT_{Min} .

Pruebas de enfriamiento

El grupo de lagartos que se sometió a enfriamiento (grupo enfriado) se colocó individualmente en contenedores de plástico seco colocados en un congelador, mientras que el grupo de control se colocó individualmente en contenedores de plástico seco colocados en un dispositivo similar al congelador pero a temperatura ambiente (20°C). Las temperaturas del grupo enfriado se regularon mediante una perilla en el congelador que permitió establecer tasas y tiempos de enfriamiento específicos (ver Fig. 12 y 13 como ejemplos de esta metodología). Esta metodología se utilizó para todos los experimentos de este tipo, con la excepción del experimento de los individuos de *L. pictus* provenientes del sitio de mediana elevación (Esquel), ya que no se contaba en el momento con dicho congelador (Fig. 12 sin el congelador, Fig. 13 con el congelador).

Para este primer experimento de los individuos de *Liolaemus pictus* del bosque de mediana elevación, se adaptó la metodología de (Michels-Boyce & Zani 2015), y las temperaturas del grupo enfriado se regularon añadiendo hielo y sal de mesa (NaCl) al agua contenida en una heladera de campo en donde se encontraban los contenedores de plástico con las lagartijas (controlando cuidadosamente que el agua no ingrese a los contenedores), para bajar las temperaturas, y agua a temperatura ambiente para atenuar las tasas de enfriamiento cuando eran demasiado frías (ver Fig. 12 como ejemplo de esta metodología). Se

conectaron los lagartos a un Módulo de Adquisición de Datos Omegas TC-08 (Termopar USB de 8 canales, $\pm 0,01^\circ\text{C}$) por medio de termocuplas ultrafinas (1 mm), para registrar la temperatura corporal en ambos grupos durante el experimento de enfriamiento. Dichas termocuplas se colocaban fijas en el abdomen y no dentro de la cloaca, siguiendo las indicaciones de Costanzo et al. (2008), donde indica que se debe evitar colocar las termocuplas en cloaca a temperaturas debajo de 0°C , ya que pueden iniciar el congelamiento. Se colocó también un modelo de lagarto de PVC (del mismo tipo que los utilizados en el Capítulo I) en otro recipiente de plástico y se expuso a las mismas fluctuaciones de temperatura que los lagartos del grupo enfriado.

Se realizó el experimento basado en los protocolos detallados en Costanzo et al. 2008; Berman et al. 2016; Storey & Storey 2017, pero modificados mediante la división en **tres** etapas, considerando que los lagartos están normalmente expuestos a las fluctuaciones de la temperatura del aire con disminuciones suaves y períodos prolongados que rondan los 0°C en otoño e invierno, como se vio en *Zootoca vivipara* (Grenot et al. 2000; Costanzo et al. 2008). En la **primera etapa (de 20°C a 0°C)**, se enfrió a los individuos desde la temperatura inicial experimental (20°C) a 0°C durante 6 horas, a una tasa de $-3^\circ\text{C}\cdot\text{hora}^{-1}$. En el caso del experimento de los individuos de *Liolaemus pictus* del sitio de bosque de mediana elevación, los individuos partieron de 15°C y llegaron a 0°C durante 6 horas a una tasa de aproximadamente $-2,5^\circ\text{C}\cdot\text{hora}^{-1}$. En la **segunda etapa (Durante la noche)**, los lagartos permanecieron a aproximadamente 0°C durante 12h. Finalmente, para la **tercera etapa (Bajo 0°C)**, se utilizaron temperaturas finales y tasas de enfriamiento que variaron según los valores obtenidos de los análisis de los potenciales refugios (Capítulo I), intentando utilizar temperaturas mínimas que reflejaran lo que durante ese año habían experimentado los animales en su ambiente natural. Para la población de *L. pictus* de bosque de baja elevación, en San Carlos de Bariloche, se bajó la temperatura del congelador a una tasa de aproximadamente $-0,75^\circ\text{C}\cdot\text{hora}^{-1}$ hasta $\sim -6^\circ\text{C}$ (dado que en el análisis de los potenciales refugios no se encontraron valores bajo cero, se utilizó como punto de referencia el PSE calculado para la población como temperatura mínima), y manteniendo esta temperatura durante 6 horas. Para la población de *L. pictus* de bosque de mediana elevación, cerca de Esquel, se utilizaron una tasa de $-1^\circ\text{C}\cdot\text{hora}^{-1}$, llegando a entre -3°C y -5°C , manteniendo estas temperaturas por entre 0,5 y 1,5 horas.

Para las poblaciones de *Liolaemus lineomaculatus* de estepa altoandina de Esquel y estepa de Calafate, se utilizaron al igual que para el bosque de baja elevación una tasa de -

0,75°C*hora⁻¹, llegando hasta ~-6°C para los individuos de Esquel y hasta ~-8°C para los de Calafate. Los valores finales de esta etapa para las poblaciones de estepa altoandina y estepa se eligieron en un principio observando el valor más bajo obtenido para cada población en el análisis de las temperaturas ambientales; sin embargo, como los valores estaban por debajo del PSE de ambas poblaciones, se seleccionó un valor más cercano al PSE y luego se mantuvo esa temperatura durante 6 horas. Luego se midieron los cambios bioquímicos y se calentaron lentamente los lagartos de todas las poblaciones a temperatura ambiente.

Experimentos complementarios

Los lagartos de *Liolaemus lineomaculatus* del grupo enfriado de estepa altoandina de Esquel fueron encontrados muertos después del experimento, posiblemente por no poder superenfriarse. Por lo tanto, el grupo de control se dividió en dos y el experimento se repitió utilizando los mismos protocolos pero en la etapa final (Bajo 0°C) se utilizó un valor más alto que el PSE más bajo detectado para esa población, -4°C, y la temperatura se mantuvo durante menos tiempo (3 horas en lugar de 6), para asegurar la supervivencia de los individuos. Esta metodología de invertir los individuos enfriados y los controles también se realizó para los individuos de *L. pictus* provenientes del bosque de baja elevación, en San Carlos de Bariloche dado que las metodologías fueron perfeccionándose durante el transcurso de la tesis y esta fue la última población estudiada.

Al principio de los experimentos, se observó a los lagartos para determinar el mínimo térmico crítico (CT_{Min}; Tabla 3, pérdida de respuesta de enderezamiento *sensu* Doughty 1994). Se evaluó el CT_{Min} sacando rápidamente a los lagartos de los contenedores y colocándolos sobre su región dorsal tan pronto como empezaron a alcanzar valores de ~7°C. Si el animal era capaz de enderezarse a sí mismo, se le colocaba de nuevo para que continuara enfriándose y se repetía el proceso hasta que se encontraba el valor de CT_{Min}. Para controlar un efecto potencial de la manipulación en los individuos, como una liberación de glucosa causada por una respuesta simpática, se manipuló a todos los individuos de control de la misma manera que el grupo de tratamiento. Para la población de *Liolaemus pictus* de bosque de baja elevación no se determinó experimentalmente el CT_{Min}, ya que se contaba con el valor promedio de una población del mismo ambiente, obtenido en un experimento previo utilizando la misma metodología por este grupo de investigación (Kubisch et al. 2011).

Al final de los experimentos, inmediatamente después de la extracción de los individuos del congelador, se sacrificaron los lagartos por decapitación y luego, las muestras de hígado y corazón de cada individuo fueron almacenadas individualmente en tubos Eppendorf y guardadas en un congelador hasta que fueron analizadas al día siguiente.

Análisis bioquímicos

Se analizó una muestra de hígado y de corazón por individuo (para los individuos de *Liolaemus pictus* del bosque de mediana elevación se analizó un homogeneizado de ambos, para el experimento posterior de los individuos de *L. lineomaculatus* de la estepa, se analizaron por separado). Se homogeneizaron todas las muestras manualmente con un mortero, diluido con solución salina fisiológica (9% V/V) en una dilución 1:4, y luego las se colocaron en tubos Eppendorf para ser centrifugadas a 3200 rpm durante 10 min. Después, se usaron los tubos en una prueba de espectroscopia de absorción con ensayos enzimáticos, probando para: urea, proteínas totales y albúmina. Se hizo la selección de los crioprotectores analizados en este estudio considerando las variables bioquímicas que se encontraron relevantes en estudios previos de endurecimiento en frío en reptiles (Costanzo et al. 2000; Grenot et al. 2000; Voituron et al. 2002; para la urea, la glucosa y las proteínas anticongelantes -AFPs-, respectivamente) y en anfibios (Storey & Storey 1986; para las AFP). Se infirió la presencia de AFPs considerando las diferencias entre las proteínas totales y la albúmina en el homogeneizado, teniendo en cuenta que un aumento de las proteínas totales sin un aumento correspondiente de la albúmina apuntaría a proteínas relacionadas con el experimento de enfriamiento (aunque no necesariamente a AFPs). Para el homogeneizado proveniente del experimento de bosque de mediana elevación, se determinaron todos los parámetros del sobrenadante utilizando un analizador de química clínica INCCA v2.05.01 (DICONEX) con una prueba de espectroscopia de absorción con ensayos enzimáticos y reactivos químicos (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Para el resto de los experimentos, dado que ya no se contaba con dicho dispositivo, se determinaron todos los parámetros del sobrenadante utilizando un espectrómetro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Inc., Kyoto, Japón) con una prueba de espectroscopia de absorción con ensayos enzimáticos y reactivos químicos (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Los kits utilizados fueron UV AA de urea cinética, AA de proteínas totales y AA de albúmina. Previamente se reprogramaron los métodos de los kits bioquímicos en relación con las proporciones y los valores de calibración, para incluir los valores de las muestras en la curva de calibración estándar y obtener resultados fiables. Este

protocolo se basó en los trabajos de Costanzo et al. (2000), Grenot et al. (2000), Voituron et al. (2002) y Storey & Storey (1986), con modificaciones para los instrumentales y volúmenes disponibles con la asistencia del bioquímico S. Taussig, y las CPA del Laboratorio de INBIOMA M. Molina, G. Reiner y M. Langenheim.

Dada la falta de evidencia de cambios significativos en los componentes bioquímicos seleccionados después del experimento de estepa de Calafate y del experimento previo con *Liolaemus pictus* de bosque de mediana elevación, los análisis para los individuos de *L. lineomaculatus* de estepa altoandina de Esquel se enfocaron sólo en la glucosa y el lactato, los cuales se podían obtener de una sola punción en la vena cloacal y no requerían el sacrificio de individuos. Para los individuos de *L. pictus* de bosque de baja elevación los análisis se enfocaron sólo en la glucosa por los mismos motivos y porque para dichos experimentos no pudimos conseguir en el país las tiras de medición de lactato para el dispositivo utilizado y no hubo tiempo para obtener dichas tiras en el exterior.

Glucosa y lactato en sangre

Se midió la glucosa tomando una gota de sangre de la vena caudal cerca de la cloaca, antes y después del experimento, utilizando un glucómetro (Accu-Chek® Performa Nano, con un rango de 10 mg/dL - 600 mg/dL), siguiendo la metodología de Voituron et al. 2002.

Se calculó el cambio de glucosa (porcentaje) o el cambio de glucosa ajustado (AGluc) para tener en cuenta la diferencia de los valores iniciales de glucosa, dada su dieta desigual procedente del campo, utilizando la siguiente fórmula que se adaptó del cambio de temperatura ajustado utilizado en Ibarzüengoytía (2000):

$$\text{AGluc} = ((\text{Gluc}_f - \text{Gluc}_i) / \text{Gluc}_i) * 100$$

Donde Gluc_f era la glucosa al final del experimento y Gluc_i era la glucosa al inicio.

Se midió el lactato usando otra gota de sangre de la vena caudal cerca de la cloaca (de la misma punción hecha para la medición de la glucosa), antes y después del experimento, usando un lactómetro (Lactate Scout+, SensLab GmbH, Alemania, con un rango de 0,5 – 25,0 mM). Los pequeños volúmenes de sangre que se pudo obtener de los lagartos sin dañar a los animales sólo permitieron dos mediciones en cada individuo, una para la glucosa y otra para el lactato.

También se calculó el cambio (porcentaje) para el lactato, o el cambio de lactato ajustado (ALac) para tener en cuenta la diferencia de los valores iniciales del lactato, usando la siguiente fórmula:

$$ALac = ((Lac_f - Lac_i) / Lac_i) * 100$$

Donde Lac_f era el lactato al final del experimento y Lac_i al inicio.

Análisis estadísticos

Se hicieron comparaciones de glucosa y lactato (variables respuesta) para cada individuo antes y después del experimento de enfriamiento usando una prueba *t* de Student apareada, y comparaciones posteriores usando ANCOVAS entre grupos de control y experimentales (variable predictora), con el índice de condición corporal (ICC) como covariable, considerando un alfa de significación de 0,05 (Zuur et al. 2009).

Se analizó la variabilidad en los tamaños y pesos corporales usando el índice de condición corporal (ICC), calculado como:

$$ICC = M_i * [LHC_0 / LHC_i]^{b_{SMA}}$$

Donde M_i y LHC_i son la masa y LHC del individuo, LHC_0 es la media aritmética LHC de la población, y b_{SMA} es la pendiente del eje mayor estandarizada de la regresión de \ln masa corporal sobre \ln LHC para la población (*sensu* Peig & Green 2009). El exponente b_{SMA} se calculó usando el paquete 'lmodel2' (Legendre 2014) en R, versión 3.5.3 (R Core Team 2019). El índice elegido pareció apropiado para los análisis dada la gran estabilidad del mismo ante distintas escalas de masa corporal (Peig & Green 2009), especialmente considerando que ambas especies analizadas son relativamente pequeñas y no superan los 10 gramos.

Todos los demás análisis utilizando el mismo software, con los paquetes 'nlme' (Pinheiro et al. 2017) y 'car' (Fox & Weisberg 2011). El umbral de significación para los valores de *p* se fijó en 0,05 (alfa = 0, 05).

Tamaño corporal (LHC), peso e índice de condición corporal (ICC)

El tamaño corporal de *Liolaemus pictus* abarcó entre 53,4 y 67,62 mm para los individuos del bosque de baja elevación y entre 49,42 y 57,13 mm para los individuos del bosque de mediana elevación; la masa corporal fue entre 4,02 y 8,16 g para los individuos del bosque de baja elevación, y entre 2,9 y 4,8 g para los individuos del bosque de mediana elevación. El ICC de la población del bosque de baja elevación no difirió entre los individuos control (media \pm DE = 5,95 \pm 0,66) y los enfriados (media \pm DE = 5,78 \pm 0,72) (ANOVA: $F_{1,18}=0,28$; $p=0,60$; Tabla 3). Tampoco se hallaron diferencias en el ICC de los individuos del bosque de mediana elevación cuando se comparó individuos control (media \pm DE = 3,72 \pm 0,30) con los enfriados (media \pm DE = 3,78 \pm 0,41) (ANOVA: $F_{1,15}=0,12$; $p=0,74$; Tabla 4). Se encontraron diferencias significativas en el ICC entre los individuos de *L. pictus* del bosque de baja elevación (media \pm DE = 5,86 \pm 0,68) y del bosque de mediana elevación (media \pm DE = 3,75 \pm 0,36; prueba *t* de Student: $t_{1,30}=12,1$; $p<0,001$; Tabla 3 y Tabla 4).

El tamaño corporal de *L. lineomaculatus* osciló entre 41,79 y 57,19 mm para los individuos de estepa altoandina y entre 50,13 y 60,74 mm para los de estepa y; la masa corporal osciló entre 3,01 y 5,66 g para los individuos de estepa altoandina y entre 3,67 y 6,57 g para los de estepa. El ICC de la población del bosque de baja elevación no difirió entre los individuos control (media \pm DE = 4,03 \pm 0,31) y los individuos enfriados (media \pm DE = 3,92 \pm 0,70) de estepa altoandina (ANOVA: $F_{1,17}=0,054$; $p=0,818$) o entre los controles (media \pm DE = 4,80 \pm 0,39) y los individuos enfriados (media \pm DE = 4,87 \pm 0,427) de estepa (ANOVA: $F_{1,18}=0,183$; $p=0,674$, Tabla 5). Se encontraron diferencias significativas en el ICC entre los individuos de *L. lineomaculatus* de estepa altoandina (media \pm DE = 3,98 \pm 0,54) y de estepa Calafate (media \pm DE = 4,83 \pm 0,4; prueba *t* de Student: $t_{1,35}=5,74$; $p<0,001$; Tabla 5).

Punto de superenfriamiento (PSE) y mínimo térmico crítico (CT_{Min})

Los ejemplares de *Liolaemus pictus* del bosque a baja elevación, en San Carlos de Bariloche, tuvieron reacciones exotérmicas a una temperatura media de $-5,31 \pm 1,59^{\circ}\text{C}$ (media \pm DE). Excluyendo a un individuo que estaba mudando cuando se lo puso en el congelador, que tuvo una reacción considerablemente más cercana a 0°C , la reacción exotérmica

promedio cambiaría a $-6,00 \pm 0,45^{\circ}\text{C}$ (Tabla Suplementaria 2). Ningún lagarto sobrevivió al lento descongelamiento después de las reacciones exotérmicas.

Liolaemus pictus tuvo un CT_{Min} que varió entre $3,02$ y $7,60^{\circ}\text{C}$ en los individuos de la población del bosque a mediana elevación (Tabla 3). La población de *L. pictus* del bosque de baja elevación, obtenido por Kubisch et al (2011), fue de $6,9 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ (media \pm DE) y no hubieron diferencias significativas entre las diferentes poblaciones (prueba t de Student: $t_{1;10} = 1,42$; $p=0,19$).

Los lagartos de la especie *Liolaemus lineomaculatus* de la estepa altoandina de Esquel, mostraron reacciones exotérmicas de congelamiento a una temperatura media de $-5,80 \pm 0,82^{\circ}\text{C}$ (media \pm DE), menores que el punto de superenfriamiento de los lagartos de la estepa de Calafate de $-7,54 \pm 0,49^{\circ}\text{C}$ (media \pm DE; prueba t de Student: $t_{1;8} = 4,34$; $p=0,002$ Tabla Suplementaria 3). Ningún lagarto de las poblaciones de *L. lineomaculatus* analizadas sobrevivió al lento descongelamiento después de las reacciones exotérmicas.

Los lagartos de *Liolaemus lineomaculatus* provenientes de la estepa altoandina mostraron un CT_{Min} que varió entre $3,97$ y $6,21^{\circ}\text{C}$, y entre $2,23$ y $5,86^{\circ}\text{C}$ para los individuos provenientes de la estepa de Calafate. El CT_{Min} de los individuos de la estepa cerca de Calafate (media \pm DE = $4,30 \pm 1,29$) fue más bajo que el CT_{Min} de los individuos de la estepa altoandina de Esquel (media \pm DE = $5,10 \pm 0,61$; ANOVA: $F_{1;23} = 4,50$; $p=0,004$; Tabla 4).

Determinación de capacidad de superenfriamiento y análisis bioquímicos relacionados

Ningún individuo mostró una reacción exotérmica durante ninguno de los experimentos de enfriamiento para todas las poblaciones evaluadas, ni en *Liolaemus pictus* ni en *L. lineomaculatus*. Tampoco se encontró hielo ni signos evidentes de congelamiento después de sacar los lagartos de los contenedores de plástico (como la rigidez de los animales o un cambio en el color de su piel). Además, los individuos reaccionaron en los primeros 60 segundos después de sacarlos del congelador, habiendo estado 12 horas a 0°C y 6 horas en los PSE de cada población (con la excepción del primer experimento en el que estuvieron ~ 1 hora), aunque en un estado aparentemente letárgico, con movimientos lentos. Sin embargo, hubo una excepción en los lagartos del primer experimento de los individuos de Esquel, que se encontraron muertos luego de dicho experimento,

Para los individuos de *Liolaemus pictus* del bosque de baja elevación, en el primer experimento los controles tuvieron valores negativos del cambio de glucosa ajustada (media \pm

DE = $-14,61 \pm 17,47$ %) y los individuos que se enfriaron tuvieron valores positivos (media \pm DE = $32,34 \pm 25,13$ %; ANOVA: $F_{1; 18}=23,54$; $p>0,001$, Figura 14). En el segundo experimento, los controles también tuvieron valores negativos del cambio de glucosa ajustada (media \pm DE = $-10,47 \pm 22,80$ %) y los individuos que se enfriaron tuvieron valores positivos (media \pm DE = $29,73 \pm 17,36$ %; ANOVA: $F_{1; 18}=19,71$; $p>0,001$; Figura 15)

Para los individuos de *Liolaemus pictus* del bosque de mediana elevación, los controles tuvieron valores negativos de cambio de glucosa ajustada (media \pm DE = $-14,55 \pm 23,28$ %) y los individuos que se enfriaron, valores positivos (media \pm DE = $18,87 \pm 30,11$ %), utilizando el ICC como covariable significativa (ANCOVA: $F_{1; 15}=6,43$; $p=0,02$; Figura 16).

La urea, las proteínas totales y la albúmina, que se midieron sólo después de los experimentos de los individuos del bosque de mediana elevación, no mostraron diferencias significativas entre controles y los individuos enfriados (Tabla 6).

En los individuos de *Liolaemus lineomaculatus* provenientes de la estepa altoandina de Esquel, los controles del primer experimento tuvieron valores negativos de cambio ajustado de glucosa (media \pm DE = $-19,49 \pm 14,94$ %) y los individuos que se enfriaron mostraron valores positivos (media \pm DE = $26,68 \pm 28,43$ %), (ANOVA: $F_{1; 17}=18,95$; $p<0,001$). Para el segundo experimento, los individuos de control tuvieron también valores negativos de A_{Gluc} (media \pm DE = $-36,64 \pm 0,91$ %) y los individuos enfriados valores positivos (media \pm DE = $32,96 \pm 12,05$ %), utilizando el ICC como covariable significativa (ANCOVA: $F_{1; 6}=131,70$; $p<0,001$). Para el lactato ajustado, los individuos de control tuvieron aumentos más pequeños (media \pm DE = $12,16 \pm 76,19$ %) que los individuos enfriados (media \pm DE = $306,17 \pm 163,64$ %), (ANOVA: $F_{1; 17}=11,73$; $p<0,001$) en el primer experimento; mientras que en el segundo experimento, los individuos de control tuvieron valores negativos de A_{Lac} (media \pm DE = $-37,54 \pm 22,91$ %) y los individuos enfriados un aumento (media \pm DE = $201,83 \pm 131,17$; ANOVA: $F_{1; 7}=9,21$; $p=0,02$; Figura 17).

Para los individuos de la estepa de Calafate, hubieron diferencias significativas en el cambio de glucosa ajustada, donde los controles tuvieron valores negativos (media \pm DE = $-22,69 \pm 10,11$ %) y los individuos que se enfriaron tuvieron valores positivos (media \pm DE = $23,45 \pm 8,15$ %), (ANOVA: $F_{1; 18}=126,24$; $p<0,001$). Para el cambio de lactato ajustado, no se encontraron diferencias entre el control y los individuos enfriados (ANOVA: $F_{1; 18}=1,79$; $p=0,20$).

La urea, las proteínas totales y la albúmina, que se midieron sólo después de los experimentos de la estepa cerca de Calafate, no mostraron diferencias significativas entre los individuos controles y los enfriados (Tabla 6).

Discusión

Los lagartos de Patagonia pueden pasar gran parte de los meses más fríos del año brumando en refugios, evitando incurrir en grandes inversiones fisiológicas como la tolerancia al congelamiento o el superenfriamiento. Estos mecanismos de resistencia al frío son costosos desde un punto de vista energético, ya que utilizan glucosa, lípidos y moléculas que intervienen en la síntesis de proteínas que no podrían asignarse a otros procesos metabólicos.

Sin embargo, las heladas ocasionales y las grandes nevadas en los bosques y estepas de Patagonia amenazarían la persistencia de estos lagartos si no contaran con recursos fisiológicos para resistir las bajas temperaturas. Los individuos de *Liolaemus pictus* como los de *L. lineomaculatus* no toleraron el congelamiento como se había predicho, pero, en concordancia con la predicción alternativa, pudieron permanecer horas a temperaturas inmediatamente superiores a sus puntos de superenfriamiento (PSE) sin congelarse y reaccionando de manera inmediata al ser recalentados, indicando la capacidad de superenfriarse. Por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis que poseen mecanismos fisiológicos relacionados con la supervivencia al frío. Los resultados de los análisis bioquímicos para todas las poblaciones y especies mostraron cambios significativos en la concentración sólo para glucosa después de la exposición al frío, probablemente asociados a los mecanismos de resistencia al frío de manera indirecta, ya que el aumento de la concentración de glucosa hallado probablemente no sea suficiente para elevar la osmolaridad de manera ecológicamente significativa (Costanzo et al. 1991b), con lo cual se considera que la predicción relacionada a moléculas crioprotectoras no fue cumplida y se rechaza la hipótesis. Finalmente, en cuanto a la hipótesis relacionada a la variación intraespecífica en la capacidad de resistencia al frío, la respuesta fisiológica varió entre poblaciones como se detalla a continuación, probablemente respondiendo al régimen de temperaturas de los sitios en los que viven y, por ende, no se puede rechazar la hipótesis propuesta.

Los individuos de *Liolaemus pictus* provenientes del bosque de baja elevación, considerando que viven en el ambiente menos frío de los cuatro analizados, tuvieron un punto

de superenfriamiento relativamente bajo ($-5,3^{\circ}\text{C}$), similar al de *L. lineomaculatus* en la estepa altoandina ($-5,8^{\circ}\text{C}$; prueba t de Student: $t_{1;6} = 0,62$; $p=0,56$). Es interesante que un individuo que se encontraba mudando tuvo un PSE considerablemente mayor que el resto de los individuos ($-2,55^{\circ}\text{C}$). Es posible que agentes nucleantes (INAs) presentes en la piel mudada penetraran el organismo del animal a través de contacto con algún orificio o alguna herida expuesta en el epitelio nuevo, dado que los animales que son penetrados por agentes nucleantes pueden congelarse por nucleación heterogénea cuando la temperatura es lo suficientemente baja (Packard et al. 2001). Dado que hubo un solo individuo que se encontraba mudando durante los experimentos, esta explicación es mayormente especulativa, pero sería interesante a futuro realizar análisis de las mudas y profundizar en el tema. Por otro lado, los individuos de *L. pictus* provenientes del bosque de mediana elevación, cerca de Esquel, estuvieron a una temperatura mínima mayor y por menos tiempo que los de bosque de baja elevación, en parte por las dificultades y limitaciones de la metodología empleada en ese primer experimento (conseguir temperaturas inferiores a -3°C con sólo agua, hielo y sal se hizo muy difícil, y controlar las tasas de enfriamiento más aún), y en parte porque el protocolo de determinación de punto de superenfriamiento fue implementado luego de ese experimento, gracias a aportes y sugerencias de colegas revisores anónimos durante la elaboración del manuscrito correspondiente a ese experimento (Cecchetto et al. 2019). Cabe destacar que hay que considerar con precaución la existencia de diferencias entre los parámetros de enfriamiento de las poblaciones de *L. pictus*, teniendo en cuenta las diferencias metodológicas del primer experimento piloto realizado con respecto al resto de los experimentos, así como las diferencias en índice de condición corporal entre poblaciones.

Los individuos de *Liolaemus lineomaculatus* provenientes de la estepa altoandina de Esquel tuvieron un punto de superenfriamiento mayor ($5,8^{\circ}\text{C}$) que el de los individuos provenientes de la estepa de Calafate, ($-7,5^{\circ}\text{C}$), lo cual también sucedió con el CT_{Min} , también menor para la población de Calafate ($4,3^{\circ}\text{C}$) que para la población de la estepa altoandina de Esquel. De esta manera, parece existir una asociación en *L. lineomaculatus* entre la resistencia al frío y la severidad del clima o la calidad térmica de los potenciales refugios, como se esperaba. Los lagartos de la estepa, cerca de Calafate, donde los modelos de PVC de los lagartos fueron expuestos a temperaturas generalmente más frías (o con períodos de frío más frecuentes, Capítulo I) pudieron superenfriarse con un PSE más bajo que los lagartos de la estepa altoandina, cerca de Esquel, que no pudieron sobrevivir a la exposición a temperaturas inmediatamente superiores a su PSE (sin embargo, pudieron sobrevivir a la exposición a temperaturas inferiores a 0°C durante entre 12 y 18 horas, pero utilizando una metodología

menos rigurosa, con lo cual hay que considerar esta diferencia metodológica al realizar comparaciones).

El mínimo térmico crítico (CT_{Min}) difirió entre las poblaciones de *L. lineomaculatus*, en contraposición a las poblaciones de *L. pictus*. Esto es coherente con muchos estudios que muestran que el CT_{Min} para ectotermos como insectos y otras especies de lagartos varía entre ambientes con diferentes regímenes de frío (Hoffmann et al. 2002; Huang & Tu 2008; Moritz et al. 2012; Clusella-Trullas & Chown 2014), lo que sugiere que el CT_{Min} es fisiológicamente relevante y afecta directamente a la supervivencia en hábitats fríos y templados. Sin embargo, otros trabajos encontraron resultados que contradicen esta tendencia, similar a lo hallado en esta tesis para *L. pictus*, sugiriendo plasticidad limitada para la tolerancia al frío (Winne & Keck 2005; Du 2006; Yang et al. 2008). Los valores de CT_{Min} de ambas poblaciones de *L. pictus* y de *L. lineomaculatus* se encuentran en el extremo inferior de otros lioláemidos que viven en la Patagonia (entre 3,43 y 10,53 °C, Bonino et al. 2015; Kubisch et al. 2016).

Por otro lado, los puntos de superenfriamiento de valores obtenidos para *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* se sitúan en el mismo rango de valores de otros lagartos como *Uta stansburiana* (variando entre poblaciones, entre -7 y -10°C, Michels-Boyce & Zani 2015), *Eulamprus tympanum* y *E. kosciuskoi* (-6,5°C y -8,5°C, respectivamente, Spellerberg 1972), y *Podarcis muralis* (-5°C, Claussen et al. 1990). Además, también se encontró variación entre las poblaciones de *L. lineomaculatus* en los PSE, mostrando nuevamente lagartos de la estepa, cerca de Calafate, con un valor promedio menor que los lagartos de la estepa altoandina, cerca de Esquel, pero notablemente sólo la población de Calafate fue capaz de sobrevivir varias (6) horas a una temperatura cercana al PSE. La muy amplia distribución geográfica de *Zootoca vivipara* la hace un modelo de estudio muy interesante y muestra lo variable y plástica que puede ser esta especie en referencia a las estudiadas, ya que *Z. vivipara* no sólo mostró diferentes temperaturas de PSE en poblaciones de diferentes hábitats (Voituron et al. 2004; Berman et al. 2016), sino también la posibilidad de alternar entre la tolerancia al congelamiento y el superenfriamiento (Grenot et al. 2000; Voituron et al. 2002a). Curiosamente, en el caso de *Uta stansburiana*, en 12 poblaciones muestreadas, los autores no encontraron una asociación entre la rigurosidad del invierno y el punto de superenfriamiento de diferentes poblaciones (Michels-Boyce & Zani 2015). Esfuerzos futuros podrían centrarse en el muestreo de más poblaciones de *L. pictus* y *L. lineomaculatus*, y ver si la asociación entre la calidad térmica de los potenciales refugios y la resistencia al frío que se encontró en *L. lineomaculatus* persiste como una tendencia relacionada con las restricciones ambientales.

Los individuos enfriados de *Liolaemus pictus* y de *L. lineomaculatus* de todas las poblaciones analizadas tuvieron un aumento de la glucosa en la sangre durante los experimentos, mientras que los individuos de control mostraron una disminución general. El lactato, por otro lado, no presentó un patrón tan claro en los individuos de *L. lineomaculatus* de la estepa cerca de Calafate. Sin embargo, en los individuos de la estepa altoandina, cerca de Esquel, hubo un aumento del lactato en los individuos enfriados y una disminución en los controles. La simplicidad de la vía de síntesis de la glucosa, además de los mecanismos naturales para activar rápidamente la glucogenolisis hepática en los vertebrados son probablemente las razones principales para el uso de la glucosa como sustancia crioprotectora (Storey 1990). El papel de la glucosa como crioprotector y como soluto que reduce colectivamente el punto de congelamiento de los fluidos corporales se ha considerado en especies de reptiles como *Zootoca vivipara* (Grenot et al. 2000) y *Chrysemys picta* (Costanzo et al. 1995b), así como en especies de anfibios, como *Lithobates sylvaticus* y *Pseudacris crucifer* (Storey & Storey 1986). La eliminación de la glucosa puede ser necesaria después del evento de enfriamiento, debido a los numerosos efectos negativos de la glucosa elevada y sostenida en el metabolismo, como los que se producen con la diabetes (Storey & Storey 1996).

Si bien se podría asociar el aumento de la glucosa en los individuos enfriados de ambas especies con una respuesta de resistencia al frío, la pequeña concentración de este aumento sugiere que la glucosa para estas especies puede no estar específicamente asociada con la crioprotección coligativa, de la misma manera que Voituron et al. (2002b) concluyeron para *Zootoca vivipara* (donde las concentraciones alcanzaron $\sim 25 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$, mientras que las concentraciones alcanzadas en estos experimentos fueron entre ~ 5 y $\sim 15 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$). El aumento del lactato en los individuos enfriados de la estepa altoandina podría estar indicando que la contribución de la glucosa en la elevación de la osmolaridad es secundaria a su papel en el metabolismo energético anaeróbico. Es bien conocido el papel de la glucosa como combustible metabólico en el metabolismo anaeróbico durante los períodos en que la baja temperatura ralentiza o detiene la circulación de oxígeno (Calderon et al. 2009; Sinclair et al. 2013), especialmente para órganos como el cerebro, que depende de la glucosa derivada de la glucogenolisis hepática durante la anoxia (Clark & Miller 1973). El modelo de tolerancia térmica basado en la limitación del oxígeno (Pörtner et al. 2000) propone que la aclimatación en ectotermos polares puede causar un aumento de las densidades mitocondriales, lo que a su vez aumentaría la demanda de glucosa en los animales adaptados al frío. De esta manera, el papel de la glucosa en *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* a temperaturas frías estaría

relacionado principalmente con el mantenimiento del metabolismo a pesar de la anoxia inducida por el frío y tal vez con la protección de las células al limitar la deshidratación celular, mientras que su rol como sustancia crioprotectora es secundario.

No se encontraron diferencias significativas entre los individuos controles y enfriados para las proteínas totales o para la albúmina, ni en *Liolaemus pictus* ni en *L. lineomaculatus*, incluso cuando las proteínas anticongelantes (AFP) se producen en varios organismos que dependen del superenfriamiento para sobrevivir a la exposición a temperaturas bajo cero (Devries 1982). No obstante, aunque las AFP parecen ser importantes para la supervivencia de algunos peces polares (DeVries 1988), no se han encontrado en la sangre de las ranas tolerantes al congelamiento, *Lithobates sylvaticus* (anteriormente *Rana sylvatica*; Wolanczyk et al. 1990), en las crías de *Chrysemys picta* (Storey et al. 1991), y de *Chelydra serpentina* (Costanzo et al. 2000), ni en el lagarto *Zootoca vivipara* (Voituron et al. 2002b). Cabe señalar que hay escasa información sobre las AFP en los lagartos, lo que hace difícil estimar la concentración de posibles AFP en lagartos de Patagonia. Sin embargo, no se encontraron pruebas de que las AFP formen parte de los mecanismos que ni *L. pictus* ni *L. lineomaculatus* emplean para sobrevivir al invierno en la Patagonia. En concordancia con el interés que motivó los análisis de las proteínas totales y la albúmina, se analizaron lagartijas sometidas a temperaturas de congelación durante el experimento para la urea, que es el principal producto catabólico del metabolismo de las proteínas. Además, se observaron altas concentraciones de urea en una respuesta relacionada con evitar el congelamiento (mediante el incremento de la osmolaridad plasmática) en crías de *C. picta* (un aumento de 60-70 mosmol/L, atribuido principalmente a la urea) después de la aclimatación a las condiciones invernales simuladas (Costanzo et al. 2000), y en un experimento similar con *Lithobates sylvaticus* (Costanzo & Lee 2005). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la urea entre los individuos enfriados y los de control de *L. pictus* ni de *L. lineomaculatus* en condiciones experimentales.

Liolaemus lineomaculatus ocupa lugares con clima generalmente más frío que los bosques que ocupa *L. pictus*, situado en estepas de alta elevación y en las altas latitudes de Patagonia; sin embargo, ambas especies parecen ser similarmente capaces de superenfriarse, con amplia variación interpoblacional. La capacidad de superenfriarse en *L. lineomaculatus* parece estar relacionada con el régimen de frío del lugar (o, más específicamente, con la calidad térmica de los microambientes), aunque se necesitan más estudios para determinar si esta variación se debe a adaptación o plasticidad. En estos estudios no se pudo encontrar ninguna sustancia bioquímica que se relacione con esta resistencia al frío, excepto un pequeño

aumento de la glucosa, de la cual se propone que su relación con la resistencia al frío en estas especies es más bien secundaria. Teniendo en cuenta las muy bajas temperaturas ambientales (frecuentemente menores a 0°C) a las que tanto *L. pictus* como *L. lineomaculatus* se enfrentarían la mayor parte del año si estuvieran expuestos de manera directa a la intemperie, la capacidad de superar las limitaciones ambientales punitivas debe depender principalmente de los refugios adecuados (Capítulo I) y los mecanismos fisiológicos deben quedar relegados a olas de frío en las cuales un refugio adecuado no sea suficiente, especialmente en el caso de *L. lineomaculatus*.

Figura 12. Experimento de enfriamiento con la heladera de campo, agua, hielo y sal de mesa: cinco individuos de *Liolaemus pictus* que se enfriaron, un individuo control y un modelo de lagarto de PVC, mostrando los cambios en la temperatura para las tres etapas del experimento.

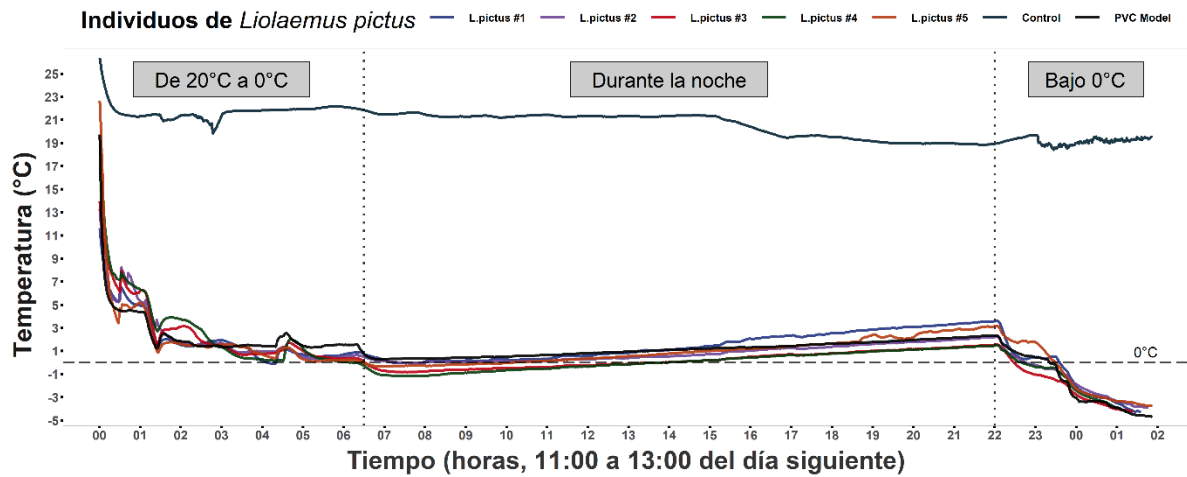
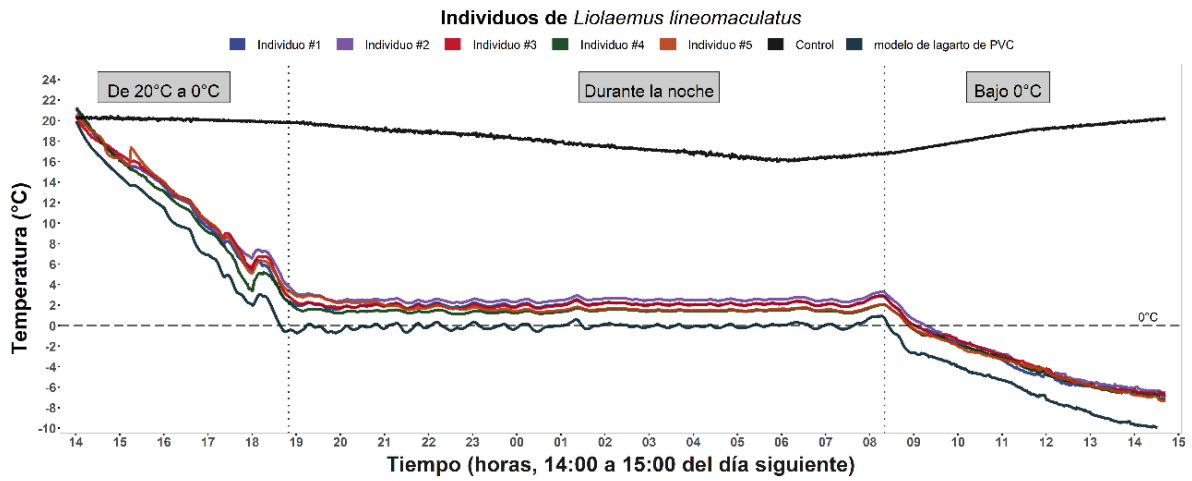
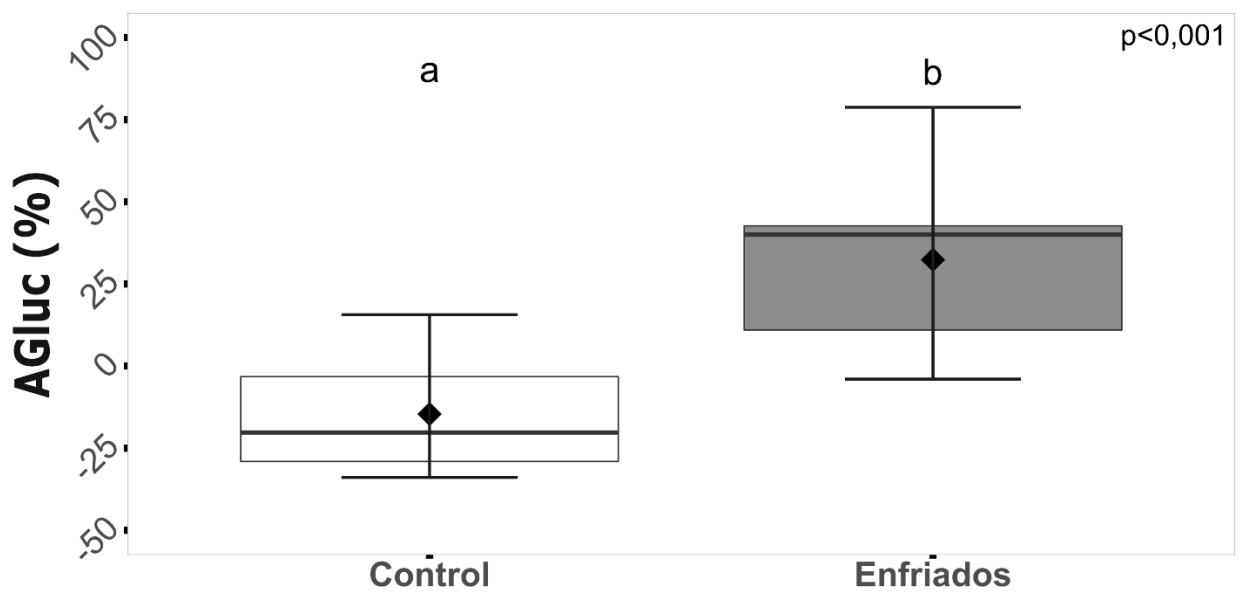


Figura 13. Experimento de enfriamiento con el congelador con tasa regulable:

cinco individuos de *Liolaemus lineomaculatus* que se enfriaron, un individuo control y un modelo de lagarto de PVC, mostrando los cambios en la temperatura para las tres etapas del experimento.



(Agluc, expresado en %) del primer experimento de enfriamiento de *Liolaemus pictus* de bosque de baja elevación. La mediana (línea negra horizontal) y la media (rombos) están representadas en todos los grupos. Cada caja representa el 50% de los valores centrales de cada grupo; el límite hasta donde llegan los bigotes (líneas verticales) inferiores y superiores representa los cuartiles superiores e inferiores (1ro y 4to), valores atípicos representados como asteriscos. Las diferentes letras sobre las cajas indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (valor p).



(Agluc, expresado en %) del segundo experimento (intercambiando individuos control y enfriados del primer experimento) de enfriamiento de *Liolaemus pictus* de bosque de baja elevación. La mediana (línea negra horizontal) y la media (rombos) están representadas en todos los grupos. Cada caja representa el 50% de los valores centrales de cada grupo; el límite hasta donde llegan los bigotes (líneas verticales) inferiores y superiores representa los cuartiles superiores e inferiores (1ro y 4to), valores atípicos representados como asteriscos. Las diferentes letras sobre las cajas indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (valor p).

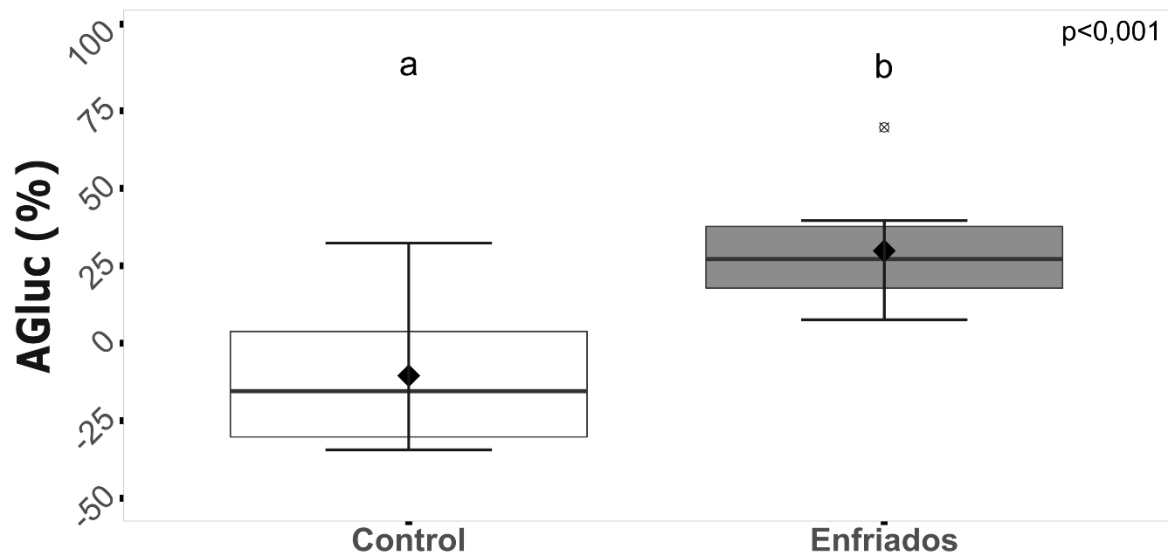


Figura 16. Resultado del análisis de los valores del cambio de glucosa ajustado

(Agluc, expresado en %) del experimento de enfriamiento de *Liolaemus pictus* de bosque de mediana elevación. La mediana (línea negra horizontal) y la media (rombos) están representadas en todos los grupos. Cada caja representa el 50% de los valores centrales de cada grupo; el límite hasta donde llegan los bigotes (líneas verticales) inferiores y superiores representa los cuartiles superiores e inferiores (1ro y 4to), valores atípicos representados como asteriscos. Las diferentes letras sobre las cajas indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (valor p).

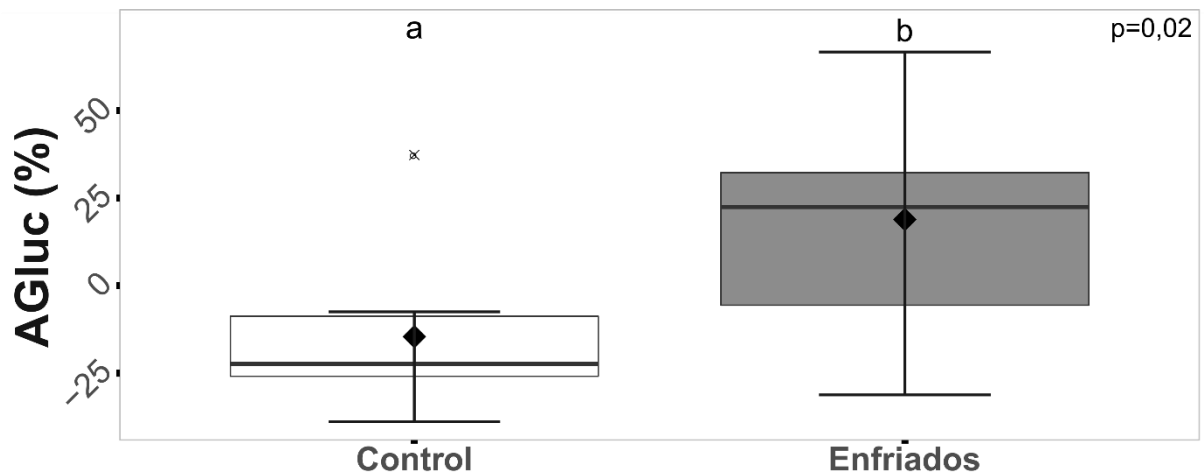


Figura 17. Resultado del análisis de los valores del cambio de glucosa ajustado (AGluc, expresado en %) y de los valores del cambio de lactato ajustado (ALac, también expresado en %) correspondientes a los experimentos de enfriamiento de *Liolaemus lineomaculatus* de estepa altoandina (Esquel) y estepa (Calafate). Valores para A) individuos de Calafate para AGluc y ALac; y B) individuos de Esquel, para AGluc y ALac del primer experimento (1-2) y del segundo (3-4). La mediana (línea negra horizontal) y la media (rombos) están representadas en todos los grupos. Cada caja representa el 50% de los valores centrales de cada grupo; el límite hasta donde llegan los bigotes (líneas verticales) inferiores y superiores representa los cuartiles superiores e inferiores (1ro y 4to), *valores atípicos* representados como asteriscos. Las diferentes letras sobre las cajas indican diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% (valor p).

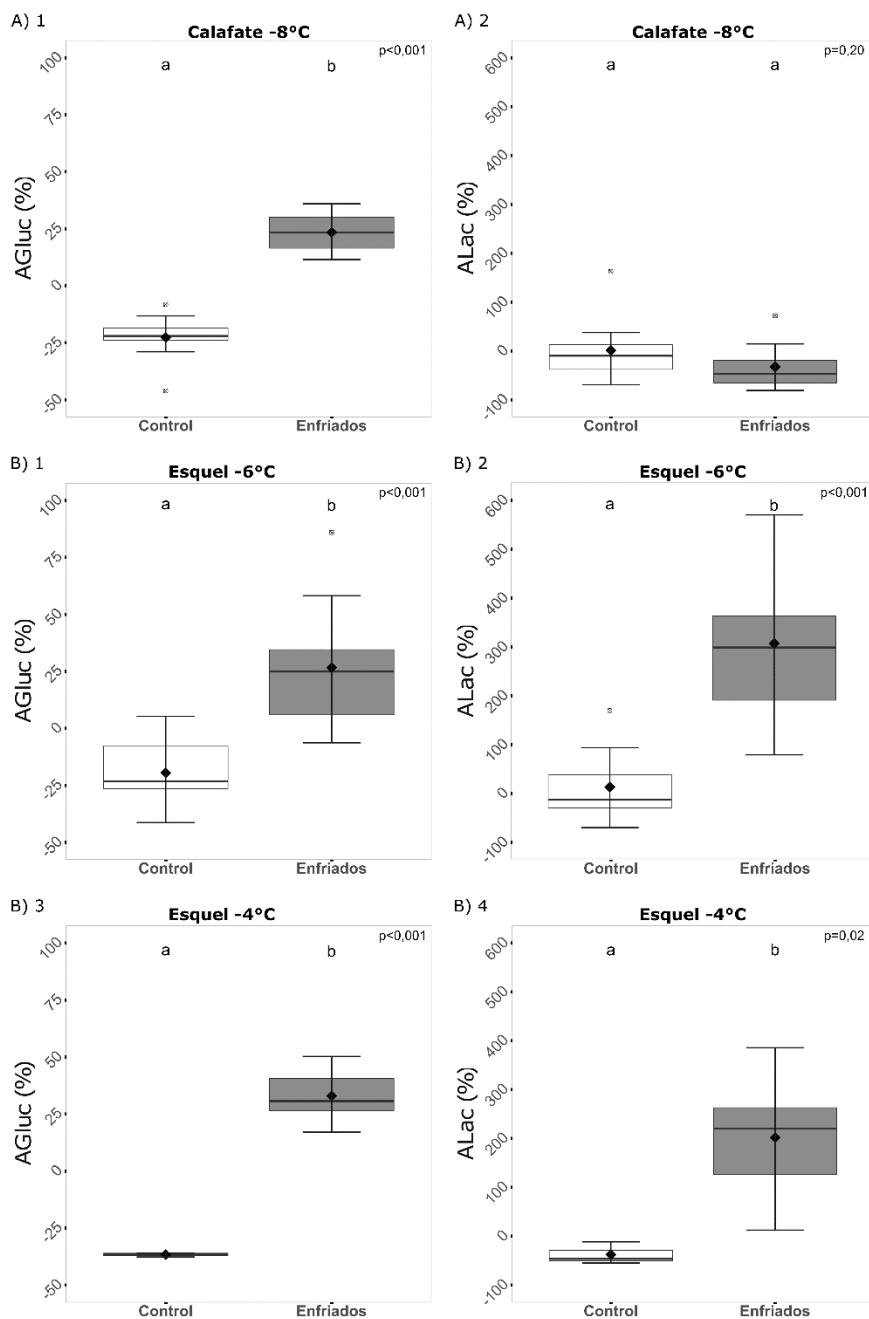


Tabla 3. Parámetros descriptivos (media \pm DE) de Longitud Hocico-Cloaca (LHC, mm), Peso (g), índice de condición corporal (ICC), mínimo crítico de temperatura (CT_{Min} , °C) y temperatura corporal de campo (T_b , °C) de individuos de *Liolaemus pictus* provenientes del bosque de baja elevación. Los tratamientos fueron invertidos entre el experimento 1 y el 2 (individuos que fueron enfriados en el primer experimento pasaron a ser los controles del segundo).

Tratamiento Experimentos 1 / 2	LHC (mm)	Peso (g)	Índice de Condición Corporal (ICC)	T_b de campo (°C)
Enfriado / Control	64,97	7,44	6,06	28,1
Enfriado / Control	63,58	6,65	5,74	28,00
Enfriado / Control	62,72	5,61	5,02	32,00
Enfriado / Control	56,47	6,11	7,23	32,40
Enfriado / Control	56,53	5,08	6,00	30,70
Enfriado / Control	59,01	5,71	6,01	29,10
Enfriado / Control	58,86	5,08	5,38	31,20
Enfriado / Control	58,54	5,22	5,61	33,30
Enfriado / Control	62,18	4,99	4,57	34,40
Enfriado / Control	60,18	6,23	6,22	29,70
<u>Medias (DE)</u>				
	60,30 (2,94)	5,81 (0,80)	5,81 (0,74)	30,89 (2,17)
Control / Enfriado	53,46	4,61	6,32	31,00
Control / Enfriado	54,86	4,54	5,80	32,5
Control / Enfriado	56,2	5,58	6,69	27,4
Control / Enfriado	63,84	5,77	4,92	27,3
Control / Enfriado	62,29	5,59	5,09	33,00
Control / Enfriado	53,4	4,02	5,52	36,1
Control / Enfriado	67,62	7,83	5,73	29,1
Control / Enfriado	56,87	5,68	6,60	30,2
Control / Enfriado	63,85	8,02	6,84	32,5
Control / Enfriado	67,62	8,16	5,97	33,00
<u>Medias (DE)</u>				
	60,00 (5,66)	5,98 (1,51)	5,93 (0,64)	31,21 (2,77)

Tabla 4. Datos descriptivos (media \pm DE) de Longitud Hocico-Cloaca (LHC, mm), Peso (g), índice de condición corporal (ICC), mínimo crítico de temperatura (CT_{Min}, °C) y temperatura corporal de campo (T_b , °C) de individuos de *Liolaemus pictus* provenientes del bosque de mediana elevación, cerca de Esquel. El símbolo del guión en el CT_{Min} (-), corresponde a los individuos control.

LHC (mm)	Peso (g)	CT _{Min} (°C)	ICC	T_b de campo (°C)
49,88	3,10	-	3,73	25,40
53,49	3,60	-	3,53	24,80
50,48	2,90	-	3,37	28,40
49,42	3,30	-	4,08	23,70
55,00	4,20	-	3,80	29,80
52,65	3,20	-	3,29	23,80
52,94	3,80	-	3,84	27,80
51,82	3,80	-	4,09	27,50
51,53	3,30	5,40	3,61	24,70
54,70	3,70	6,39	3,40	26,90
56,14	4,30	3,02	3,67	27,20
50,00	3,20	6,27	3,82	19,30
50,18	4,00	7,60	4,73	27,30
55,11	4,00	5,65	3,60	25,10
57,13	4,10	3,19	3,32	27,70
56,06	4,60	3,47	3,94	23,70
57,00	4,80	5,82	3,91	27,40
<u>Medias \pm (DE)</u>				
53,15 (2,66)	3,76 (0,55)	5,20 (1,61)	3,75 (0,36)	25,79 (2,38)
El símbolo del guión en el CT _{Min} (-), corresponde a los individuos control.				

Tabla 5. Datos descriptivos (media \pm DE) de Longitud Hocico-Cloaca (LHC, mm), Peso (g), índice de condición corporal (ICC), mínimo crítico de temperatura (CT_{Min}, °C) y temperatura corporal de campo (T_b , °C) de individuos de *Liolaemus lineomaculatus* provenientes de las estepas altoandinas en Esquel y de las estepas en Calafate. El símbolo del guión en el CT_{Min} (-), corresponde a los individuos control.

Estepa altoandina (Esquel)					Estepa (Calafate)				
LHC (mm)	Peso (g)	CT _{Min} (°C)	ICC	T_b de campo (°C)	LHC (mm)	Peso (g)	CT _{Min} (°C)	ICC	T_b de campo (°C)
47,93	3,43	-	3,93	18,70	53,83	4,55	-	4,75	30,20
48,71	3,51	-	3,87	26,60	53,81	4,46	-	4,66	25,10
50,31	3,70	-	3,78	26,90	60,53	6,57	-	4,85	30,90
51,16	3,90	-	3,83	29,70	55,04	5,87	-	5,74	33,50
48,25	3,09	-	3,49	29,70	55,68	5,01	-	4,74	33,90
48,64	3,90	4,75	4,32	31,10	53,65	4,07	-	4,29	30,40
54,09	3,93	4,54	3,39	29,90	52,42	4,36	-	4,93	32,80
52,02	3,82	6,21	3,61	22,50	55,40	4,59	-	4,40	29,70
53,50	4,88	5,22	4,32	20,80	53,30	4,49	-	4,83	24,60
56,48	5,66	5,44	4,41	26,60	53,95	4,58	-	4,75	31,10
49,43	4,32	5,87	4,61	21,40	58,54	5,01	5,79	4,08	28,00
49,45	4,02	4,19	4,28	27,70	56,94	5,89	4,86	5,21	25,60
51,68	3,98	5,27	3,82	28,20	50,54	3,67	2,23	4,62	20,10
57,19	5,35	5,58	4,05	29,40	51,57	4,73	4,17	5,61	21,00
50,86	3,01	5,19	3,00	27,80	51,90	3,91	3,81	4,55	27,40
51,52	3,99	5,11	3,86	28,00	60,74	6,38	5,86	4,66	23,20
41,79	3,53	3,97	5,59	30,80	58,39	6,00	5,36	4,93	30,50
48,40	3,48	4,83	3,90	28,70	50,13	4,00	2,77	5,16	30,60
52,88	4,15	5,59	3,77	31,70	50,37	4,02	3,09	5,11	30,80
51,56	3,81	4,81	3,68	30,30	55,90	5,13	5,01	4,79	30,00
Media \pm DE					Media \pm DE				
50,79 (3,36)	3,97 (0,67)	5,10 (0,61)	3,98 (0,54)	27,32 (3,68)	54,63 (3,18)	4,86 (0,87)	4,30 (1,29)	4,83 (0,4)	28,47 (3,98)

El símbolo del guión en el CT_{Min} (-), corresponde a los individuos control.

Tabla 6. Comparación de las variables bioquímicas de *Liolaemus pictus* del bosque de baja

elevación en Bariloche y del bosque de mediana elevación en Esquel, entre control (n=10 y n=8, respectivamente) e individuos enfriados (n=10 y n=9, respectivamente); y de *L. lineomaculatus* de la estepa altoandina en Esquel y la estepa en Calafate, entre control (n = 10 para ambos) y enfriados (n = 10 para ambos). Para la glucosa inicial de *L. pictus* del bosque de mediana elevación, todos los individuos fueron tenidos en cuenta en la comparación (n = 25). En el caso de la urea de *L. pictus* del bosque de mediana elevación, los valores incluyen la covariable significativa del ICC ($F_{1; 10} = 10.356$; $p=0.001$). Todas las medias se expresan en g/L. Los análisis se realizaron como ANCOVAS cuando la covariable fue significativa.

Especie	Sitio	Variables bioquímicas	F	p	Medias de los controles (DE)	Medias de individuos enfriados (DE)
<i>Liolaemus pictus</i>	Bosque de baja elevación (Bariloche)	Glucosa inicial experimento 1	-	-	1,41 (0,22)	1,13 (0,15)
		Glucosa final experimento 1	-	-	1,18 (0,18)	1,49 (0,30)
		Glucosa inicial experimento 2	-	-	1,30 (0,31)	1,12 (0,16)
		Glucosa final experimento 2	-	-	1,22 (0,24)	1,58 (0,34)
	Bosque de mediana elevación (Esquel)	Urea	1,47	0,25	3,47 (1,56)	3,25 (2,03)
		Proteínas totales	0,47	0,49	184,63 (45,90)	215 (123,41)
		Albúmina	0,57	0,45	38,15 (7,15)	47,16 (14,40)
		Glucosa inicial	-	-	1,38 (0,11)	1,44 (0,26)
		Glucosa final	-	-	1,16 (0,22)	1,64 (0,21)
<i>Liolaemus lineomaculatus</i>	Estepa altoandina (Esquel)	Glucosa inicial experimento 1	-	-	1,85 (0,30)	1,71 (0,44)
		Glucosa final experimento 1	-	-	1,46 (0,14)	2,09 (0,38)*
		Lactato inicial experimento 1	-	-	0,27 (0,08)	0,48 (0,19)
		Lactato final experimento 1	-	-	0,29 (0,19)	1,70 (0,23)*
		Glucosa inicial experimento 2 (n = 9)	-	-	1,6 (0,12)	1,76 (0,13)
		Glucosa final experimento 2 (n = 9)	-	-	1,02 (0,09)	2,34 (0,31)
		Lactato inicial experimento 2 (n = 9)	-	-	0,35 (0,07)	0,26 (0,10)
		Lactato final experimento 2 (n = 9)	-	-	0,22 (0,08)	0,71 (0,20)
	Estepa (Calafate)	Urea (corazón)	0,07	0,80	0,11 (0,07)	0,12 (0,11)
		Urea (hígado)	0,03	0,86	0,12 (0,08)	0,12 (0,08)
		Proteínas totales (corazón)	0,22	0,64	18,50 (8,69)	20,28 (8,10)
		Proteínas totales (hígado)	3,53	0,08	132,05 (54,15)	172,81 (42,18)
		Albúmina (corazón)	0,56	0,46	10,94 (1,84)	9,96 (3,69)
		Albúmina (hígado)	1,96	0,18	45,5 (6,09)	49,56 (10,64)

Todas las medias se expresan en g/L. Los análisis se realizaron como ANCOVAS con el ICC como covariable, cuando fue significativo. La glucosa inicial y final no fueron analizadas porque el cambio en la glucosa fue analizado como AGluc (%), y lo mismo ocurrió con el lactato, analizado como ALac (%).

*Estos valores se obtuvieron de los lagartos encontrados muertos luego del experimento

Tabla Suplementaria 1. Datos obtenidos de bibliografía relacionada con tolerancia al congelamiento, superenfriamiento o determinación del punto de superenfriamiento (PSE) en los cuales se mencionaban las tasas de enfriamiento utilizadas.

Trabajo	Especies	Tasa de enfriamiento (°C*h ⁻¹)	Observaciones
Etheridge et al (1984)	<i>Cnemidophorus sexlineatus</i>	-6	Animales comenzaron el experimento a ~10°C
Claussen et al (1990)	<i>Podarcis muralis</i>	entre -6 y -18	Animales comenzaron el experimento a ~0°C
Voituron et al (2001)	<i>Zootoca vivipara</i>	~-2	Las tasas no eran constantes, se colocaba en incubadoras a temperaturas fijas de -2; -3 y -4°C y se iba bajando la temperatura si no había congelamiento
Burke et al (2002)	<i>Podarcis sicula</i>	entre -2 y -3	
Voituron et al (2004)	<i>Zootoca vivipara</i>	-12	
McConnachie et al (2007)	<i>Pseudocordylus melanotus melanotus</i>	entre -1,8 y -3	
Weeks & Espinoza (2013)	<i>Homonota darwini</i>	-5	No se probó específicamente PSE, el valor de CT _{Min} de la especie es <0°C
Michels-Boyce & Zani (2015)	<i>Uta stansburiana</i>	entre -0,5 y -4	Animales comenzaron el experimento a ~4°C
Berman et al (2016)	<i>Zootoca vivipara</i>	-0,1	entre -0,75 y -1,5 para determinación de PSE
Otros reptiles			
Costanzo et al (1995)	<i>Chelydra serpentina</i> ; <i>Apalone spinifera</i> ; <i>Kinosternon flavescens</i> ; <i>Chrysemis picta</i>	-0.5	Ensamble de tortugas
Costanzo et al (2001)	<i>C. picta</i>	-	Se enfriaron las tortugas a una tasa de -2°C/día hasta llegar a -4°C o -6°C
Costanzo et al (2003)	<i>C. picta</i>	-3	Las tortugas se enfriaron previamente a 4°C durante 1-2 días antes de los experimentos
Anfibios			
Costanzo et al (1991)	<i>Lithobates sylvaticus</i>	-0.16; -0,18; -0,3; -1,03; -1,17	Pruebas de tolerancia al congelamiento. Se probaron varias tasas de enfriamiento, a tasas superiores a -0,3°C*h ⁻¹ , la tasa de supervivencia bajaba drásticamente
Rodriguez (2019)	<i>Rhinella spinulosa</i>	-1	Anfibio. Se mantuvo a los animales por 4 días a 10°C antes de los experimentos

Tabla Suplementaria 2. Datos descriptivos (Media \pm DE) de Longitud Hocico-Cloaca (LHC, mm), Peso (g), índice de condición corporal (ICC), punto de superenfriamiento (PSE, °C), y temperatura corporal a campo (T_b , °C) de los individuos de *Liolaemus pictus* para la población del bosque de baja elevación destinados a la determinación del PSE.

Bosque de baja elevación (San Carlos de Bariloche)				
LHC (mm)	Peso (g)	PSE (°C)	ICC	T_b de campo (°C)
60,93	6,40	-5,71	5,67	29,40
52,68	5,10	-2,55	6,24	27,20
57,54	5,10	-6,00	5,13	30,10
59,55	6,60	-5,65	6,15	32,90
57,73	6,00	-6,64	5,99	29,50
Medias \pm (DE)				
57,69 (3,13)	5,84 (0,71)	-5,31 (1,59)	5,84 (0,45)	29,82 (2,04)

Tabla Suplementaria 3. Datos descriptivos (Media \pm DE) de Longitud Hocico-

Cloaca (LHC, mm), Peso (g), índice de condición corporal (ICC), punto de superenfriamiento (PSE, °C), y temperatura corporal a campo (T_b , °C) de los individuos de *Liolaemus lineomaculatus* para las poblaciones de la estepa altoandina y estepa destinados a la determinación del PSE.

Estepa altoandina (Esquel)					Estepa (Calafate)				
LHC (mm)	Peso (g)	PSE (°C)	ICC	T_b de campo (°C)	LHC (mm)	Peso (g)	PSE (°C)	ICC	T_b de campo (°C)
55,01	4,88	- 5,10	4,07	28,50	63,13	7,65	- 7,10	7,44	27,30
49,75	4,09	- 5,20	4,49	32,30	64,44	7,33	- 8,20	6,89	29,50
48,64	3,24	- 4,90	3,79	32,50	61,14	7,03	- 7,90	7,20	31,10
47,80	3,35	- 6,60	4,11	34,40	60,56	6,93	- 7,10	7,22	28,90
54,83	4,69	- 6,70	3,94	33,20	61,07	6,91	- 7,40	7,10	27,60
52,86	3,78	- 6,30	3,51	31,10					
Medias \pm (DE)					Medias \pm (DE)				
51,48 (3,17)	4,01 (0,68)	-5,80 (0,82)	3,99 (0,33)	32,00 (2,03)	62,07 (1,65)	7,17 (0,32)	-7,54 (0,49)	7,17 (0,20)	28,88 (1,54)

temperaturas

“No se puede entender un proceso deteniéndolo. La comprensión debe moverse con el flujo del proceso, debe unirse a él y fluir con él.”

Frank Herbert

Resultados parciales de este capítulo han sido publicados en:

Cecchetto, N. R., Medina, S. M., & Ibarzüengoytía, N. R. (2020). Running performance with emphasis on low temperatures in a Patagonian lizard, *Liolaemus lineomaculatus*. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.

En animales ectotermos, el rango de temperaturas que permiten a un individuo permanecer activo (rango de tolerancia térmica o TTB, por sus siglas en inglés *Thermal Tolerance Breadth*, sensu Robert Feldmeth et al. 1974) indican los límites superior e inferior, fuera de los cuales las capacidades fisiológicas se reducen. Por ejemplo, los individuos con temperaturas corporales fuera del TTB pueden ser menos capaces de escapar de los depredadores, encontrar refugios o utilizar microambientes térmicos. El TTB de una especie restringe las horas potenciales de actividad (Hertz 1981; Hertz & Huey 1981; Hertz et al. 1982) y a menudo se correlaciona con su entorno térmico (Stillman 2003; Chown et al. 2004, 2010; Clusella-Trullas et al. 2011), variando entre las poblaciones debido a la plasticidad fenotípica (Bowler & Terblanche 2008) o a la selección natural (Huey et al. 2009). Dentro del TTB, los valores de ciertos indicadores de rendimiento fisiológico, como la velocidad de carrera corta, la resistencia y la digestión, varían en función de la temperatura describiendo curvas de rendimiento fisiológico (TPC, por sus siglas en inglés *Thermal Performance Curve*; Figs. 18 y 19). Las TPC tienden a presentar la siguiente forma general: un aumento sigmoideal de la variable indicadora de rendimiento con la temperatura, seguido por un ápice claro o una meseta variable en la temperatura óptima (T_{opt} ; sensu Waldschmidt & Tracy 1983; Huey & Bennett 1987), dependiendo de la variable de rendimiento medida, y, por último, una disminución exponencial o cuadrática (Huey & Stevenson 1979; Huey & Kingsolver 1989, 1993; Angilletta et al. 2003; Angilletta 2009).

La TPC puede variar entre poblaciones de una misma especie en diferentes lugares, ya que es esperable que la selección natural favorezca a aquellos fenotipos que maximizan el rendimiento dentro de su régimen térmico local (Kingsolver et al. 2011; Logan et al. 2014; Sinclair et al. 2016). La variabilidad ambiental puede causar cambios en el valor máximo de rendimiento (en la unidad de rendimiento analizada) de la TPC, la temperatura óptima o T_{opt} , o en la amplitud del rendimiento (como el 80% o 95% del rendimiento máximo y el TTB; Angilletta et al. 2003; Izem & Kingsolver 2005; Frazier et al. 2006; Angilletta 2009; Kingsolver 2009). De esta manera, la relación de una población con la temperatura puede desviarse de la media de la especie o de la norma de reacción térmica, caracterizándose a través de diferentes funciones matemáticas (por ejemplo, cuadrática, exponencial, gaussiana). Las bajas temperaturas ambientales pueden ser perjudiciales para las actividades vitales y comprometer la supervivencia (Hertz et al. 1982; Bennett 1990; Van Damme et al. 1990; Swoap et al. 1993), a menos que los individuos de la población modifique su TPC, su TTB, o

haga ajustes de comportamiento mediante la termorregulación, la modificación de las horas diarias de actividad, o la elección de refugios adecuados para pasar el tiempo inactivo (Vicenzi et al. 2017, 2018).

Durante otoño y primavera, los lagartos que habitan ambientes situados a grandes elevaciones o altas latitudes suelen experimentar con frecuencia temperaturas cercanas al mínimo térmico crítico (CT_{Min} , el límite inferior del TTB). Para evitar las bajas temperaturas, los lagartos pueden utilizar microambientes (por ejemplo, madrigueras, grietas, arbustos) donde las temperaturas son más cálidas que la temperatura del aire en el exterior, y este comportamiento puede prolongar las horas de actividad durante las temporadas de transición. No obstante, en los entornos templados y fríos, los lagartos podrían beneficiarse en gran medida de mecanismos que les permitieran estar activos a bajas temperaturas, incluso a niveles de rendimiento subóptimos, y aprovechar así los escasos e irregulares recursos térmicos disponibles en estos entornos duros y fríos. Ante estas dificultades, los lagartos pueden ampliar su amplitud de tolerancia térmica, modificar el comportamiento termorregulador y modificar los patrones de actividad para, de esta manera, estar activos a temperaturas corporales más bajas (Brattstrom 1968; Bauwens et al. 1990; Adolph & Porter 1993; Díaz & Cabezas-Díaz 2004; Huey et al. 2009; Munoz et al. 2014).

El género *Liolaemus* muestra una capacidad de adaptación a una amplia gama de entornos, desde el Perú, en el extremo norte de su rango geográfico ($12^{\circ}S$), hasta el sur de Tierra del Fuego, en la Argentina ($54^{\circ}S$, Cei 1988; Scolaro 2005), proporcionando así un modelo muy interesante para probar la variación intraespecífica en el rendimiento. Los liolaémidos que viven en el clima templado-frío de Patagonia han demostrado una notable capacidad para soportar bajas temperaturas, estando activos a temperaturas subóptimas y modificando el comportamiento termorregulador según la disponibilidad de microambientes para la termorregulación (por ejemplo, *L. bibronii*, *L. boulengeri* -Medina et al. 2009; Medina & Ibagüengoytía 2010-, *L. sarmientoi*, *L. magellanicus* -Ibagüengoytía et al. 2010; Fernández et al. 2011-; numerosas especies del clado *L. boulengeri* - Cruz et al. 2005-). Sin embargo, el largo período de brumación que experimentan los reptiles en la Patagonia, en contraste con otros lugares más cálidos, reduce las horas de actividad, lo que a su vez afecta a múltiples aspectos de su historia de vida (Piantoni et al. 2006; Boretto & Ibagüengoytía 2009), y hace que sea crucial para los lagartos encontrar y utilizar los escasos recursos térmicos siempre que estén disponibles.

lento y una madurez sexual tardía (por ejemplo, *L. pictus*, 6-8 años, Gutiérrez et al. 2013) en comparación con otras lagartijas que viven en ambientes más cálidos (Pianka 1970; James & Shine 1988; Piantoni et al. 2019), y pueden ajustar su comportamiento de termorregulación para compensar las bajas temperaturas ambientales y los cortos períodos de actividad (Gutiérrez et al. 2010; Ibagüengoytía et al. 2010; Medina et al. 2012).

Se evaluó en este capítulo el rendimiento locomotor de *Liolaemus lineomaculatus* en ensayos de laboratorio a 10 temperaturas, con énfasis en el segmento de temperaturas bajas del rango de tolerancia térmica (TTB). Considerando que la distribución de *L. lineomaculatus* abarca desde el altoandino en el noroeste de la Patagonia Argentina, en la provincia de Neuquén (39°S), en elevaciones de hasta 1800 msnm, hasta las tierras bajas de la provincia de Santa Cruz (50° S, 400 msnm), se seleccionaron dos poblaciones de esta especie, ubicadas en los extremos del rango eco-geográfico de la misma: una norteña en la estepa altoandina, a 1800 msnm en Esquel (42° S), y una sureña en la estepa, en Calafate (50° S), Argentina. Se analizaron los resultados del rendimiento térmico de *L. lineomaculatus* en relación a las repercusiones ecológicas de las capacidades locomotoras a bajas temperaturas (cerca del CT_{Min}) en estos entornos de temperaturas inclementes en Patagonia.

Como se pudo demostrar en el Capítulo I, las poblaciones de *Liolaemus lineomaculatus* de la estepa altoandina de Esquel, tuvieron una mayor variabilidad y disponibilidad de microambientes térmicos con temperaturas dentro de parámetros térmicos de relevancia ecofisiológica (óptimos térmicos o amplitudes de tolerancia térmica para el desempeño en las carreras) que la población situada en la estepa de Calafate, afectando probablemente las horas de actividad en ambas poblaciones. Por lo tanto, se formuló la siguiente hipótesis:

H) Los individuos de *Liolaemus lineomaculatus* que habitan a diferentes latitudes han adaptado sus capacidades de rendimiento locomotor, particularmente a temperaturas subóptimas, y tienen diferentes sensibilidades térmicas, de acuerdo con la calidad térmica del ambiente. A partir de esta hipótesis, se predice que los lagartos de la población situada en la estepa de Calafate correrán a mayor velocidad a temperaturas subóptimas que la población que habita en la estepa altoandina de Esquel. Además, se espera que las formas de las curvas de rendimiento térmico de estas dos poblaciones sean diferentes (TTB más amplio en la población de Calafate, mayores velocidades máximas ante temperaturas subóptimas en la

población de Calafate o pendiente más pronunciada hacia la temperatura óptima en la población de Calafate), acorde a las diferentes sensibilidades a la temperatura.

Materiales y métodos

*Áreas de estudio y métodos de campo para *Liolaemus lineomaculatus**

Liolaemus lineomaculatus es un lagarto pequeño (LHC = 62 mm), psamófilo y vivíparo. Se capturaron individuos adultos en dos sitios localizados en los extremos opuestos del rango de distribución geográfica de la especie: uno en la estepa altoandina de Esquel, Argentina (42° 49' S, 71° 15' W; 1800 msnm; marzo 2017; N = 21, 13 machos y 8 hembras), y el otro en las estepas de Calafate (50° 15' S, 71°29' W; 450 msnm; febrero 2018, N = 17, 7 machos y 10 hembras).

Máximo térmico crítico (CT_{Max})

Para determinar el máximo térmico crítico, siguiendo el protocolo de Vicenzi et al (2017), se colocó a cada lagarto en un terrario abierto (15 × 20 × 20 cm) con suelo de arena y una lámpara infrarroja 150-W a 40 cm de altura. Se monitoreó la temperatura corporal cada segundo, como se describe en las observaciones del CT_{Min}. Se observó cuidadosamente cada lagarto durante todo el experimento. Se consideró el máximo térmico crítico como la temperatura corporal a la que el individuo era incapaz de enderezarse cuando se colocaba sobre su región dorsal comenzando a probar tan pronto como los individuos mostraban los primeros signos de sobrecalentamiento (como la ventilación con la boca abierta). Los individuos fueron entonces inmediatamente enfriados para permitir su recuperación. Todos los lagartos sobrevivieron, estuvieron en buenas condiciones después del experimento y fueron devueltos a sus localidades al finalizar la totalidad de experimentos relacionados con las pruebas de rendimiento locomotor.

Efectos de la temperatura corporal en la velocidad

Inmediatamente después de la captura, se llevó a los lagartos (provenientes del mismo lote de individuos del cual obtuvimos los valores de CT_{Max}) al laboratorio en bolsas de tela individuales para minimizar el estrés, y se los ubicó en terrarios individuales abiertos (15 × 20

× 20 cm). Se realizaron las pruebas de rendimiento locomotor (carreras) dentro de las 96 h de la captura entre las 09:00 y las 19:00 horas, cuando los lagartos están activos en su entorno natural y al menos 16 h después de alimentarse. Los lagartos fueron alimentados y tuvieron agua *ad libitum* diariamente después de completar las pruebas.

Las pruebas se realizaron en un dispositivo de carreras de 0,07 m de ancho que conducía a un refugio. Ocho fotocélulas colocadas a intervalos de 0,15 m a lo largo de la pista y conectadas a un ordenador detectaron el movimiento del lagarto, y por lo tanto, la velocidad en cada sección de 0,15 m y en la longitud total, de 1,05 m. Durante el análisis, cada recorrido se dividió en un componente de carrera de sprint (los primeros 0,15 m, en adelante denominado "carreras de 0,15 m"), y un componente de carrera larga (en adelante denominado "carrera de 1,05 m"), ambas carreras indicativas de la capacidad locomotora del lagarto. Las carreras de 0,15 m representan la primera respuesta de estallido o escape de un depredador, ya que la velocidad máxima suele alcanzarse en los primeros milisegundos de la respuesta (Cabezas-Cartes et al. 2014) y, en el campo, podrían representar la distancia entre dos arbustos contiguos. Mientras tanto, los recorridos de 1,05 m pueden representar las distancias más largas que los lagartos suelen utilizar para actividades como la búsqueda de alimento, la defensa territorial, la fuga de depredadores y el cortejo, teniendo en cuenta que en esta población los lagartos corren en general de un arbusto a otro, que suelen estar separados por entre 1 y 2 m (ver Fig. Suplementaria 1. d).

Las carreras de 0,15 m y 1,05 m se realizaron a ocho temperaturas: 12, 14, 18, 22, 24, 31, 35, 38°C) incluidas en el rango de temperaturas activas en el campo de *Liolaemus lineomaculatus* (10-40°C, Medina et al. 2011). Los lagartos se colocaron en una cámara ambiental a temperaturas estables durante al menos 30 minutos después del equilibrio con la temperatura objetivo antes de los ensayos. Se realizaron sólo dos temperaturas experimentales por día, una por la mañana y otra por la tarde, dejando a los lagartos tiempo suficiente para descansar entre las carreras (~ 5 horas). El orden de las temperaturas se eligió de manera aleatoria para los lagartos (sin seguir ningún sistema de aleatorización particular), pero evitando dos temperaturas contrastantes (por ejemplo, una temperatura muy baja seguida de una temperatura alta) en el mismo día, lo que podría estresar innecesariamente a los lagartos, siguiendo los métodos de (Angilletta et al. 2002; Fernández et al. 2011; Iburgüengoytía et al. 2016). Antes de cada carrera, se midió la temperatura corporal (T_b) utilizando la misma metodología utilizada para la medición de T_b a campo. Cada lagarto corrió tres veces

consecutivas en cada una de las ocho temperaturas experimentales, y luego se seleccionó sólo la corrida más rápida (y sin pausas) para los análisis descartando las otras.

Se midió el peso antes y una vez finalizadas todas las carreras usando una balanza Ohaus Scot Pro ($\pm 0,01$ g) y no se encontraron diferencias entre ellas (prueba *t* de Student apareada, $t_{1,37} = 0,711$, $p = 0,48$ para los individuos de Esquel; $t_{1,32} = 0,416$, $p = 0,68$ para los individuos de Calafate). Se consideró la amplitud de tolerancia térmica (TTB) como la diferencia entre el crítico térmico mínimo (CT_{Min}) y el crítico térmico máximo (CT_{Max}) para cada individuo (Geng et al. 2018).

Análisis estadísticos

Se analizó la variabilidad en los tamaños y pesos corporales usando el índice de condición corporal (ICC), calculado como:

$$ICC = M_i * \left[\frac{[LHC_0]}{[LHC_i]} \right]^{b_{SMA}}$$

Donde M_i y LHC_i son la masa y LHC del individuo, LHC_0 es la media aritmética de la LHC de la población, y b_{SMA} es la pendiente del eje mayor estandarizada de la regresión del logaritmo natural de la masa corporal sobre el logaritmo natural de LHC para la población (*sensu* Peig & Green 2009). El exponente b_{SMA} se calculó usando el paquete 'lmodel2' (Legendre 2014) en R (R Core Team 2019). Todos los demás análisis se realizaron utilizando el mismo software, con los paquetes 'nlme' (Pinheiro et al. 2017) y 'car' (Fox & Weisberg 2011). El umbral de significación para los valores de p se fijó en 0,05.

Con respecto a las carreras de 0,15 m y 1,05 m, se calculó la velocidad máxima alcanzada para cada lagarto (V_{maxi}), la velocidad máxima alcanzada para la población (V_{max}), y el óptimo térmico (T_{opt}), como la T_b a la que la velocidad es máxima. Además, se calculó la amplitud del rendimiento (B_{80} y B_{95}), los rangos de T_b a los que el rendimiento es mayor o igual al 80% y 95% del V_{max} , respectivamente, siguiendo las metodologías de Hertz et al. (1983) y Angilletta et al. (2002). Por último, para detectar diferencias en el rendimiento considerando sólo temperaturas subóptimas (es decir, valores inferiores a T_{opt}), por lo que se calculó la velocidad máxima a temperaturas subóptimas ($V_{subóptima}$).

Para estimar los parámetros V_{maxi} , V_{max} , B_{80} y B_{95} para cada población, se ajustó un Modelo Aditivos Generalizado de Efectos Mixtos (GAMM por sus siglas en inglés,

Generalized Additive Mixed-effects Model) a los datos obtenidos de las carreras de todos los individuos, utilizando el paquete "mcgv" (Wood & Wood 2015). El enfoque del GAMM permitió ajustar la relación no lineal entre la temperatura y la velocidad con una función suavizada, a la vez que se evaluaba la variabilidad interindividual (Hastie & Tibshirani 1987). Se consideró a la identidad de los "individuos" (la curva de cada lagarto, obtenida de las carreras de las 10 temperaturas experimentales, incluidas los CT_{Min} y CT_{Max}) como un efecto aleatorio de agrupación, el ICC y el sexo como covariables, y el efecto de la temperatura sobre la velocidad como un efecto fijo (un modelo para las carreras de 0,15 m y otro para las de 1,05 m). El modelo se explica con más detalle en el Material Suplementario.

Las estimaciones de los parámetros comunicados para los efectos fijos y aleatorios se obtuvieron con una probabilidad máxima restringida. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático estadístico R, versión 3.5.3 y el paquete "mgcv", versión 1.8-28.

Resultados

Parámetros de las curvas de rendimiento térmico para las carreras de 0,15 m y las carreras de 1,05 m para los lagartos de la estepa altoandina de Esquel y de la estepa de Calafate.

El rango de tolerancia térmica (TTB) fue más significativamente más amplio (Tabla 7) y el CT_{Min} difirió entre ambas poblaciones (Prueba *t* de Student: $t_{1,27} = 7,27$, $p < 0,01$), siendo más bajo en los lagartos de la población de la estepa altoandina (Esquel, media \pm DE = $2,67 \pm 0,48$) que en los lagartos de la población de la estepa (Calafate, media \pm DE = $4,18 \pm 0,72$). El CT_{Max} no difirió entre poblaciones (Prueba *t* de Student: $t_{1,27} = 0,98$; $p = 0,33$).

Para ambos tipos de carreras, se calcularon los rangos de T_b en los que el rendimiento es mayor o igual al 80% y 95% de la velocidad máxima, respectivamente (B_{80} y B_{95}). Para los recorridos de 0,15 m (Fig. 18a), los límites superior e inferior de B_{80} fueron significativamente más altos para los individuos de la estepa altoandina de Esquel (límite inferior medio \pm DE = $24,43 \pm 0,21$ °C; límite superior medio \pm DE = $35,10 \pm 0,26$ °C) en comparación con los individuos de la estepa de Calafate (media de los límites inferiores \pm DE = $23,70 \pm 0,38$ °C; media de los límites superiores \pm DE = $34,50 \pm 0,30$ °C; prueba *t* de Student: $t_{1,36}$ límites inferiores $B_{80} = 7,73$; $p < 0,01$; y $t_{1,36}$ límites superiores $B_{80} = 8,73$; $p < 0,01$). No hubo diferencias significativas en el rango B_{95} , la velocidad máxima (V_{max}), la velocidad máxima a temperaturas subóptimas ($V_{subóptima}$), o la temperatura óptima (T_{opt}) entre las poblaciones

(prueba t de Student: $t_{1,36}$ límites inferiores B95 = 1,45; $p=0,31$; y $t_{1,36}$ límites superiores B95 = 1,68; $p=0,17$; ANOVA: $F_{1,36}$ V_{\max} =0,23, $p = 0,64$; $F_{1,34}$ $V_{\text{subóptima}}$ =1,89; $p = 0,18$; y $F_{1,36}$ T_{opt} =0,65; $p = 0,43$). Para las carreras de 1,05 m (Fig. 19a), los individuos de la estepa altoandina mostraron valores más bajos (límite inferior medio \pm DE = 21,80 \pm 0,51 °C) para el límite inferior de B₈₀ ($t_{1,36}$ límite inferior = 4,59; $p < 0,01$) que los individuos de la estepa Calafate (límite inferior medio \pm DE = 22,60 \pm 0,60 °C). No hubo diferencias en el límite superior de B₈₀, en el B95, ni en V_{\max} , $V_{\text{subóptima}}$ o T_{opt} entre las poblaciones (Tabla 8). Las curvas de rendimiento individuales de las carreras de 0,15 m y 1,05 m se encuentran en la sección de Información Suplementaria (Figuras Suplementarias 3 a 6).

Proporción de individuos que corrieron dentro de B80 y B95 en las carreras de 0,15 m y 1,05 m

Entre las dos poblaciones estudiadas, la correspondiente a la estepa altoandina de Esquel presentó proporcionalmente más individuos corriendo a velocidades superiores a sus respectivos parámetros B₈₀ y B₉₅ que la población de la estepa de Calafate en las carreras de 0,15 m, mientras que para las carreras de 1,05 m no se encontraron diferencias poblacionales significativas.

Para las carreras de 0,15 m, el 86% de los individuos de la estepa altoandina de Esquel (18 de 21) y el 53% de los individuos de la estepa de Calafate (9 de 17) corrieron a una velocidad dentro de los parámetros B₈₀ (prueba exacta de Fisher; *odds ratio* = 5,08, $p = 0,03$). Además, el 62% de los individuos de la estepa altoandina de Esquel (13 de 21) y el 29% de los individuos (5 de 17) de la estepa Calafate corrieron a una velocidad dentro de la B₉₅ (prueba exacta de Fisher; *odds ratio* = 3,75; $p = 0,04$).

Para las carreras de 1,05 m, el 67% de los individuos de la estepa altoandina (14 de 21) y el 59% de los individuos de la estepa (10 de 17) corrieron a una velocidad dentro de la B₈₀ (prueba exacta de Fisher; *odds ratio* = 1,39; $p = 0,43$). Además, el 52% de los individuos de la estepa altoandina (11 de 21) y el 41% de los individuos de la estepa Calafate (7 de 17) corrieron a una velocidad dentro de la B₉₅ (prueba exacta de Fisher; *odds ratio* = 1,55; $p = 0,36$).

Una comparación AIC de los modelos con y sin "individuo" como efecto aleatorio (aleatorizando la identidad) mostró una mejora significativa al incluir el efecto aleatorio en los modelos de las carreras de 0,15 m y de 1,05 m (Sección de información Suplementaria, Tabla Suplementaria 4).

Los ajustes de los GAMM en la TPC mostraron un efecto significativo del término de suavizado en la temperatura ($F_{1; 7,33} = 43,9$; $p < 0,01$ para las carreras de 0,15 m y $F_{1; 6,76} = 84,3$; $p < 0,01$ para las carreras de 1,05 m), y tendencias significativamente diferentes en las carreras de 0,15 m entre los individuos de la estepa altoandina de Esquel, y de la estepa de Calafate ($F_{1,4,29} = 2,54$, $p = 0,03$, Fig. 18a). En las carreras de 1,05 m, no se encontró una diferencia significativa en la forma entre las TPC (Fig. 19a). El efecto aleatorio de la "identidad de los individuos" fue significativo para ambos modelos ($F_{1; 24,14} = 2,72$; $p < 0,01$ para las carreras de 0,15 m y $F_{1; 27,58} = 5,15$; $p < 0,01$ para las carreras de 1,05 m), y las covariables ICC y sexo no tuvieron efectos significativos en ninguno de los modelos. La desviación explicada por el modelo de carrera de 0,15 m fue del 73,3%, mientras que el modelo de carrera de 1,05 m explicó el 74,1% de la desviación.

Los ajustes del GAMM para las TPC de las temperaturas subóptimas (es decir, por debajo de T_{opt}) mostraron un efecto significativo del término de suavizado sobre la temperatura ($F_{1,2,66} = 131,03$; $p < 0,01$ para las carreras de 0,15 m, y $F_{1,2,73} = 96,56$; $p < 0,01$ para las carreras de 1,05 m), pero el modelo no evidenció una diferencia significativa en la forma entre las TPC poblacionales en las carreras de 0,15 m o en las de 1,05 m (Fig. 18b y Fig. 19b). El efecto aleatorio de los "individuos" fue de nuevo significativo en ambos modelos ($F_{1; 23,97} = 2,63$; $p < 0,01$ para las carreras de 0,15 m y $F_{1; 26,28} = 3,96$; $p < 0,01$ para las carreras de 1,05 m), y las covariables ICC y sexo tampoco tuvieron un efecto significativo en ninguno de estos modelos. La desviación explicada por el modelo de carreras de 0,15 m fue del 81%, mientras que el modelo de carreras de 1,05 m explicó el 80% de la desviación (Tabla 9).

Discusión

A pesar de la gran elevación, la población de *Liolaemus lineomaculatus* en la estepa altoandina de Esquel, experimenta más grados-día a temperaturas óptimas de rendimiento locomotor que la población que vive en la estepa de Calafate, particularmente durante la

primavera y el otoño. Los lagartos de Esquel pasarían más tiempo (más horas totales durante la temporada de actividad) activos a temperaturas dentro de su rango de tolerancia térmica que los lagartos de Calafate, ya que la temperatura de los potenciales refugios es hasta cuatro veces mayor en la estepa altoandina de Esquel que en la estepa de Calafate, particularmente en otoño y primavera. La variación térmica ambiental antes mencionada podría explicar las diferencias interpoblacionales respecto a la sensibilidad térmica del desempeño locomotor de *L. lineomaculatus*, la cual se evidenció al analizar el rango de tolerancia térmica (TTB) y la forma de las curvas de rendimiento térmico de las carreras. Ambas poblaciones mostraron disminuciones exponenciales para los valores por encima de la temperatura óptima, pero la población de la estepa de Calafate tuvo una disminución exponencial más pronunciada para los valores por encima de $\sim 30^{\circ}\text{C}$ (T_{opt}) para las carreras de 0,15 m y para los valores por encima de $\sim 28^{\circ}\text{C}$ (T_{opt}) para las carreras de 1,05 m, en comparación con la población de la estepa altoandina de Esquel. De esta manera, la hipótesis sobre diferentes sensibilidades térmicas en las poblaciones de *L. lineomaculatus* en relación a la calidad térmica de sus ambiente no se puede rechazar, si bien algunas predicciones no se cumplieron y algunas se dieron en sentido contrario al esperado (el TTB fue más amplio en la población de Esquel y se esperaba que lo fuera para Calafate y no se encontraron diferencias en velocidades máximas ni en forma de la curva ante temperaturas subóptimas, pero sí se encontraron diferencias entre poblaciones en la disminución exponencial luego de T_{opt}).

El rango de tolerancia térmica para los individuos de Esquel fue más amplio, con mínimos térmicos críticos más bajos que los individuos de Calafate. El límite inferior de B_{80} para las carreras de 1,05 m fue casi 1°C más bajo en los lagartos de Esquel. Esto no es sorprendente, ya que muchos estudios muestran que la CT_{Min} puede variar a través de las latitudes y elevaciones para muchos ectotermos terrestres como insectos y lagartos (Sunday et al. 2011; Munoz et al. 2014). Sin embargo, los límites inferiores y superiores de B_{80} para las carreras de 0,15 m fueron casi 1°C más bajos para los individuos de la estepa de Calafate que para los individuos de la estepa altoandina. Esta diferencia sugiere un cambio adaptativo (como aclimatación, por ejemplo) o una plasticidad de la curva de rendimiento de carreras cortas a temperaturas más frías en Calafate, lo que permitiría a estos lagartos que viven en un entorno de relativamente baja calidad mantener el rendimiento de velocidad en carreras cortas a temperaturas bajas. Sin embargo, aunque esta ventaja potencial se observó en las carreras de 0,15 m, no hubo diferencias cuando los lagartos tuvieron que correr distancias más largas (carreras de 1,05 m). La importancia de la velocidad de “sprint” o carrera corta para la aptitud

y supervivencia de muchos ectotermos es evidente en eventos como la huida de depredadores (Irschick & Meyers 2007; Strobbe et al. 2009) y la captura de presas (Lima 2002). Por lo tanto, la velocidad de carrera de 0,15 m podría presentar mayores variaciones interpoblacionales en la sensibilidad térmica que otros parámetros locomotores como la velocidad de carrera de 1,05 m. Esta diferencia en la sensibilidad térmica también podría explicarse por factores ecológicos como la presión de depredación (Herczeg et al. 2008; Lopez-Darias et al. 2012) o la estructura o fisonomía del paisaje y el tipo de sustrato utilizado para la mayoría de las actividades vitales como la alimentación, la reproducción y la exploración (Tulli et al. 2012; Ibargüengoytía et al. 2016). Por ejemplo, las estepas altoandinas de Esquel presentan pequeñas áreas de pendiente variable entre los potenciales refugios y distancias irregulares entre los mismos, una característica que no se da en las estepas de Calafate, que son en su mayoría llanuras abiertas con distancias más uniformes y, en términos generales, con mayores distancias entre un arbusto y el siguiente (Fig. Suplementaria 1 c y d).

La variación en la calidad térmica y la fisonomía del paisaje (Capítulo I) no se reflejó en diferencias en las velocidades máximas de las carreras de 0,15 m o de 1,05 m entre poblaciones. Se esperaba que la menor calidad térmica de los potenciales refugios en la estepa de Calafate se correlacionara con un mejor rendimiento de las carreras de esos individuos, especialmente a temperaturas subóptimas, para compensar el hecho de tener menos tiempo disponible con temperaturas dentro del TTB, como se ha visto en muchos ectotermos terrestres como insectos, anfibios y reptiles (Zagar et al. 2018). Además, la amplitud de la temperatura diaria es más variable a grandes elevaciones y, cuando la variación diaria se sitúa cerca de las zonas más sensibles (desde el punto de vista térmico) de las TPCs (como valores cerca de T_{opt} o cerca de los mínimos o máximos térmicos críticos), puede reducir el rendimiento (Bartheld et al. 2017), lo que podría afectar a los individuos de *Liolaemus lineomaculatus* de la estepa altoandina. No obstante, ninguno de estos factores parece estar asociado con diferencias en las velocidades máximas entre las poblaciones. Las limitaciones fisiológicas, como la potencia mecánica de las fibras musculares en relación con la temperatura (Swoap et al. 1993; Kingsolver & Huey 2006), podrían estar favoreciendo la conservación de los rasgos relacionados con la velocidad, como la V_{max} , a pesar de las diferencias ambientales. Es posible también que las diferencias ambientales estén generando cambios en el rendimiento, pero no en el rendimiento locomotor sino de otras variables no consideradas en este capítulo, como crecimiento o consumo de energía metabolizable, tal como sucedió con *Sceloporus undulatus* (Angilletta 2001).

con diferencias significativas en la temperatura óptima entre las poblaciones, a pesar de que se considera que las temperaturas óptimas para correr son relativamente bajas en los lagartos de ambientes templados más fríos (Bennett 1990; Fernández et al. 2011). Las temperaturas óptimas medias de los liolaémidos varían entre las especies, en particular en los lagartos de la sección *lineomaculatus* (de 30 a 36°C, Bonino et al. 2011; Fernández et al. 2011; Bonino et al. 2015). Sin embargo, encontré que, entre las poblaciones de *Liolaemus lineomaculatus* en diferentes ambientes, la T_{opt} para las carreras de 0,15 m y 1,05 m fue consistente y dentro del rango de valores encontrados para otros liolaémidos (de 27 a 39°C, Bonino et al. 2011; Kubisch et al. 2011). El comportamiento termorregulatorio y la selección de microhábitats son algunos de los factores que pueden causar que algunos parámetros fisiológicos mantengan un carácter conservativo para un mismo taxón (Buckley et al. 2015; Taucare-Rios et al. 2018), como se pudo ver en la temperatura óptima de *Zootoca vivipara* (Van Damme et al. 1990), *Sceloporus undulatus* (Angilletta 2001), y en dos poblaciones de *Liolaemus* (*L. tandiliensis* y *L. wiegmanni*; Stelatelli et al. 2018). Además, las temperaturas óptimas podrían ser similares entre poblaciones de una especie a causa de cambios en estrategias de depredación o a diferencias en la presión de selección que mantienen la temperatura óptima en un valor similar, como propusieron en van Damme et al (1990) para *Zootoca vivipara*. Los valores de T_{opt} de ambas poblaciones estuvieron por debajo de las temperaturas de laboratorio preferidas por *L. lineomaculatus* (T_{sei}) (Medina et al. 2011), tal como se observó en otros lagartos patagónicos como *L. pictus* (Kubisch et al. 2011), *L. sarmientoi* y *L. magellanicus* (Fernández et al. 2011), y el gecko *Homonota darwini* (Renner et al. 2007). Los lagartos patagónicos son capaces de lograr un rendimiento máximo incluso por debajo de las temperaturas de laboratorio preferidas, lo que podría ser otra adaptación al ambiente templado-frío en un conjunto de rasgos que componen sus historias de vida, caracterizadas por una madurez sexual tardía, una longevidad y un bajo rendimiento reproductivo medio anual (Medina & Ibarzüengoytía 2010; Boretto et al. 2018).

Los modelos aditivos generalizados de efectos mixtos mostraron que la estructura mixta, considerando a la identidad de los individuos como un efecto aleatorio, mejoró significativamente todos los modelos. La variación interindividual de rasgos del ciclo vital de una población ha demostrado ser una importante fuente de variabilidad (Nussey et al. 2007; Artacho et al. 2013), que podría tener una relevancia clave en la plasticidad, expansión y distribución de las especies (Bonino et al. 2015), y a veces es más importante que la variabilidad interpoblacional (Gvozdík & Castilla 2001). Se sumaron en este capítulo más

pruebas de que los estudios de las curvas de rendimiento térmico deberían incluir la variabilidad interindividual al modelar las tendencias poblacionales, utilizando un modelo estadístico que contemple esta estructura tan compleja de individuos con tendencias heterogéneas pero no necesariamente opuestas.

A su vez, el enfoque GAMM nos permitió ver algunas diferencias marginales en la forma de la TPC entre los individuos de la estepa altoandina, Esquel, y los de la estepa de Calafate, en las carreras de 0,15 m (Fig. 18a), si bien no se encontraron diferencias en las carreras de 1,05 m (Fig. 18b, Fig. 19a y b). Esto es interesante porque, aunque tradicionalmente se ha considerado que las TPC tienden a adoptar la misma forma general (Huey & Stevenson 1979; Angilletta 2006), parece ser valioso permitir que el modelo considere formas específicas para cada población, permitiendo la variabilidad por individuo (para ver las curvas de rendimiento individuales, ver Figuras Suplementarias 3 a 6). Sin embargo, cabe aclarar que para algunas especies la fisiología térmica es evolutivamente conservadora y, por lo tanto, relativamente insensible a la selección direccional, siguiendo la "perspectiva de termorregulación estática" (*sensu* Hertz et al. 1983), como el caso de *Psammotromus algirus*, en el que los lagartos de alta elevación no se desempeñaron mejor que los de media y baja elevación a temperaturas corporales subóptimas, a pesar de que habitaban un entorno de baja calidad térmica (Zamora-Camacho et al. 2015). En el caso de los liolaémidos, en líneas generales el género ha demostrado labilidad en numerosos parámetros de su fisiología térmica, tales como la temperatura de captura en sus ambientes naturales y preferidas (Labra et al. 2009; Medina et al. 2012), CT_{Min} , T_o , V_{max} (Bonino et al. 2015), mientras que otros parámetros como CT_{Max} se ha considerado estática (Bonino et al. 2015).

Los lagartos de Esquel parecen ser capaces de utilizar más eficientemente su potencial locomotor que los lagartos de Calafate, ya que una mayor proporción de la población corrió a velocidades superiores a los parámetros B_{80} y B_{95} en las carreras de 0,15 m. Tal vez esto se deba a que viven en un ambiente más heterogéneo, con mejores oportunidades de termorregulación (Huey & Slatkin 1976; Logan et al. 2015; Sears & Angilletta 2015; Basson et al. 2017), como se pudo ver en el análisis de los refugios potenciales en el Capítulo I. Las estepas de Esquel contaban con numerosas y variadas inclinaciones, madrigueras de pequeños mamíferos y rocas de variados tamaños, mientras que las estepas de Calafate el hábitat que ocupaba la población estudiada era una meseta estructural y térmicamente homogénea (Fig. Suplementaria 1).

En la bibliografía sobre forrajeo, la estocasticidad ambiental (en este caso, considerando el recurso de la *temperatura*) suele denominarse "riesgo", y la "regla del presupuesto energético diario" (Stephens & Charnov 1982) establece que un forrajeador que se encuentra con un presupuesto positivo debe ser adverso al riesgo, mientras que un forrajeador que se encuentra con un presupuesto negativo, propenso al riesgo (Kacelnik & Bateson 1996). Siguiendo esta lógica, si los lagartos de la estepa de Calafate vivieran con un presupuesto térmico negativo, serían más propensos al riesgo en comparación a los lagartos de la estepa altoandina. En Calafate, los lagartos podrían verse obligados a abandonar sus refugios para termorregular en situaciones de riesgo, donde la velocidad podría ser un factor de supervivencia (Lister & Aguayo 1992), haciendo de la velocidad un rasgo importante a desarrollar. Por otro lado, las estepas altoandinas de Esquel proporcionan una mayor variabilidad en los tipos de micrositios a utilizar como refugios provisionales, como las rocas y madrigueras excavadas por pequeños mamíferos, ausentes en las estepas de Calafate. La selección de micrositios podría jugar un papel más importante que la temperatura ambiente media o incluso la latitud en la conformación de los parámetros de la TPC (Clusella-Trullas et al. 2011). Por lo tanto, esta diferencia en los refugios potenciales puede sumarse a la diferencia de temperatura observada entre las temperaturas de los modelos expuestos, especialmente porque la presencia o la vulnerabilidad a la depredación podría actuar en contra de la actividad continua, incluso durante un clima favorable (Lopez-Darias et al. 2012; Broeckhoven & Nortier 2015).

En el clima frío y las grandes variaciones térmicas estacionales de la Patagonia, en la gran elevación de las estepas andinas de Esquel y en las estepas a gran latitud del sur en Calafate, *Liolaemus lineomaculatus* logra sobrevivir y mostrar una serie de comportamientos relacionados con la temperatura y la locomoción. En este capítulo, se demostró que *L. lineomaculatus* es capaz de funcionar en entornos de diferente calidad térmica con un rendimiento locomotor poco variable. En lo que respecta a las carreras de 0,15 m, hubo diferencias en la forma de sus curvas de rendimiento locomotor entre poblaciones, y hubo un desplazamiento hacia temperaturas más frías en la población de Calafate. No se encontraron tales variaciones con respecto a las carreras de 1,05 m, o considerando sólo las temperaturas por debajo de T_{opt} . En futuros estudios se podría investigar el componente genético que explica esta variabilidad interindividual en el rendimiento y la variabilidad entre las poblaciones de una misma especie en entornos relativamente similares con experimentos *common garden* o translocaciones, para diferenciar entre adaptación y plasticidad.

Figura 18. Velocidades de carreras de 0,15 m de los individuos *Liolaemus lineomaculatus* de la estepa altoandina (Esquel, triángulos) y de la estepa (Calafate, círculos), y la línea de suavizado global del Modelo Mixto Aditivo Generalizado (GAMM) para cada sitio para **a)** todas las temperaturas y **b)** temperaturas subóptimas.

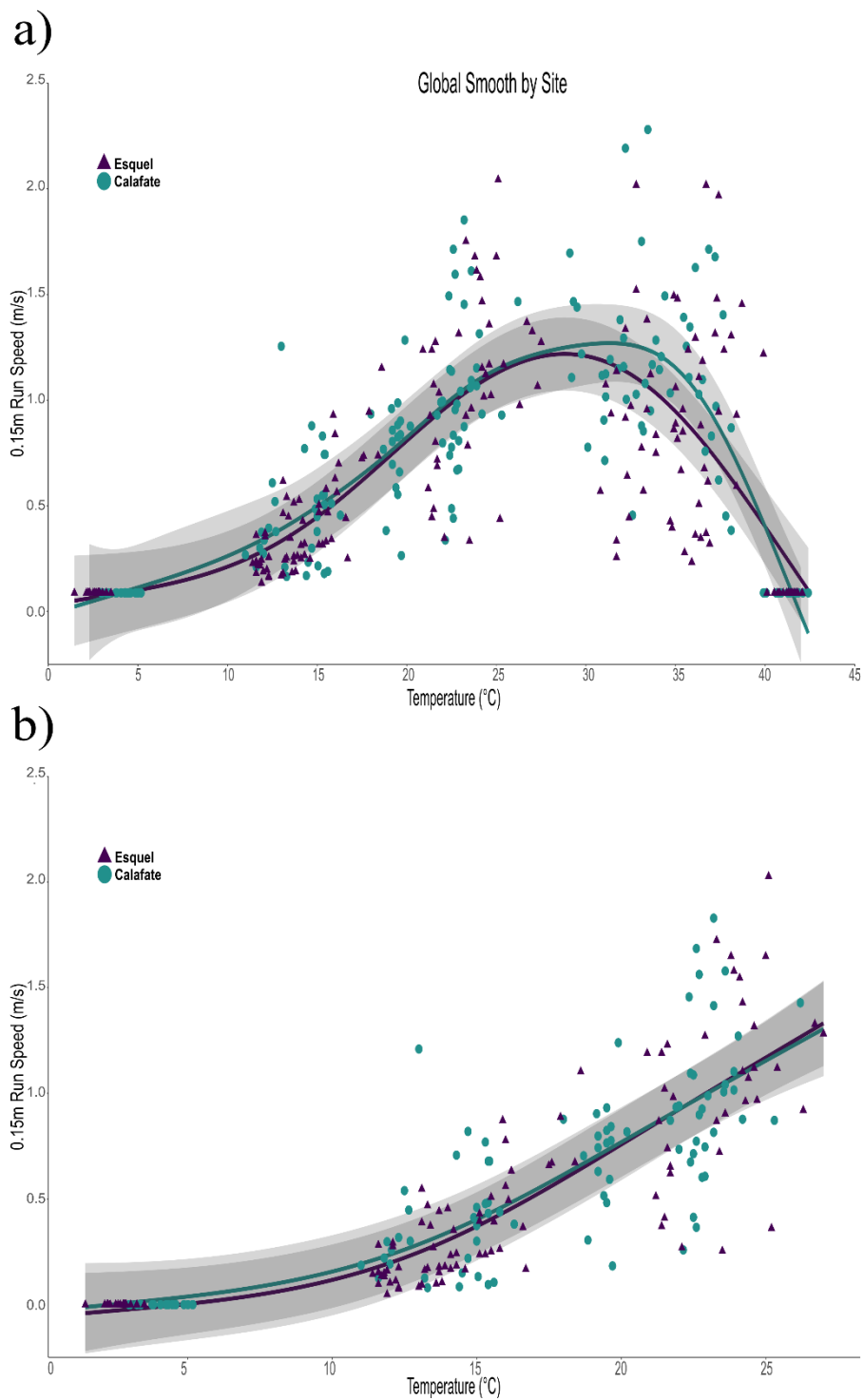


Figura 19. Velocidades de carrera de 1,05 m de individuos *Liolaemus lineomaculatus* de la estepa altoandina (Esquel, triángulos) y de la estepa (Calafate, círculos), y la línea de suavizado global del Modelo Mixto Aditivo Generalizado (GAMM) para cada sitio para **a)** todas las temperaturas y **b)** temperaturas subóptimas.

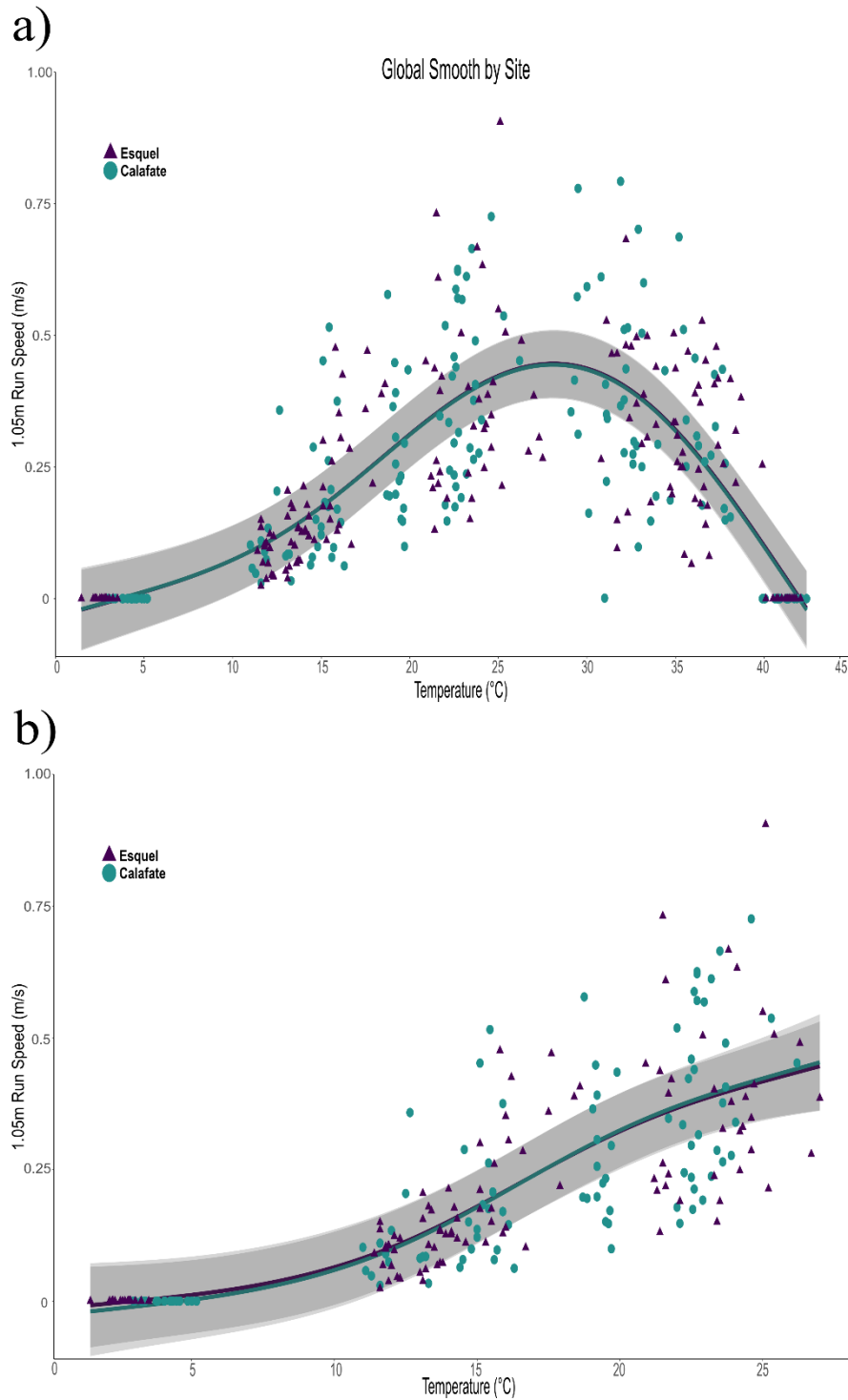


Tabla 7. Rango de temperaturas para los parámetros de rendimiento locomotor de las poblaciones de *Liolaemus lineomaculatus*. El rango de tolerancia térmica representa la diferencia entre el CT_{Max} y el CT_{Min} , mientras que los rangos B_{80} y B_{95} son los rangos de temperaturas dentro de los cuales las poblaciones pueden alcanzar el 80 y el 95% de su velocidad máxima, respectivamente.

		Rango de Temperaturas (°C)			
		Esquel		Calafate	
Parámetro poblacional		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
	Rango de tolerancia térmica (TTB)	1,46	42,06	2,97	42,40
Carreras de 0.15 m	Rango B_{80}	24,43	35,09	23,70	34,46
	Rango B_{95}	27,71	32,63	26,89	31,93
Carreras de 1.05 m	Rango B_{80}	21,15	34,68	21,29	34,83
	Rango B_{95}	24,84	31,40	25,67	31,65

Tabla 8. Comparación de los parámetros medios de rendimiento locomotor para las carreras de 0,15 m y 1,05 m, y de los mínimos y máximos térmicos críticos ($^{\circ}\text{C}$), incluidos los valores inferiores y superiores de la amplitud del rendimiento (B_{80} inferior y B_{80} superior, $^{\circ}\text{C}$), la velocidad máxima (V_{max} , m/s), la velocidad máxima a temperaturas subóptimas ($V_{\text{max subóptima}}$, m/s), y el óptimo térmico (T_{opt} , $^{\circ}\text{C}$). Se muestran los parámetros estadísticos para las pruebas t (t), la prueba de Fischer (F), y las probabilidades (p). Los parámetros de rendimiento se obtuvieron como la media de las estimaciones de cada curva de rendimiento térmico individual. Las letras en negrita indican valores de significación de $p < 0,01$.

Carrera	Parámetro poblacional	Medias de Esquel	Medias de Calafate	Estadístico	p
	CT_{Min}	2,67	4,18	$t_{1,27} = 7,27$	< 0,01
	CT_{Max}	41,1	41,3	$t_{1,27} = 0,98$	0,33
Carreras de 0.15 m	B_{80} superior	35,1	34,5	$t_{1,36} = 8,73$	< 0,01
	B_{80} inferior	24,4	23,7	$t_{1,36} = 7,73$	< 0,01
	V_{max}	1,41	1,74	$F_{1,36} = 0,23$	0,64
	$V_{\text{max subóptima}}$	1,27	1,10	$F_{1,34} = 1,89$	0,18
	T_{opt}	30,17	29,66	$F_{1,36} = 0,65$	0,43
Carreras de 1.05 m	B_{80} superior	33,99	34,18	$t_{1,36} = 0,13$	0,89
	B_{80} inferior	21,81	22,65	$t_{1,36} = 4,59$	< 0,01
	V_{max}	0,52	0,63	$F_{1,36} = 3,46$	0,07
	$V_{\text{max subóptima}}$	0,45	0,44	$F_{1,34} = 0,05$	0,83
	T_{opt}	28,12	28,86	$F_{1,36} = 1,16$	0,22

Tabla 9. Modelo Aditivos Generalizado de Efectos Mixtos (GAMMs), ajustados 95

para carreras cortas y largas, en individuos de la estepa altoandina (Esquel) y estepa (Calafate). Para cada curva de rendimiento térmico (TPC), los coeficientes paramétricos son los interceptos de los modelos estimados para cada población. Para el suavizado de temperatura, el intercepto se estimó como unidad diferencial respecto al intercepto de referencia estimado para Esquel. Se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA) con una prueba F para evaluar los cambios en la forma de la TPC entre las poblaciones, para las carreras de 0,15 m y para las carreras de 1,05 m. EE = error estándar, n = número de observaciones, edf = grados de libertad efectivos. Las letras en negrita indican valores de significación de $p < 0,01$

Carrera	Estimación de los coeficientes paramétricos (EE)		Significancia aproximada de los términos de suavizado (S) e interacciones						Desviación explicada (n)
	Intercepto Esquel	Intercepto Calafate	S (temperatura)		S (temperatura: Calafate)		S (individuo)		
			F (edf)	p	F (edf)	p	F (edf)	p	
Carreras de 0.15 m	0,49 (0,15)	0,43 (0,17)	43,9 (7,33)	<0,01	2,54 (4,29)	0,03	2,72 (24,14)	<0,01	73,3% (358)
Carreras de 1.05 m	0,16 (0,07)	0,07 (0,07)	84,3 (6,76)	<0,01	0,01 (1)	0,95	5,15 (27,58)	<0,01	74,1% (356)
Carreras de 0.15 m a temp. subóptimas	0,48 (0,15)	0,45 (0,17)	131,03 (2,66)	<0,01	0,46 (1,33)	0,69	2,63 (23,97)	<0,01	81% (213)
Carreras de 1.05 m a temp. subóptimas	0,09 (0,07)	-0,06 (0,08)	96,55 (2,73)	<0,01	0,16 (1)	0,69	3,96 (26,28)	<0,01	80% (212)

Información complementaria sobre materiales y métodos

Análisis estadísticos

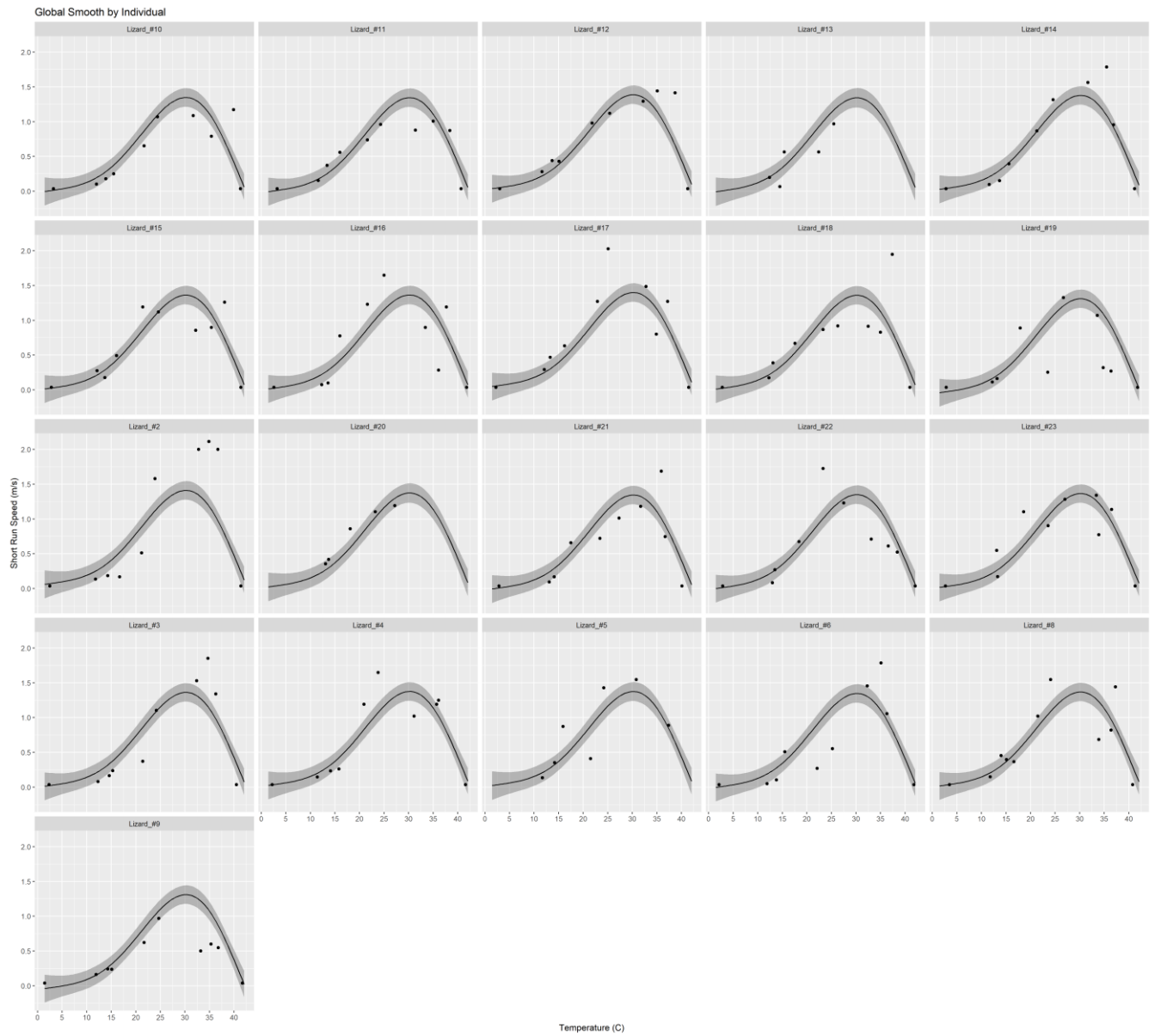
Para las comparaciones, este modelo incorpora una tendencia separada para cada población. El término de interacción en un GAM o GAMM permite probar la diferencia entre el suavizado estimado para el nivel de referencia y el nivel n -ésimo del factor (en este caso, la diferencia entre el suavizado para los lagartos de Esquel y el suavizado para los de Calafate), siguiendo la metodología de Rose et al. (2012). Para una explicación metodológica más detallada, ver el sitio web de Gavin Simpson

<https://www.fromthebottomoftheheap.net/2017/12/14/difference-splines-ii/>. El comando `gam.check` del paquete 'mcgv' se utilizó para evaluar la normalidad, la homogeneidad y el ajuste del modelo (Zuur et al. 2009).

Para probar las tendencias de la población a temperaturas subóptimas, además, se ajustó un GAMM a las temperaturas por debajo de T_{opt} , y la velocidad máxima a temperaturas por debajo de T_{opt} ($V_{subóptima}$), para las carreras de 0,15 m y para las carreras de 1,05 m.

Se construyó un modelo completo incluyendo todos los efectos fijos y aleatorios. Luego, se ajustaron los efectos aleatorios utilizando un enfoque de máxima probabilidad restringida y se probó la importancia de los efectos aleatorios utilizando pruebas de proporción de probabilidad (LRT). Posteriormente, se ajustaron los efectos fijos utilizando el enfoque de máxima verosimilitud, y la comparación entre los modelos se realizó utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC).

Liolaemus lineomaculatus de la estepa altoandina de Esquel, provenientes del Modelo Aditivo Generalizado de Efectos Mixtos.



Liolaemus lineomaculatus de la estepa altoandina de Esquel, provenientes del Modelo Aditivo Generalizado de Efectos Mixtos.

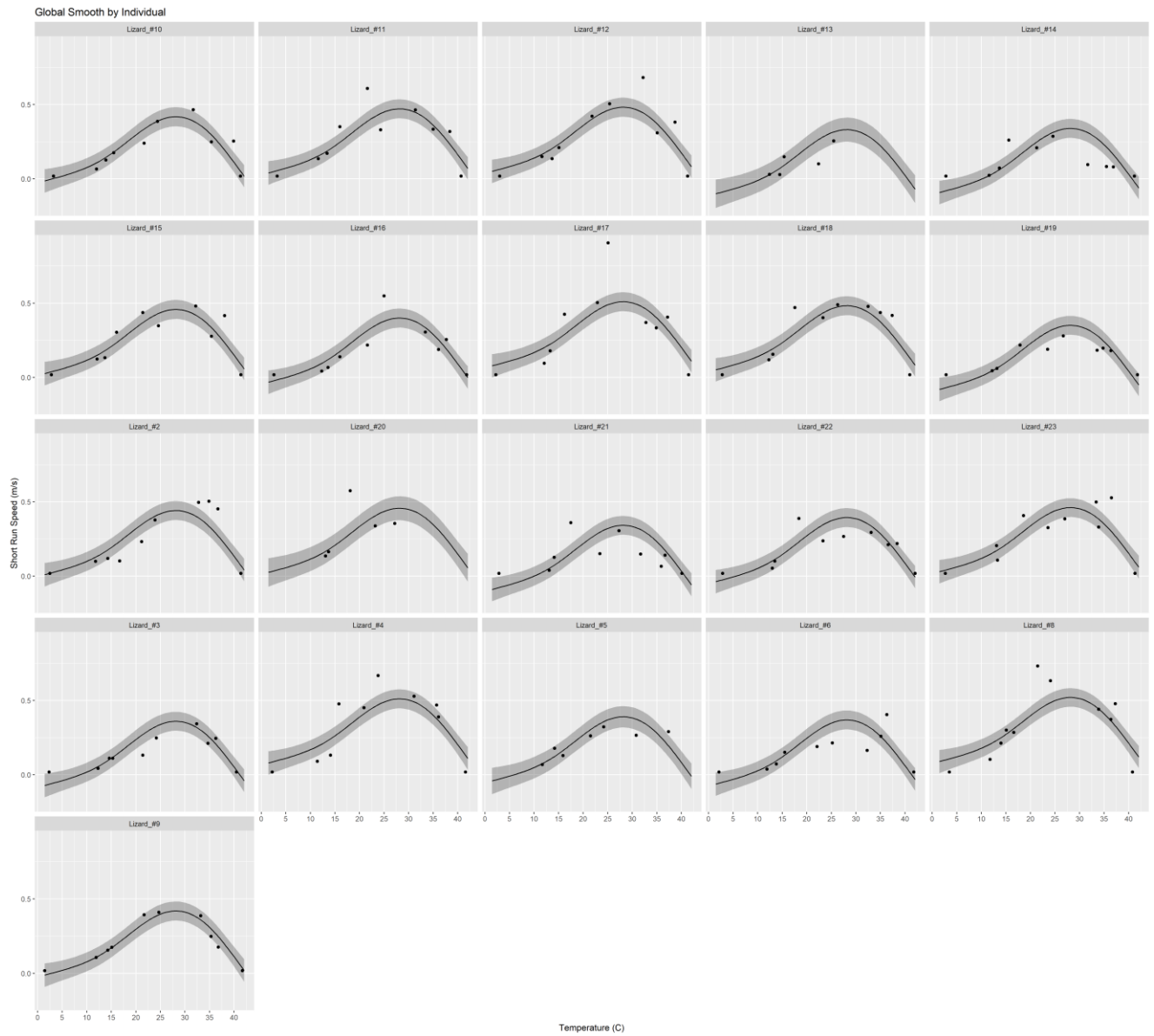


Figura Suplementaria 5. Carreras individuales de 0,15 m para los individuos *Liolaemus lineomaculatus* de la estepa de Calafate, provenientes del Modelo Aditivo Generalizado de Efectos Mixtos

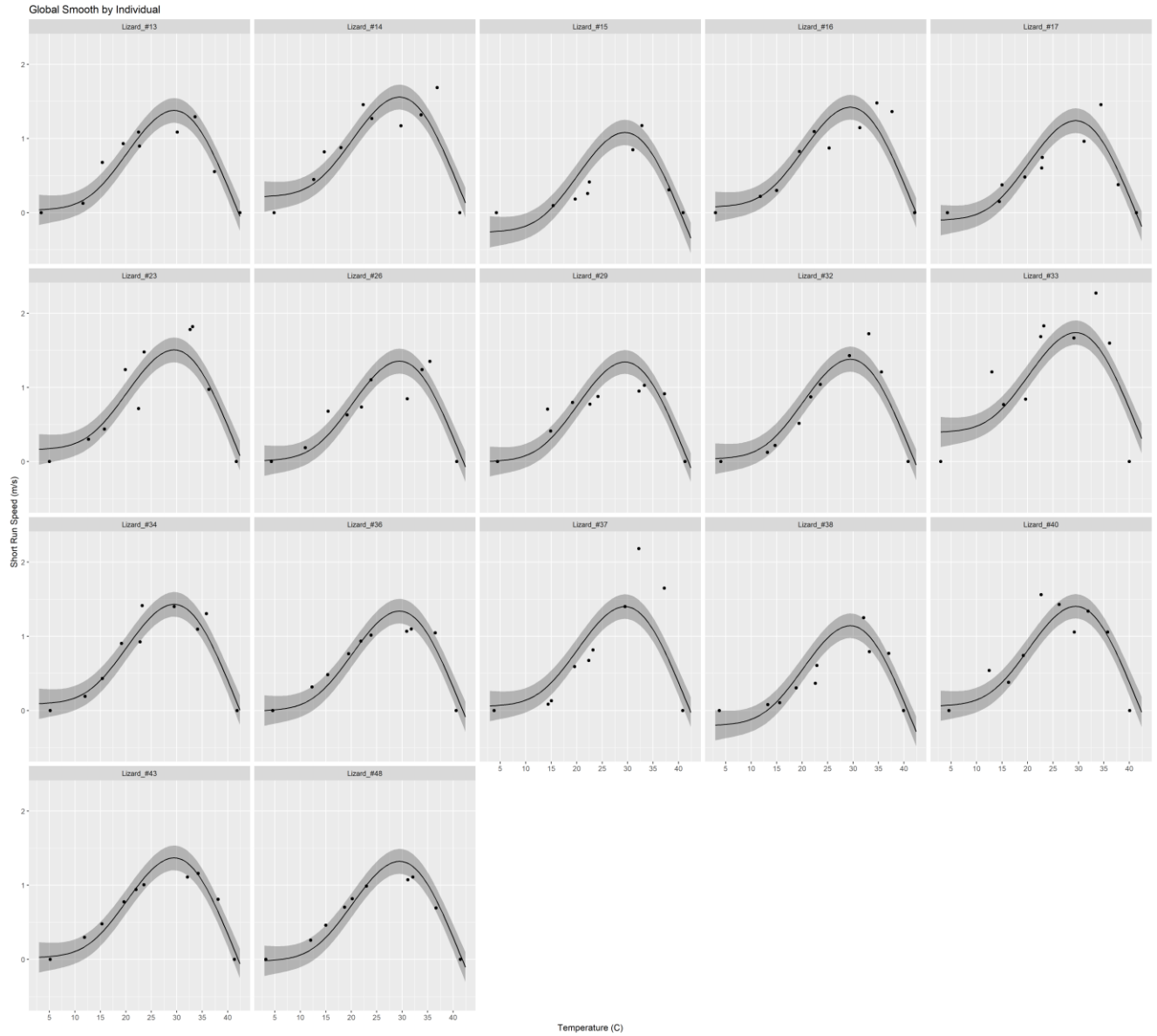


Figura Suplementaria 6. Carreras individuales de 1,05 m para los individuos *Liolaemus lineomaculatus* de la estepa de Calafate, provenientes del Modelo Aditivo Generalizado de Efectos Mixtos.

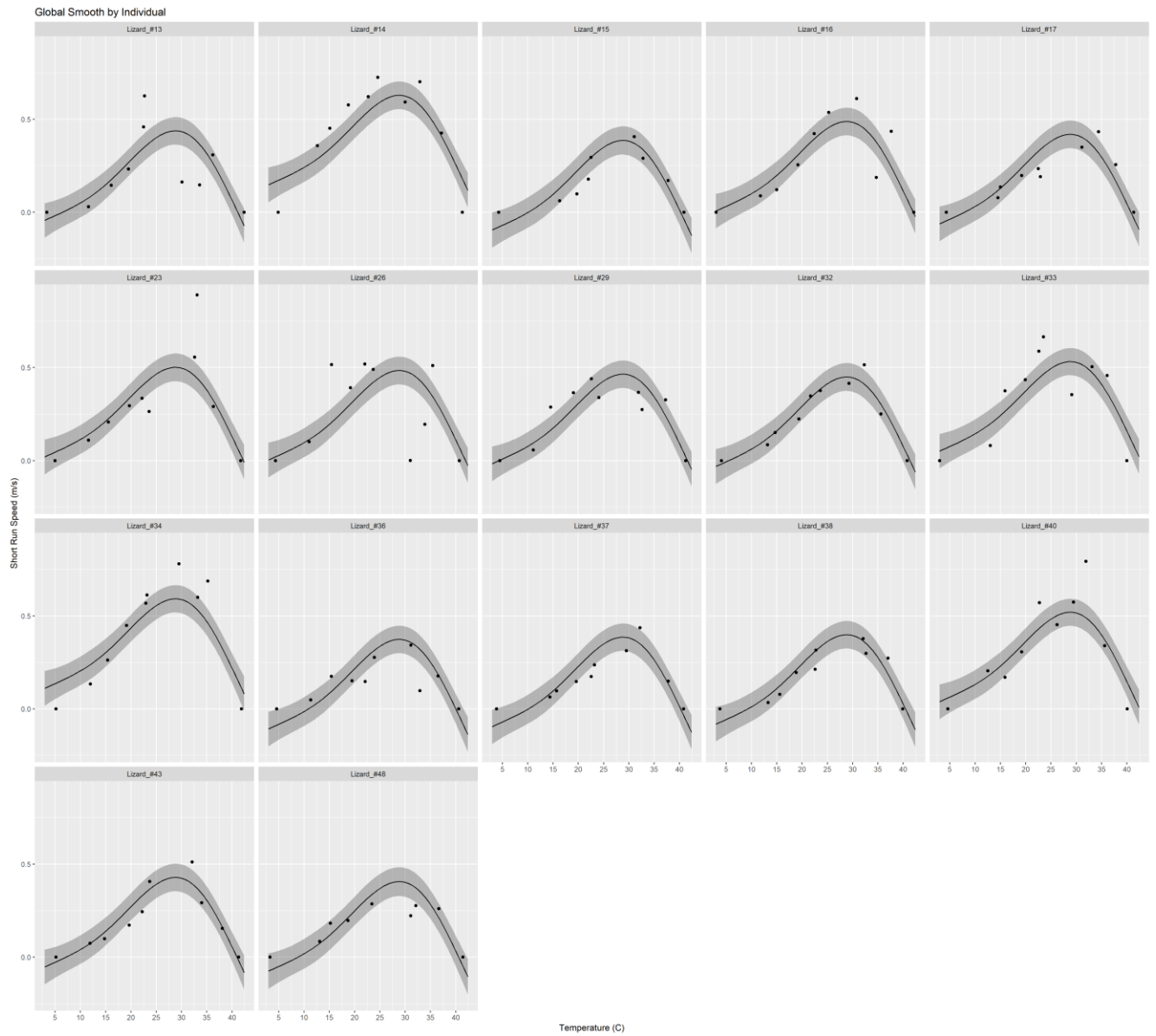


Tabla Suplementaria 4. Comparación por AIC de los modelos con y sin la estructura de mixta para carreras de 0,15 m, carreras de 1,05 m, y ambas carreras a temperaturas subóptimas. El delta (Δ) AIC representa la diferencia entre los valores de AIC de los modelos comparados.

	Carreras de 0.15 m	Carreras de 1.05 m	Carreras de 0.15 m a temp. Subóptimas	Carreras de 1.05 m a temp. subóptimas
AIC de los modelos con estructura mixta	195,33	-556,36	0,25	-380,37
AIC de los modelos sin estructura mixta	246,30	-450,18	47,68	-300,39
Δ AIC	50,97	106,18	47,43	79,98

La supervivencia a temperaturas extremadamente bajas (y, más específicamente, al congelamiento) fue descrita por primera vez por Reaumur (1736) en insectos y generó interés científico sobre la fisiología de este fenómeno en este y otros grupos taxonómicos. El primer enfoque moderno de los estudios sobre la tolerancia al frío fue llevado a cabo por Bachmetjew (1901), quien introdujo el uso de termocuplas para medir la temperatura de congelamiento de los insectos. Sin embargo, a pesar de las numerosas investigaciones relacionadas con la tolerancia al frío, los conocimientos sobre muchos procesos como aquellos relacionados con la formación de hielo y la ubicación del hielo en el animal congelado no están tan claros aún, mientras que ciertos descubrimientos parecen contradecir la tendencia general.

Por ejemplo, si bien el modelo clásico de supervivencia de animales que toleran el congelamiento supone la formación de hielo extracelular, se han encontrado casos de supervivencia ante formación de hielo intracelular en algunos grupos de invertebrados (Salt 1962; Wharton & Ferns 1995). No sólo esto, sino que hay variedad entre tipos de célula dentro de estos organismos, sólo ciertos tipos celulares como las células de los cuerpos grasos parecen tolerar el congelamiento intracelular (Salt 1959). Por otro lado, tradicionalmente se presentan a la tolerancia al congelamiento y la evitación del congelamiento por supercooling como estrategias alternativas y casi excluyentes entre sí para una especie, pero se encontraron especies que pueden alternar entre una y otra, como las crías de *Chrysemys picta* (Paukstis et al. 2011), si bien las razones por las que uno u otro mecanismo es adoptado por una determinada especie o población siguen siendo poco claras. Otro paradigma de la tolerancia a las temperaturas extremadamente bajas es que los animales tolerantes al congelamiento inician la formación de hielo a temperaturas apenas debajo del punto de congelamiento de sus fluidos corporales. La nucleación cerca del punto de congelamiento permite una lenta tasa de congelamiento que maximiza el tiempo que los animales tienen para implementar ajustes que ayuden a la supervivencia. Sin embargo, en *Zootoca vivípara*, Berman et al. (2016) encontraron que los individuos podían permanecer superenfriados a -3°C para luego congelarse y permanecer congelados por dos meses. En vertebrados terrestres, el estudio de la fisiología y ecología de la supervivencia a temperaturas extremadamente bajas es mucho más reciente que en invertebrados, habiendo comenzado con un informe de Schmid (1982) sobre la supervivencia al congelamiento en tres especies de ranas. Todas estas irregularidades y

brechas de conocimiento enfatizan la necesidad de continuar investigando sobre las particularidades de la tolerancia al frío en vertebrados terrestres y quizás descubrir nuevas contradicciones a los paradigmas clásicos.

El objetivo general de esta tesis fue aportar al conocimiento de cómo dos especies de lagartos, *Liolaemus pictus* y *Liolaemus lineomaculatus* lidian con el frío de Patagonia, enfocándonos en dos especies modelos abundantes y con un amplio rango de distribución latitudinal y altitudinal. Por un lado, se observaron los mecanismos fisiológicos que les permiten sobrevivir las heladas invernales; por otro lado, se analizaron las características del paisaje que pueden utilizar para evitar incurrir en grandes gastos energéticos utilizando dichos mecanismos fisiológicos y, finalmente, se observó cómo estos lagartos pueden utilizar los escasos e intermitentes momentos de luz y calor en la primavera y el otoño. En relación a este objetivo general, planteé la hipótesis que los lagartos de climas fríos presentan respuestas ecológicas, fisiológicas o ambas que les permiten la supervivencia a temperaturas bajo 0°C presentes durante la mayor parte del invierno y esporádicamente en otoño y primavera. Para comprobar esta hipótesis se realizó la predicción que *Liolaemus pictus* y *L. lineomaculatus* utilizan refugios que reducen el riesgo de congelamiento y presentan, además, mecanismos fisiológicos, como la tolerancia al congelamiento y la capacidad de superenfriamiento. No pude encontrar refugios de invierno de estas especies, pero los refugios potenciales demostraron ser capaces de proveer a las lagartijas de protección suficiente para reducir el riesgo de congelamiento. Por otro lado, ambas especies demostraron ser capaces de al menos superenfriarse, con lo cual considero que esta hipótesis no puede ser rechazada y las predicciones se cumplieron suficientemente. Planteé también la hipótesis que la variación en la temperatura ambiental asociada a gradientes altitudinales y latitudinales afecta las respuestas ecológicas y fisiológicas de los lagartos resultando en diferencias interpoblacionales en cuanto a la capacidad de tolerancia al clima frío, donde las poblaciones de mayor elevación o latitud tendrán una mayor capacidad de tolerar el frío. Se predijo en base a esto que, para ambas especies, la temperatura de congelamiento, el CT_{Min} , T_o y B_{80} disminuyen en función de la elevación o latitud. Esta predicción se cumplió parcialmente, dado que en los experimentos de rendimiento locomotor no se pudieron ver diferencias en T_o ni en B_{80} , pero si se pudieron observar diferencias en CT_{Min} y en el punto de congelamiento entre poblaciones en relación al régimen térmico de los ambientes. Por lo tanto, tampoco se puede rechazar la segunda hipótesis general planteada en esta tesis.

Hay un claro gradiente de complejidad de los sitios de muestreo que va desde los sitios más complejos, con una amplia variedad de potenciales refugios, en los bosque de baja y mediana elevación que ocupa *Liolaemus pictus*, a las estepas que ocupa *L. lineomaculatus*, siendo la estepa de Calafate el sitio con menor complejidad. Mientras que en los bosques los lagartos se pueden refugiar bajo troncos, árboles y arbustos, rocas y hojarasca; en las estepas cuentan con sólo algunas especies de arbustos en baja abundancia, rocas y ocasionales madrigueras abandonadas de pequeños y medianos mamíferos. En los bosques, donde el régimen de temperatura no es tan extremo como en las estepas, *L. pictus* tiene numerosos potenciales refugios donde pasaría poco o ningún tiempo a temperaturas bajo cero. En las estepas, las temperaturas bajo cero parecen inevitables, pero *L. lineomaculatus* podría pasar muy poco tiempo a temperaturas cercanas o inferiores a las de los puntos de superenfriamiento (PSE) de cada población. Se encontró que, a pesar de no haber podido explorar completamente la variabilidad de los sitios ni poder colocar réplicas para cada tipo de potencial refugio, en todos los sitios analizados los lagartos patagónicos podrían comportamentalmente amortiguar la variabilidad y extremos de las temperaturas ambientales en los meses más fríos del año. Los refugios naturales de invierno son notoriamente difíciles de localizar, especialmente en especies de tamaño relativamente pequeño, con lo cual es lógica la falta de información básica sobre ellos. Lamentablemente, esto implica que hay una brecha de conocimiento sobre cómo efectivamente pasan el invierno los lagartos: a qué temperatura, tasas de enfriamiento, porcentaje de humedad, si bruman en conjunto o en refugios individuales. Si bien en esta tesis tampoco se pudo ubicar a los lagartos en el invierno, se encontraron un gran número de alternativas a las cuales los lagartos podrían acceder sin mucho esfuerzo (ningún potencial refugio estuvo enterrado a más de 15 cm, y algunos fueron colocados debajo de una roca o arbusto sin enterrar), que les proveerían de sustancial protección para estar resguardados de predadores potenciales e inclemencias climáticas durante meses. En futuros estudios se podrían investigar las características de los refugios sobre la base de observaciones del comportamiento en el terreno y del uso de la tecnología de rastreo que revelen qué refugios utilizan realmente los lagartos en el campo, en particular durante el invierno. Esto permitiría conocer si las temperaturas que los lagartos experimentan en los refugios, menos extremas que las ambientales, les implicarían gastos energéticos a futuro con el incremento de temperaturas por calentamiento global, alterando el balance del presupuesto energético y de cuerpos grasos durante el invierno, lo cual se podría simular experimentalmente. Con respecto a las temporadas de actividad intermitente, en el Capítulo I se pudo demostrar cómo muchos de estos potenciales refugios pueden servir como

escondites temporarios para evitar la depredación o temperaturas extremas, permitiendo a los lagartos termorregular sin estar expuestos, con más y mejores opciones en la estepa altoandina cerca de Esquel en relación a la estepa cerca de Calafate.

Si bien considero que la búsqueda de refugios adecuados es una parte clave de cómo los lagartos patagónicos sobreviven a los meses más fríos, heladas esporádicas pueden suceder y, en ciertos ambientes como las estepas altoandinas y de gran latitud, probablemente sean inevitables. En estas situaciones, pudimos ver en el Capítulo II que tanto *Liolaemus pictus* como *L. lineomaculatus* tienen herramientas fisiológicas para lidiar con temperaturas bajo cero ante las cuales la supervivencia parecería improbable. Ninguna de las dos especies fue capaz de tolerar el congelamiento, pero dieron claros indicios de tener la capacidad de superenfriarse, con variación en dicha capacidad entre poblaciones en el caso de *L. lineomaculatus*.

Considerando el análisis de potenciales refugios, los puntos de superenfriamiento (PSE) de ambas especies (y de ambas poblaciones en el caso de *L. lineomaculatus*) son ecológicamente relevantes, ya que les permitirían sobrevivir las ocasionales heladas en las cuales las temperaturas llegaron a dichos valores. Es notorio el caso de la población de *L. pictus* proveniente del bosque de baja elevación, sitio en el cual no se encontraron valores inferiores a los 0°C, donde el PSE (-5,3°C) fue similar al de *L. lineomaculatus* en la estepa altoandina (-5,8°C), donde las temperaturas estuvieron bajo 0°C numerosas veces durante el invierno. Es posible que para *L. pictus* la tolerancia al frío sea un carácter más bien conservativo, o quizás las temperaturas registradas en los potenciales refugios seleccionados en ese sitio hayan subestimado la severidad de un invierno típico en un bosque de baja elevación en San Carlos de Bariloche. En futuros trabajos, sería muy interesante probar si la tolerancia al frío de estas especies cambia a lo largo del año, como sucede en algunos artrópodos (Salt 1966) y tortugas (Packard et al. 2001).

Los análisis bioquímicos para todas las poblaciones y especies mostraron cambios significativos en la concentración después de la exposición al frío sólo para glucosa, en posible asociación indirecta o secundaria con mecanismos de tolerancia al frío. Considerando los PSE de estas especies y poblaciones, significativamente por debajo de los 0°C, es posible que estas especies estén utilizando algún metabolito para disminuir coligativa o no-coligativamente el punto de enfriamiento de los fluidos corporales que no se consideraron en nuestros análisis, posiblemente incluso alguno no reportado en la bibliografía previamente. La capacidad de sobrevivir a bajas temperaturas deriva probablemente de capacidades

relacionadas con la marcada estacionalidad que tienen los animales que viven a grandes elevaciones o latitudes, particularmente ectotermos, como el hipometabolismo (que implica no sólo la administración de reservas energéticas y bioquímicas en relación a los meses de inactividad, sino también una serie de estrategias de defensa celular), y la tolerancia a la hipoxia y a niveles variables de fluidos corporales. De hecho, se postula que la producción de crioprotectores por parte de los organismos tolerantes al congelamiento surgió a partir de respuestas metabólicas preexistentes relacionadas a la desecación (Churchill & Storey 1993). La tolerancia al frío extremo es una sumatoria de adaptaciones que funcionan de manera sinérgica, permitiendo que ciertas especies puedan resistir y hasta prosperar en las regiones más inhóspitas del planeta, donde el hielo y la nieve predominan. Además, la identificación de mecanismos y vías fisiológicas relacionadas con la tolerancia al frío extremo (y, especialmente, la tolerancia al congelamiento) podrían permitir grandes avances en el desarrollo de tecnologías de criopreservación para biomedicina.

A pesar de las notables diferencias en calidad térmica y fisionomía del paisaje entre los ambientes, el análisis de las curvas de rendimiento locomotor proveniente de las carreras sólo mostró diferencias en el rango de tolerancia térmica (y, más específicamente, en el CT_{Min}) y una forma diferente de las curvas de rendimiento térmico en las carreras de 0,15 m. Además, el análisis de las curvas con foco en las temperaturas subóptimas tampoco dio diferencias entre poblaciones, indicando que esta especie tiene un rendimiento locomotor optimizado incluso ante distintos regímenes térmicos. Es notorio que la inclusión de la variabilidad, tanto interpoblacional como intrapoblacional, permitió detectar sutiles diferencias entre poblaciones y mejoró significativamente todos los modelos en las que fue incluida, ya que tradicionalmente se consideran que las curvas de rendimiento locomotor tienden a adoptar una misma forma general y no siempre se contemplan estas variabilidades.

Esta tesis destaca la importancia de realizar estudios comparativos en las que se intenta integrar la perspectiva fisiológica con la variabilidad interpoblacional e intrapoblacional, así como con la mayor cantidad de elementos del paisaje posible. Con respecto a los elementos del paisaje, destaco la importancia que podría tener a futuro encontrar los refugios que los lagartos utilizan durante el invierno. Encontrar los refugios permitiría asignar áreas utilizadas por los lagartos durante la brumación y coordinar con las correspondientes delegaciones de Parques Nacionales o Fauna Silvestre si hay senderos que las atraviesan, o si están expuestas a otros tipos de impacto (como pisoteo por ganado, por ejemplo), a los fines de concentrar los esfuerzos de protección durante esos meses en los

cuales los lagartos están en un momento muy frágil para su supervivencia. La identificación de “áreas de brumación” permitiría estrategias de manejo y conservación que implicarían poco costo económico, poco esfuerzo y, con la perspectiva del cambio climático global y los cambios que se producirán en la cobertura de nieve y espacio subniveo, potencialmente muy importantes para la conservación de lagartos patagónicos y otras especies.

- Adolph; S.C., & Porter; W.P. 1993. Temperature, activity, and lizard life histories. *The American Naturalist* **142**: 273–295.
- Angilletta; M.J. 2001. Thermal and physiological constraints on energy assimilation in a widespread lizard (*Sceloporus undulatus*). *Ecology* **82**: 3044–3056. Wiley Online Library.
- Angilletta; M.J. 2006. Estimating and comparing thermal performance curves. *Journal of Thermal Biology* **31**: 541–545.
- Angilletta; M.J. 2009. *Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis*. Oxford University Press.
- Angilletta; M.J., Niewiarowski; P.H., & Navas; C.A. 2002. The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of Thermal Biology* **27**: 249–268.
- Angilletta; M.J., Wilson; R.S., Navas; C.A., & James; R.S. 2003. Tradeoffs and the evolution of thermal reaction norms. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 234–240.
- Artacho; P., Jouanneau; I., & Le Galliard; J.F. 2013. Interindividual variation in thermal sensitivity of maximal sprint speed, thermal behavior, and resting metabolic rate in a lizard. *Physiological and Biochemical Zoology* **86**: 458–469.
- Bachmetjew; P. 1901. *Experimentelle entomologische Studien. Erster Balid*. Leipzig.
- Bakhach; J. 2009. The cryopreservation of composite tissues. *Organogenesis* **5**: 119–126.
- Bartheld; J.L., Artacho; P., & Bacigalupe; L. 2017. Thermal performance curves under daily thermal fluctuation: A study in helmeted water toad tadpoles. *Journal of Thermal Biology* **70**: 80–85.
- Basson; C.H., Levy; O., Angilletta; M.J., & Clusella-Trullas; S. 2017. Lizards paid a greater opportunity cost to thermoregulate in a less heterogeneous environment. *Functional Ecology* **31**: 856–865.
- Baudier; K.M., Mudd; A.E., Erickson; S.C., & O'Donnell; S. 2015. Microhabitat and body size effects on heat tolerance: Implications for responses to climate change (army ants: Formicidae, Ecitoninae). *Journal of Animal Ecology* **84**: 1322–1330.
- Baust; J.G. 1991. The freeze tolerance oxymoron. *Cryo-Letters* **12**: 1–2.

- Bauwens; D., Castilla; A.M., Van Damme; R., & Verheyen; R.F. 1990. Field body temperatures and thermoregulatory behavior of the high altitude lizard, *Lacerta bedriagae*. *Journal of Herpetology* **24**: 88–91.
- Beck; D.D., & Jennings; R.D. 2003. Habitat use by Gila monsters: the importance of shelters. *Herpetological monographs* **17**: 111–129.
- Bennett; A.F. 1980. The thermal dependence of lizard behavior. *Animal Behaviour* **28**: 752–762.
- Bennett; A.F. 1990. Thermal dependence of locomotor capacity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **259**: 253–258.
- Berman; D.I., Bulakhova; N.A., Alfimov; A.V., & Meshcheryakova; E.N. 2016. How the most northern lizard, *Zootoca vivipara*, overwinters in Siberia. *Polar Biology* **39**: 2411–2425.
- Berman; D.I., Leirikh; A.N., & Mikhailova; E.I. 1984. Winter hibernation of the Siberian salamander *Hynobius keyserlingi*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* **3**: 323–327.
- Bonino; M.F., Azócar; D.L.M., Tulli; M.J., Abdala; C.S., Perotti; M.G., & Cruz; F.B. 2011. Running in cold weather: Morphology, thermal biology, and performance in the southernmost lizard clade in the world (*Liolaemus lineomaculatus* section: Liolaemini: Iguania). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **315 A**: 495–503.
- Bonino; M.F., Moreno Azócar; D.L., Schulte; J.A., & Cruz; F.B. 2015. Climate change and lizards: changing species' geographic ranges in Patagonia. *Regional Environmental Change* **15**: 1121–1132.
- Boretto; J.M., & Ibagüengoytía; N.R. 2009. *Phymaturus* of Patagonia, Argentina: Reproductive biology of *Phymaturus zapalensis* (Liolaemidae) and a comparison of sexual dimorphism within the genus. *Journal of Herpetology* **43**: 96–104.
- Boretto; J.M., Cabezas-Cartes; F., & Ibagüengoytía; N.R. 2018. Slow life histories in lizards living in the highlands of the Andes Mountains. *Journal of Comparative Physiology B* **188**: 491–503.

- Bowker; R.G., Bowker; G.E., & Wright; C.L. 2013. Thermoregulatory movement patterns of the lizard *Podarcis carbonelli* (Lacertilia: Lacertidae). *Journal of Thermal Biology* **38**: 454–457. 110
- Bowler; K., & Terblanche; J.S. 2008. Insect thermal tolerance: What is the role of ontogeny, ageing and senescence? *Biological Reviews* **83**: 339–355.
- Boyero; L., Pearson; R.G., Gessner; M.O., Barmuta; L.A., Ferreira; V., Graça; M.A.S., Dudgeon; D., Boulton; A.J., Callisto; M., Chauvet; E., Helson; J.E., Bruder; A., Albariño; R.J., Yule; C.M., Arunachalam; M., Davies; J.N., Figueroa; R., Flecker; A.S., Ramírez; A., Death; R.G., Iwata; T., Mathooko; J.M., Mathuriau; C., Gonçalves; J.F., Moretti; M.S., Jinggut; T., Lamothe; S., M'Erimba; C., Ratnarajah; L., Schindler; M.H., Castela; J., Buria; L.M., Cornejo; A., Villanueva; V.D., & West; D.C. 2011. A global experiment suggests climate warming will not accelerate litter decomposition in streams but might reduce carbon sequestration. *Ecology Letters* **14**: 289–294.
- Brattstrom; B.H. 1968. Thermal acclimation in anuran amphibians as a function of latitude and altitude. *Comparative Biochemistry and Physiology* **24**: 93–111.
- Broeckhoven; C., & Nortier; F. 2015. Some like it hot : Camera traps unravel the effects of weather conditions and predator presence on the activity levels of two lizards. *PLoS One* **10**, e0137428.
- Buckley; L.B., Ehrenberger; J.C., & Angilletta; M.J. 2015. Thermoregulatory behaviour limits local adaptation of thermal niches and confers sensitivity to climate change. *Functional Ecology* **29**: 1038–1047.
- Burke; R.L., Hussain; A.A., Storey; J.M., & Storey; K.B. 2002. Freeze tolerance and supercooling ability in the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, introduced to Long Island, New York. *Copeia* **2002**: 836–842.
- Cabezas-Cartes; F., Kubisch; E. L., & Ibarzüengoytía; N. R. 2014. Consequences of volcanic ash deposition on the locomotor performance of the *Phymaturus spectabilis* lizard from Patagonia, Argentina. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, **321**: 164-172.
- Cabrera; A.L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **14**: 1–42.

- Calderon; S., Holmstrup; M., Westh; P., & Overgaard; J. 2009. Dual roles of glucose in the freeze-tolerant earthworm *Dendrobaena octaedra*: cryoprotection and fuel for metabolism. *Journal of Experimental Biology* **212**: 859–866.
- Castilla; A.M., Van Damme; R., & Bauwens; D. 1999. Field body temperatures, mechanisms of thermoregulation and evolution of thermal characteristics in lacertid lizards. *Natura Croatica* **8**: 253–274.
- Cecchetto; N.R., Medina; S.M., Taussig; S., & Ibagüengoytía; N.R. 2019. The lizard abides: cold hardiness and winter refuges of *Liolaemus pictus argentinus* in Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Zoology* **782**: 773–782.
- Cei; J.M. 1988. Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. Herpetofauna de las zonas áridas y semiáridas. *In* Mitt. zool. Mus. *Edited By* M. regionale di scienze Naturali. Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali.
- Chown; S.L., Gaston; K.J., & Robinson; D. 2004. Macrophysiology: large-scale patterns in physiological traits and their ecological implications. *Functional Ecology* **18**: 159–167.
- Chown; S.L., Hoffmann; A.A., Kristensen; T.N., Angilletta; M.J., Stenseth; N.C., & Pertoldi; C. 2010. Adapting to climate change: A perspective from evolutionary physiology. *Climate Research* **43**: 3–15.
- Christian; K.A., & Tracy; C.R. 1981. The effect of the thermal environment on the ability of hatchling Galapagos land iguanas to avoid predation during dispersal. *Oecologia* **49**: 218–223.
- Churchill; T.A., & Storey; K.B. 1993. Dehydration tolerance in wood frogs: a new perspective on development of amphibian freeze tolerance. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **265**: 1324–1332.
- Clark; V.M., & Miller; A.T. 1973. Studies on anaerobic metabolism in the fresh-water turtle (*Pseudemys scripta elegans*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **44**: 55–62.
- Claussen; D.L., & Zani; P.A. 1991. Allometry of cooling, supercooling, and freezing in the freeze-tolerant turtle *Chrysemys picta*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **261**: 626–632.

- Claussen; D.L., Townsley; M.D., & Bausch; R.G. 1990. Supercooling and freeze-tolerance in the European wall lizard, *Podarcis muralis*, with a revisional history of the discovery of freeze-tolerance in vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B* **160**: 137–143.
- Claussen; D.L., Daniel; P.M., Jiang; S., & Adams; N.A. 1991. Hibernation in the eastern box turtle, *Terrapene c. carolina*. *Journal of Herpetology*: 334–341
- Clusella-Trullas; S., Blackburn; T.M., & Chown; S.L. 2011. Climatic predictors of temperature performance curve parameters in ectotherms imply complex responses to climate change. *The American Naturalist* **177**: 738–751.
- Clusella-Trullas; S., & Chown; S.L. 2014. Lizard thermal trait variation at multiple scales: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **184**: 5–21.
- Colwell; R.K., Brehm; G., Cardelús; C.L., Gilman; A.C., & Longino; J.T. 2008. Global warming, elevational range shifts, and lowland biotic attrition in the wet tropics. *science* **322**: 258–261.
- Costanzo; J. 2011. Extreme cold hardiness in ectotherms. *Nature Education Knowledge* **2**: 10–10.
- Costanzo; J.P., & Lee; R.J. 1995. Supercooling and ice nucleation in vertebrate ectotherms. *Biological Ice Nucleation and Its Applications*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota: 221–237.
- Costanzo; J.P., Claussen; D.L., & Lee; R.J. 1988. Natural freeze tolerance in a reptile. *Cryo-Letters* **5**: 5–10.
- Costanzo; J.P., Lee; R.E., & Wright; M.F. 1991a. Effect of cooling rate on the survival of frozen wood frogs, *Rana sylvatica*. *Journal of Comparative Physiology B* **161**: 225–229.
- Costanzo; J.P., Lee; R.E., & Wright; M.F. 1991b. Glucose loading prevents freezing injury in rapidly cooled wood frogs. *The American Journal of Physiology* **261**: 1549–1553.
- Costanzo; J.P., Grenot; C.J., & Lee; R.E.J. 1995a. Supercooling, ice inoculation and freeze tolerance in the European common lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Comparative Physiology B* **165**: 238–244.

- Costanzo; J.P., Iverson; J.B., Wright; M.F., & Lee; R.J. 1995b. Cold hardiness and overwintering strategies of hatchlings in an assemblage of northern turtles. *Ecology* **76**: 1772–1785.
- Costanzo; J.P., Lee; R.J., Devries; A.L., Wang; T., & Layne; J.R. 1995c. Survival mechanisms of vertebrate at subfreezing temperatures: applications in cryomedicine. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **9**: 351–358.
- Costanzo; J.P., Litzgus; J.D., & Lee; R.E. 1999. Behavioral responses of hatchling painted turtles (*Chrysemys picta*) and snapping turtles (*Chelydra serpentina*) at subzero temperatures. *Journal of Thermal Biology* **24**: 161–166.
- Costanzo; J.P., Litzgus; J.D., Iverson; J.B., & Lee; R.J. 2000. Seasonal changes in physiology and development of cold hardiness in the hatchling painted turtle *Chrysemys picta*. *Journal of Experimental Biology* **203**: 3459–3470.
- Costanzo; J.P., Dinkelacker; S. a, Iverson; J.B., & Lee; R.J. 2004. Physiological ecology of overwintering in the hatchling painted turtle: multiple-scale variation in response to environmental stress. *Physiological and Biochemical Zoology* **77**: 74–99.
- Costanzo; J.P., & Lee; R.E. 2005. Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog. *Journal of Experimental Biology* **208**: 4079–4089.
- Costanzo; J.P., Lee; R.E., & Ultsch; G.R. 2008. Physiological ecology of overwintering in hatchling turtles. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **309**: 297–379.
- Cowles; R.B., & Bogert; C.M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the AMNH* **83**: 53.
- Cruz; F.B., Fitzgerald; L.A., Espinoza; R.E., & Schulte Ii; J.A. 2005. The importance of phylogenetic scale in tests of Bergmann's and Rapoport's rules: lessons from a clade of South American lizards. *Journal of Evolutionary Biology* **18**: 1559-1574.
- Devries; A.L. 1982. Biological antifreeze agents in cold water fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **73**: 627–640.
- DeVries; A.L. 1988. The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of Antarctic fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry* **90**: 611–621.

- Díaz; J.A., & Cabezas-Díaz; S. 2004. Seasonal variation in the contribution of different behavioural mechanisms to lizard thermoregulation. *Functional Ecology* **18**: 867–875.
- Dobrowski; S.Z., Abatzoglou; J.T., Greenberg; J.A., & Schladow; S.G. 2009. How much influence does landscape-scale physiography have on air temperature in a mountain environment? *Agricultural and Forest Meteorology* **149**: 1751–1758.
- Doughty; P. 1994. Critical Thermal Minima of Garter snakes (*Thamnophis*) depend on species and body size. *Copeia* **1994**: 537–540.
- Du; W.-G. 2006. Preferred body temperature and thermal tolerance of the northern grass lizard *Takydromus septentrionalis* from localities with different longitudes. *Acta Zoologica Siniica* **52**: 478–482.
- Espinoza; R.E., & Tracy; C.E. 1997. Thermal biology, metabolism, and hibernation. *In* *Biology, Husbandry, and Health Care of Reptiles*, 1st Editio. *Edited by* L. Ackerman. TFH Pubns Inc, Neptune City, New Jersey. pp. 159–194.
- Ferreya; M., Cingolani; A., Ezcurra; C. & Bran; D. 1998. High-Andean vegetation and environmental gradients in northwestern Patagonia, Argentina. *Journal of Vegetation Science* **9**: 307–316.
- Fernández; J., Smith; J., Scolaro; A., & Ibargüengoytía; N.R. 2011. Performance and thermal sensitivity of the southernmost lizards in the world, *Liolaemus sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus*. *Journal of Thermal Biology* **36**: 15–22.
- Ford; K.R., Ettinger; A.K., Lundquist; J.D., Raleigh; M.S., & Hille Ris Lambers; J. 2013. Spatial heterogeneity in ecologically important climate variables at coarse and fine scales in a high-snow mountain landscape. *PLoS ONE* **8**: e65008.
- Fox; J., & Weisberg; S. 2011. An {R} Companion to Applied Regression. *In* *Second*. Sage, Thousand Oaks (CA).
- Frazier; M.R., Huey; R.B., & Berrigan; D. 2006. Thermodynamics constrains the evolution of insect population growth rates: “Warmer is better.” *The American Naturalist* **168**: 512–520.
- Garreaud; R.D., Vuille; M., Compagnucci; R., & Marengo; J. 2009. Present-day South American climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **281**: 180–195.

- Gavaud; J. 1983. Obligatory hibernation for completion of vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Experimental Zoology* **225**: 397–405.
- Geng; J., Dong; W., Wu; Q., & Lu; H.-L. 2018. Thermal tolerance for two cohorts of a native and an invasive freshwater turtle species. *Acta Herpetologica* **13**: 83–88.
- Graae; B.J., De Frenne; P., Kolb; A., Brunet; J., Chabrierie; O., Verheyen; K., Pepin; N., Heinken; T., Zobel; M., Shevtsova; A., Nijs; I., & Milbau; A. 2012. On the use of weather data in ecological studies along altitudinal and latitudinal gradients. *Oikos* **121**: 3–19.
- Grenot; C.J., Garcin; L., Dao; J., Hérold; J.P., Fahys; B., & Tséré-Pagès; H. 2000. How does the European common lizard, *Lacerta vivipara*, survive the cold of winter? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **127**: 71–80.
- Guisan; A., & Hofer; U. 2003. Predicting reptile distributions at the mesoscale: Relation to climate and topography. *Journal of Biogeography* **30**: 1233–1243.
- Gutiérrez; J.A., Krenz; J.D., & Ibarguengoytía; N.R. 2010. Effect of altitude on thermal responses of *Liolaemus pictus argentinus* in Argentina. *Journal of Thermal Biology* **35**: 332–337.
- Gutiérrez; J.A., Piantoni; C., & Ibarguengoytía; N.R. 2013. Altitudinal effects on life history parameters in populations of *Liolaemus pictus argentinus* (Sauria : Liolaemidae). *Acta Herpetologica* **8**: 9–17.
- Gvozdík; L., & Castilla; A.M. 2001. A comparative study of preferred body temperatures and critical thermal tolerance limits among populations of *Zootoca vivipara* (Squamata: Lacertidae) along an altitudinal gradient. *Journal of Herpetology* **35**: 486–492.
- Hastie; T., & Tibshirani; R. 1987. Generalized additive models: some applications. *Journal of the American Statistical Association* **82**: 371–386.
- Herczeg; G., Herrero; A., Saarikivi; J., Gonda; A., Jantti; M., & Merila; J. 2008. Experimental support for the cost - benefit model of lizard thermoregulation: the effects of predation risk and food supply. *Oecologia* **155**: 1–10.
- Hertz; P.E. 1981. Adaptation to altitude in two West Indian anoles. *Animals* **195**: 25–37.
- Hertz; P.E., & Huey; R.B. 1981. Compensation for altitudinal changes in the thermal environment by some *Anolis* lizards on Hispaniola. *Ecology* **62**: 515–521.

- Hertz; P.E., Huey; R.B., & Nevo; E. 1982. Fight versus flight: Body temperature influences defensive responses of lizards. *Animal Behaviour* **30**: 676–679.
- Hertz; P.E., Huey; R.B., & Nevo; E. 1983. Homage to Santa Anita: thermal sensitivity of sprint speed in agamid lizards. *Evolution* **37**: 1075–1084.
- Hertz; P.E., Huey; R.B., & Stevenson; R. 1993. Evaluating temperature regulation by field-active ectotherms: the fallacy of the inappropriate question. *The American Naturalist* **142**: 796–818.
- Hill; R.W., Wyse; G.A., Anderson; M., & Anderson; M. 2004. *Animal physiology*. Sinauer Associates Sunderland, MA.
- Hoffmann; A.A., Anderson; A., & Hallas; R. 2002. Opposing clines for high and low temperature resistance in *Drosophila melanogaster*. *Ecology letters* **5**: 614–618.
- Holmstrup; M., Bayley; M., & Ramløv; H. 2002. Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *PNAS* **99**: 5716–5720. National Academy of Sciences.
- Huang; S.P., & Tu; M.C. 2008. Cold tolerance and altitudinal distribution of *Takydromus* lizards in Taiwan. *Zoological Studies* **47**: 438–444.
- Huey; R.B. 1991. Physiological Consequences of Habitat Selection. *The American Naturalist* **137**: 91–115.
- Huey; R.B., & Slatkin; M. 1976. Cost and benefits of lizard thermoregulation. *The Quarterly Review of Biology* **51**: 363–384.
- Huey; R.B., & Stevenson; R.D. 1979. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: a discussion of approaches. *American Zoologist* **19**: 357–366.
- Huey; R.B., & Bennett; A.F. 1987. Phylogenetic studies of coadaptation: preferred temperatures versus optimal performance temperature of lizards. *Evolution* **41**: 1098–1115.
- Huey; R.B., & Kingsolver; J.G. 1989. Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends In Ecology & Evolution* **4**: 131–135.
- Huey; R.B., & Kingsolver; J.G. 1993. Evolution of resistance to high temperature in ectotherms. *The American Naturalist* **142**: 21–46.

- Huey; R.B., Deutsch; C.A., Tewksbury; J.J., Vitt; L.J., Hertz; P.E., Pérez; H.J.Á., 117
Garland; T., Alvarez Perez; H.J., & Garland; T. 2009. Why tropical forest lizards are
vulnerable to climate warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological
Sciences* **276**: 1939–1948.
- Huey; R.B., Kearney; M.R., Krockenberger; A., Holtum; J.A.M., Jess; M., & Williams; S.E.
2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: Roles of behaviour,
physiology and adaptation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B:
Biological Sciences* **367**: 1665–1679.
- Ibargüengoytía; N.R. 2000 Interacciones entre el ambiente, las respuestas comportamentales y
la historia de vida del lagarto *Liolaemus elongatus* (Tropiduridae). Director: Dr.
Cussac; V. Centro Regional Universitario Bariloche. Universidad Nacional del
Comahue. (120 Pág., Calificación 10/10 sobresaliente. Categoría CONEAU "A").
- Ibargüengoytía; N.R. 2005. Field, selected body temperature and thermal tolerance of the
syntopic lizards *Phymaturus patagonicus* and *Liolaemus elongatus* (Iguania :
Liolaemidae). *Journal of Arid Environments* **62**: 435–448.
- Ibargüengoytía; N.R., & Cussac; V.E. 1996. Reproductive biology of the viviparous lizard
Liolaemus pictus (Tropiduridae): Biennial female reproductive cycle? *Herpetological
Journal* **6**: 137–143.
- Ibargüengoytía; N.R., & Cussac; V.E. 1998. Reproduction of the viviparous lizard *Liolaemus
elongatus* in the highlands of southern South America: plastic cycles in response to
climate? *Herpetological Journal* **8**: 99–105.
- Ibargüengoytía; N.R., Medina; S., Fernández; J.B., Gutiérrez; J.A., Tappari; F., & Scolaro;
J.A. 2010. Thermal biology of the southernmost lizards in the world: *Liolaemus
sarmientoi* and *Liolaemus magellanicus* from Patagonia, Argentina. *Journal of
Thermal Biology* **35**: 21–27.
- Ibargüengoytía; N.R., Cabezas-Cartes; F., Boretto; J.M., Piantoni; C., Kubisch; E.L.,
Fernández; M.S., Lara-Resendiz; R., Mendez-De La Cruz; F., Scolaro; J.A., &
Sinervo; B.R. 2016. Volcanic ash from Puyehue-Cordon Caulle eruptions affects
running performance and body condition of *Phymaturus* lizards in Patagonia,
Argentina. *Biological Journal of the Linnean Society* **118**: 842–851.

- Irschick; D.J., & Meyers; J.J. 2007. An analysis of the relative roles of plasticity and natural selection in the morphology and performance of a lizard (*Urosaurus ornatus*). *Oecologia* **153**: 489–499.
- Izem; R., & Kingsolver; J.G. 2005. Variation in continuous reaction norms: quantifying directions of biological interest. *The American Naturalist* **166**: 277–289.
- James; C., & Shine; R. 1988. Life-history strategies of Australian lizards: a comparison between the tropics and the temperate zone. *Oecologia* **75**: 307–316.
- Kacelnik; A., & Bateson; M. 1996. Risky theories: The effects of variance on foraging decisions. *American Zoologist* **36**: 402–434.
- Kearney; M., & Predavec; M. 2000. Do nocturnal ectotherms thermoregulate? A study of the temperate gecko *Christinus marmoratus*. *Ecology*, **81**: 2984–2996.
- Kingsolver; J.G. 2009. The well-temperated biologist. *The American Naturalist* **174**: 755–768.
- Kingsolver; J.G., & Huey; R.B. 2006. Introduction: The evolution of morphology, performance, and fitness. *Integrative and Comparative Biology* **43**: 361–366.
- Kingsolver; J.G., Arthur Woods; H., Buckley; L.B., Potter; K.A., MacLean; H.J., & Higgins; J.K. 2011. Complex life cycles and the responses of insects to climate change. *Integrative and Comparative Biology* **51**: 719–732.
- Kinlaw; A. 1999. A review of burrowing by semi-fossorial vertebrates in arid environments. *Journal of Arid Environments* **41**: 127–145.
- Körner; C. 2007. The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 569–574.
- Kubisch; E.L., Fernández; J., & Ibagüengoytía; N.R. 2011. Is locomotor performance optimised at preferred body temperature? A study of *Liolaemus pictus argentinus* from northern Patagonia, Argentina. *Journal of Thermal Biology* **36**: 328–333.
- Kubisch; E., Piantoni; C., Williams; J., Scolaro; A., Navas; C.A., & Ibagüengoytía; N.R. 2012. Do higher temperatures increase growth in the nocturnal gecko *Homonota darwini* (Gekkota: Phyllodactylidae)? A skeletochronological assessment analyzed at temporal and geographic scales. *Journal of Herpetology* **46**: 587–595.

- Kubisch; E.L., Fernández; J.B., & Ibarguengoytía; N.R. 2016. Vulnerability to climate warming of *Liolaemus pictus* (Squamata, Liolaemidae), a lizard from the cold temperate climate in Patagonia, Argentina. *Journal of Comparative Physiology B* **186**: 243–253.
- Labra; A., Pienaar; J., & Hansen; T.F. 2009. Evolution of thermal physiology in *Liolaemus* lizards: adaptation, phylogenetic inertia, and niche tracking. *The American Naturalist*, **174**: 204-220.
- Legendre; P. 2014. *Imodel2: Model II Regression*.
- Lillywhite; H.B., Shine; R., Jacobson; E., DeNardo; D.F., Gordon; M.S., Navas; C.A., Wang; T., Seymour; R.S., Storey; K.B., Heatwole; H., Heard; D., Brattstrom; B., & Burghardt; G.M. 2017. Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: Should hypothermia and freezing be prohibited? *BioScience* **67**: 53–61.
- Lima; S.L. 2002. Putting predators back into behavioral predator–prey interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 70–75.
- Lindsey; A.A., & Newman; J.E. 1956. Use of official weather data in spring time: temperature analysis of an Indiana phenological record. *Ecology* **37**: 812–823.
- Lister; B.C., & Aguayo; A.G. 1992. Seasonality, predation, and the behaviour of a tropical mainland anole. *Journal of Animal Ecology* **61**: 717–733.
- Logan; M.L., Cox; R.M., & Calsbeek; R. 2014. Natural selection on thermal performance in a novel thermal environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 14165–14169.
- Logan; M.L., Fernandez; S.G., & Calsbeek; R. 2015. Abiotic constraints on the activity of tropical lizards. *Functional Ecology* **29**: 694–700.
- Lookingbill; T.R., & Urban; D.L. 2003. Spatial estimation of air temperature differences for landscape-scale studies in montane environments. *Agricultural and Forest Meteorology* **114**: 141–151.
- Lopez-Darias; M., Schoener; T.W., Spiller; D.A., & Losos; J.B. 2012. Predators determine how weather affects the spatial niche of lizard prey: exploring niche dynamics at a fine scale. *Ecology* **93**: 2512–2518.

- Lowe; C.H., Lardner; P.J., & Halpern; E.A. 1971. Supercooling in reptiles and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A: Physiology* **39**: 125–135.
- Lundquist; J.D., Dickerson-Lange; S.E., Lutz; J.A., & Cristea; N.C. 2013. Lower forest density enhances snow retention in regions with warmer winters: A global framework developed from plot-scale observations and modeling. *Water Resources Research* **49**: 6356–6370.
- Mathies; T., & Andrews; R.M. 1995. Thermal and reproductive biology of high and low elevation populations of the lizard *Sceloporus scalaris*, implications for the evolution of viviparity. *Oecologia* **104**: 101–111.
- Mayhew; W.W. 1965. Hibernation in the horned lizard, *Phrynosoma m'calli*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **16**: 103–119.
- Mazur; P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology: cell physiology*. **247**: 125–142.
- Mazur; P. 2004. Principles of cryobiology. *In* Life in the frozen state, Fuller BJ; Lane N, Benson EE. CRC Press, Washington, DC. pp. 3–65.
- Medina; S.M. 2010. Adaptaciones morfológicas y fisiológicas ligadas a la transición oviparidad-viviparidad en lagartos de climas fríos: reproducción y fisiología térmica. Tesis Doctoral.
- Medina; S.M., & Ibarzüengoytía; N.R. 2010. How do viviparous and oviparous lizards reproduce in Patagonia? A comparative study of three species of *Liolaemus*. *Journal of Arid Environments* **74**: 1024–1032.
- Medina; M., Gutiérrez; J., Scolaro; A., & Ibarzüengoytía; N.R. 2009. Thermal responses to environmental constraints in two populations of the oviparous lizard *Liolaemus bibronii* in Patagonia, Argentina. *Journal of Thermal Biology* **34**: 32–40.
- Medina; M., Scolaro; J.A., Méndez-De la Cruz; F., Sinervo; B., & Ibarzüengoytía; N.R. 2011. Thermal relationships between body temperature and environment conditions set upper distributional limits on oviparous species. *Journal of Thermal Biology* **36**: 527–534.
- Medina; M., Scolaro; J.A., Méndez-De la Cruz; F., Sinervo; B., Miles; D.B., Ibarzüengoytía; N.R., Medina; S.M., Scolaro; J.A., Méndez- de la Cruz; F., Sinervo; B., Miles; D.B.,

- & Ibarquengoytía; N.R. 2012. Thermal biology of genus *Liolaemus*: A phylogenetic approach reveals advantages of the genus to survive climate change. *Journal of Thermal Biology* **37**: 579–586.
- Michels-Boyce; M., & Zani; P.A. 2015. Lack of supercooling evolution related to winter severity in a lizard. *Journal of Thermal Biology* **53**: 72–79.
- Mitchell; N., Hipsey; M., Arnall; S., McGrath; G., Tareque; H., Kuchling; G., Vogwill; R., Sivapalan; M., Porter; W., & Kearney; M. 2012. Linking eco-energetics and eco-hydrology to select sites for the assisted colonization of Australia's rarest reptile. *Biology* **2**: 1–25.
- Monasterio; C., Salvador; A., Iraeta; P., & Díaz; J.A. 2009. The effects of thermal biology and refuge availability on the restricted distribution of an alpine lizard. *Journal of Biogeography* **36**: 1673–1684.
- Moritz; C., Langham; G., Kearney; M., Krockenberger; A., VanDerWal; J., & Williams; S. 2012. Integrating phylogeography and physiology reveals divergence of thermal traits between central and peripheral lineages of tropical rainforest lizards. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**: 1680–1687.
- Muir; A.P., Biek; R., & Mable; B.K. 2014. Behavioural and physiological adaptations to low-temperature environments in the common frog, *Rana temporaria*. *Evolutionary Biology* **14**: 1–11.
- Muldrew; K., Acker; J.P., Elliott; J.A.W., & McGann; L.E. 2004. The water to ice transition: implications for living cells. *In* *Life in the frozen state*, Fuller BJ; Lane N, Benson EE. CRC Press, Washington, DC. pp. 67–108.
- Munoz; M.M., Stimola; M.A., Algar; A.C., Conover; A., Rodriguez; A.J., Landestoy; M.A., Bakken; G.S., & Losos; J.B. 2014. Evolutionary stasis and lability in thermal physiology in a group of tropical lizards. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**: 2013–2433.
- Murphy; D. 1983. Freezing resistance in intertidal invertebrates. *Annual Review of Physiology* **45**: 289–299.
- Murphy; M.A., Evans; J.S., & Storfer; A. 2010. Quantifying *Bufo boreas* connectivity in Yellowstone National Park with landscape genetics. *Ecology* **91**: 252–261.

- Nelson; D.O., Heath; J.E., & Prosser; C.L. 1984. Evolution of temperature regulatory mechanisms. *American Zoologist* **24**: 791–807.
- Nussey; D.H., Wilson; A.J., & Brommer; J.E. 2007. The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 831–844.
- Olsson; M., & Shine; R. 1999. Plasticity in frequency of reproduction in an alpine lizard, *Niveoscincus microlepidotus*. *Copeia* **1999**: 794–796.
- Packard; G.C., & Packard; M.J. 2004. To freeze or not to freeze: adaptations for overwintering by hatchlings of the North American painted turtle. *The Journal of Experimental Biology* **207**: 2897–2906.
- Packard; G.C., Packard; M.J., & McDaniel; L.L. 2001. Seasonal change in the capacity for supercooling by neonatal painted turtles. *Journal of Experimental Biology* **204**: 1667–1672.
- Paukstis; G.L., Shuman; R.D., & Janzen; F.J. 2011. Supercooling and freeze tolerance in hatchling painted turtles (*Chrysemys picta*). *Canadian Journal of Zoology* **67**(4), 1082–1084.
- Pauli; J.N., Zuckerberg; B., Whiteman; J.P., & Porter; W. 2013. The subnivium: A deteriorating seasonal refugium. *Frontiers in Ecology and the Environment* **11**: 260–267.
- Pearson; O.P. 1954. Habits of the lizard *Liolaemus m. multiformus* at high altitudes in southern Peru. *Copeia* **1954**: 111–116.
- Peig; J., & Green; A.J. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: The scaled mass index as an alternative method. *Oikos* **118**: 1883–1891.
- Peri; P.L., & Lasagno; R.G. 2010. Biomass, carbon and nutrient storage for dominant grasses of cold temperate steppe grasslands in southern Patagonia, Argentina. *Journal of Arid Environments* **74**: 23–34.
- Perry; G., LeVering; K., Girard; I., & Garland Jr; T. 2004. Locomotor performance and social dominance in male *Anolis cristatellus*. *Animal Behaviour* **67**: 37–47.
- Petty; S.K., Zuckerberg; B., & Pauli; J.N. 2015. Winter conditions and land cover structure the subnivium, a seasonal refuge beneath the snow. *PLoS ONE* **10**: 1–12.

- Pianka; E.R. 1970. Comparative autecology of the lizard *Cnemidophorus tigris* in different parts of its geographic range. *Ecology* **51**: 703–720.
- Piantoni; C., Ibarzüengoytía; N.R., & Cussac; V.E. 2006. Growth and age of the southernmost distributed gecko of the world (*Homonota darwini*) studied by skeletochronology. *Amphibia-Reptilia* **27**: 393–400.
- Piantoni; C., Curcio; F.F., Ibarzüengoytía; N.R., & Navas; C.A. 2019. Implications of climate change on the habitat shifts of tropical lizards. *Austral Ecology* **44**: 1174–1186.
- Pinheiro; J., Bates; D., DebRoy; S., Sarkar; D., & R Core Team. 2017. {nlme}: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models.
- Pörtner; H.O., Van Dijk; P.L.M., Hardewing; I., & Sommer; A. 2000. Levels of metabolic cold adaptation: Tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. *In: Antarctic Ecosystems: models for wider ecological understanding. Edited by W. Davison and C. Howard Williams. Caxton Press, Christchurch, New Zealand. pp: 109–122.*
- Pringle; R.M., Webb; J.K., & Shine; R. 2003. Canopy structure, microclimate, and habitat selection by a nocturnal snake, *Hoplocephalus bungaroides*. *Ecology* **84**: 2668–2679.
- R Core Team. 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Reaumur; R. 1736. Mémoires pour servir à l’histoire des insectes. Tome second. Suite de l’histoire des chenilles & des papillons. Vol. 5. De l’Imprimerie royale.
- Renner; M., Cussac; V., Ibarzüengoytía; N.R., Piantoni; C., & Boretto, J.M. 2007. Thermal effects on locomotion in the nocturnal gecko *Homonota darwini* (Gekkonidae). *Amphibia-Reptilia* **28**: 235–246.
- Robert Feldmeth; C., Stone; E.A., & Brown; J.H. 1974. An increased scope for thermal tolerance upon acclimating pupfish (*Cyprinodon*) to cycling temperatures. *Journal of Comparative Physiology* **89**: 39–44.
- Robson; M., & Miles; D. 2000. Locomotor performance and dominance in male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Functional Ecology* **14**: 338–344.
- Rose; N.L., Yang; H., Turner; S.D., & Simpson; G.L. 2012. An assessment of the mechanisms for the transfer of lead and mercury from atmospherically contaminated organic soils to lake sediments with particular reference to Scotland, UK. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **82**: 113–135.

- Rupp; D.E., Mote; P.W., Bindoff; N.L., Stott; P.A., & Robinson; D.A. 2013. Detection and attribution of observed changes in Northern Hemisphere spring snow cover. *Journal of Climate* **26**: 6904–6914.
- Salt; R. 1959. Survival of frozen fat body cells in an insect. *Nature* **184**: 1426–1426.
- Salt; R.W. 1962. Intracellular freezing in insects. *Nature* **193**: 1207–1208.
- Salt; R.W. 1966. Factors influencing nucleation in supercooled insects. *Canadian Journal of Zoology* **44**: 117–133.
- Schmid; W.D. 1982. Survival of frogs in low temperature. *Science* **215**: 697–698.
- Schwanz; L.E., & Janzen; F.J. 2008. Climate change and temperature-dependent sex determination: Can individual plasticity in nesting phenology prevent extreme sex ratios? *Physiological and Biochemical Zoology* **81**: 826–834.
- Scolaro; J.A. 2005. *Reptiles Patagónicos Sur: una guía de campo*. Universidad Nacional de la Patagonia, Trelew, Argentina.
- Sears; M.W., & Angilletta; M.J. 2015. Costs and benefits of thermoregulation revisited: Both the heterogeneity and spatial structure of temperature drive energetic costs. *The American Naturalist* **185**: 94–102.
- Seebacher; F. 2005. A review of thermoregulation and physiological performance in reptiles: What is the role of phenotypic flexibility? *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **175**: 453–461.
- Sformo; T., Walters; K., Jeannet; K., Wowk; B., Fahy; G.M., Barnes; B.M., & Duman; J.G. 2010. Deep supercooling, vitrification and limited survival to -100°C in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) larvae. *Journal of Experimental Biology* **213**: 502–509.
- Shine; R., Webb; J.K., Fitzgerald; M., & Sumner; J. 1998. The impact of bush-rock removal on an endangered snake species, *Hoplocephalus bungaroides* (Serpentes: Elapidae). *Wildlife Research* **25**: 285–295.
- Shuter; B., & Post; J.R. 1990. Climate, population viability, and the zoogeography of temperate fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* **119**: 314–336.
- Sinclair; B.J., Marshall; K.E., Sewell; M.A., Levesque; D.L., Willett; C.S., Slotsbo; S., Dong; Y., Harley; C.D.G., Marshall; D.J., Helmuth; B.S., & Huey; R.B. 2016. Can we

predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecology Letters* **19**: 1372–1385.

125

- Sinclair; B.J., Stinziano; J.R., Williams; C.M., Macmillan; H.A., Marshall; K.E., & Storey; K.B. 2013. Real-time measurement of metabolic rate during freezing and thawing of the wood frog, *Rana sylvatica*: implications for overwinter energy use. *The Journal of Experimental Biology* **216**: 292–302.
- Snell; H.L., Jennings; R.D., Snell; H.M., & Harcourt; S. 1988. Intrapopulation variation in predator-avoidance performance of Galapagos lava lizards: the interaction of sexual and natural selection. *Evolutionary Ecology* **2**: 353–369.
- Sømme; L. 1982. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A: Physiology* **73**: 519–543.
- Spellerberg; I.F. 1972. Temperature tolerances of southeast Australian reptiles examined in relation to reptile thermoregulatory behaviour and distribution. *Oecologia* **9**: 23–46.
- Speziale; K.L., Ruggiero; A., & Ezcurra; C. 2010. Plant species richness–environment relationships across the Subantarctic–Patagonian transition zone. *Journal of Biogeography* **37**: 449–464.
- Stankowich; T., & Blumstein; D.T. 2005. Fear in animals: A meta-analysis and review of risk assessment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**: 2627–2634.
- Stellatelli; O.A., Block; C., Villalba; A., Vega; L.E., Dajil; J.E., & Cruz; F.B. 2018. Behavioral compensation buffers body temperatures of two *Liolaemus* lizards under contrasting environments from the temperate Pampas: a Bogert effect? *Ethology Ecology & Evolution* **30**: 297–318.
- Stephens; D.W., & Charnov; E.L. 1982. Optimal foraging : Some simple stochastic models. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **10**: 251–263.
- Stillman; J.H. 2003. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science* **301**: 65.
- Storey; B. 1990. Life in a frozen state : adaptive freeze tolerance in amphibians strategies for natural and reptiles. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **258**: 559–568.
- Storey; K.B. 2006. Reptile freeze tolerance: Metabolism and gene expression. *Cryobiology* **52**: 1–16.

- Storey; K.B., & Storey; J.M. 1986. Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially hibernating amphibians. *Comparative Biochemistry And Physiology* **83**: 613–617.
- Storey; K.B., & Storey; J.M. 1996. Natural freezing survival in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 365–386.
- Storey; K.B., & Storey; J.M. 2017. Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. *Physiological Reviews* **97**: 623–665.
- Storey; K.B., McDonald; D.G., Duman; J.G., & Storey; J.M. 1991. Blood chemistry and ice nucleating activity in hatchling painted turtles. *Cryo-Letters* **12**: 351–358.
- Strobbe; F., McPeck; M.A., De Block; M., De Meester; L., & Stoks; R. 2009. Survival selection on escape performance and its underlying phenotypic traits: a case of many-to-one mapping. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 1172–1182.
- Sunday; J.M., Bates; A.E., & Dulvy; N.K. 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**: 1823–1830.
- Swoap; S.J., Johnson; T.P., Josephson; R.K., & Bennett; A.F. 1993. Temperature, muscle power output and limitations on burst locomotor performance of the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Journal of Experimental Biology* **174**: 199–213.
- Tattersall; G.J., Sinclair; B.J., Withers; P.C., Fields; P.A., Seebacher; F., Cooper; C.E., & Maloney; S.K. 2012. Coping with thermal challenges: Physiological adaptations to environmental temperatures. *Comprehensive Physiology* **2**: 2151–2202.
- Taucare-Rios; A., Veloso; C., & Bustamante; R.O. 2018. Thermal niche conservatism in an environmental gradient in the spider *Sicarius thomisoides* (Araneae: Sicariidae): Implications for microhabitat selection. *Journal of Thermal Biology* **78**: 298–303.
- Thompson; M.E., Halstead; B.J., & Donnelly; M.A. 2018. Thermal quality influences habitat use of two *Anolis* species. *Journal of Thermal Biology* **75**: 54–61.
- Tocher; M.D., & Davison; W. 1996. Differential thermal acclimation of metabolic rate in two populations of the New Zealand common gecko *Hoplodactylus maculatus* (Reptilia: Gekkonidae). *Journal of Experimental Zoology* **275**: 8–14.
- Tsuji; J. 1988. Seasonal profiles of standard metabolic rate of lizards (*Sceloporus occidentalis*) in relation to latitude. *Physiological Zoology* **61**: 230–240.

- Vali; G. 1996. - Ice Nucleation: a review. *In* Nucleation and Atmospheric Aerosols 127
1996. Edited by M. Kulmala and P.E. Wagner. Pergamon, Amsterdam. pp. 271–279.
- Van Damme; R., Bauwens; D., & Verheyen; R.F. 1990. Evolutionary rigidity of thermal physiology: the case of the cool temperate lizard *Lacerta vivipara*. *Oikos*: 61–67.
- Vicenzi; N., Corbalán; V., Miles; D., Sinervo; B., & Ibagüengoytía; N. 2017. Range increment or range detriment ? Predicting potential changes in distribution caused by climate change for the endemic high-Andean lizard *Phymaturus palluma*. *Biological Conservation* **206**: 151–160.
- Vicenzi; N., Kubisch; E., Ibagüengoytía; N., & Corbalán; V. 2018. Thermal sensitivity of performance of *Phymaturus palluma* (Liolaemidae) in the highlands of Aconcagua: vulnerability to global warming in the Andes. *Amphibia-Reptilia* **01**: 1–12.
- Vitt; L.J., & Caldwell; J.P. 2014. *Amphibians and Reptiles Herpetology Fourth Edition*.
- Voituron; Y., Mouquet; N., De Mazancourt; C., & Clobert; J. 2002a. To freeze or not to freeze? An evolutionary perspective on the cold-hardiness strategies of overwintering ectotherms. *American Naturalist* **160**: 255–270.
- Voituron; Y., Storey; J.M., Grenot; C., & Storey; K.B. 2002b. Freezing survival, body ice content and blood composition of the freeze-tolerant European common lizard, *Lacerta vivipara*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **172**: 71–76.
- Voituron; Y., Heulin; B., & Surget-Groba; Y. 2004. Comparison of the cold hardiness capacities of the oviparous and viviparous forms of *Lacerta vivipara*. *Journal of Experimental Zoology Part A-Comparative Experimental Biology* **301A**: 97–108.
- Waldschmidt; S., & Tracy; C.R. 1983. Interactions between a lizard and its thermal environment: implications for sprint performance and space utilization in the lizard *Uta stansburiana*. *Ecology* **64**: 476–484.
- Warner; T.T. 2009. *Desert meteorology*. Cambridge University Press. Tesis.
- Webb; J.K., & Shine; R. 1998. Using thermal ecology to predict retreat-site selection by an endangered snake species. *Biological Conservation* **86**: 233–242.
- Weeks; D.M., & Espinoza; R.E. 2013. Lizards on ice: Comparative thermal tolerances of the world's southernmost gecko. *Journal of Thermal Biology* **38**: 225–232.

- Weisrock; D.W., & Janzen; F.J. 1999. Thermal and fitness-related consequences of nest location in Painted Turtles (*Chrysemys picta*). *Functional Ecology* **13**: 94–101.
- Wharton; D., & Ferns; D. 1995. Survival of intracellular freezing by the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *Journal of Experimental Biology* **198**: 1381–1387.
- Willard; R., Packard; G.C., Packard; M.J., & Tucker; J.K. 2000. The role of the integument as a barrier to penetration of ice into overwintering hatchlings of the painted turtle (*Chrysemys picta*). *Journal of Morphology* **246**: 150–159.
- Williams; C.M., Henry; H.A.L.L., & Sinclair; B.J. 2015. Cold truths: how winter drives responses of terrestrial organisms to climate change. *Biological Reviews* **90**: 214–235.
- Winne; C.T., & Keck; M.B. 2005. Intraspecific differences in thermal tolerance of the diamondback watersnake (*Nerodia rhombifer*): Effects of ontogeny, latitude, and sex. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* **140**: 141–149.
- Wolanczyk; J.P., Baust; J.G., & Storey; K.B. 1990. Seasonal ice nucleating activity in the freeze tolerant frog, *Rana sylvatica*. *Cryo-Letters* **11**: 143–150.
- Wood; S., & Wood; M.S. 2015. Package ‘mgcv.’ R package version: 1–7.
- Yancey; P.H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of experimental biology* **208**: 2819–2830.
- Yang; J., Sun; Y.-Y., An; H., & Ji; X. 2008. Northern grass lizards (*Takydromus septentrionalis*) from different populations do not differ in thermal preference and thermal tolerance when acclimated under identical thermal conditions. *Journal of Comparative Physiology B* **178**: 343–349.
- Zagar; A., Carretero; M.A., Marguc; D., Simcic; T., & Vrezec; A. 2018. A metabolic syndrome in terrestrial ectotherms with different elevational and distribution patterns. *Ecography* **41**: 1728–1739.
- Zamora-Camacho; F.J., Rubiño-Hispán; M.V., Reguera; S., & Moreno-Rueda; G. 2015. Thermal dependence of sprint performance in the lizard *Psammmodromus algirus* along a 2200-meter elevational gradient: Cold-habitat lizards do not perform better at low temperatures. *Journal of Thermal Biology* **52**: 90–96.

Agradecimientos

130

Antes que nada, quisiera agradecer a INIBIOMA y a la Universidad Nacional del Comahue por darme el lugar de trabajo, y por su educación pública y gratuita. También quisiera agradecer a CONICET, por otorgarme la beca que me permitió realizar este doctorado.

Al tribunal evaluador por el tiempo y la dedicación brindada a esta tesis: Dres. Cardozo Milanesio, Cruz y Stelatelli.

Al Laboratorio de Ecofisiología e Historia de vida de Reptiles, por brindarme la oportunidad, el espacio y los materiales para realizar esta tesis. Por darme una mano con cualquier cosa que me hizo falta en su realización y siempre con la mejor de las ondas. Mis más sinceras gracias a mis directoras Nora y Marlín por todo lo aprendido durante estos años de formación.

Gracias a la familia, por el apoyo, el aguante y la ayuda. A lxs chicxs del cole, que probablemente jamás lean esta tesis. A lxs chicxs de la UNC, que hicieron que la distancia no se note tanto. A las amistades nuevas generadas en Bariloche (incluyendo, por supuesto, a las amistades que comenzaron en Bariloche pero ahora se dispersaron por el mundo), por tantos paseos, juntadas y sesiones no profesionales de terapia de grupo, que no dejan de ser una forma de socialismo.

A Talia y Guazú, por su incondicional e inquebrantable compañía.

Y por sobre todo, a Flor, por todos estos años de aventuras y sorpresas, de paciencia inagotable en los momentos complicados y de alegría perruna en los momentos felices.

Gracias totales.