

Convocatoria AEET-SIBECOL de ayudas a proyectos de investigación ERC en ecología (11ª ed., 2021)

1. Datos de identificación.

Título de la propuesta	Aplicación de modelos mecanicistas para develar las respuestas fisiológicas al ambiente de lagartos verdes en la cuenca del Mediterráneo
Categoría	Tomando la iniciativa
Nombre y apellidos del Beneficiario	Carolina Pilar Reyes Puig
Datos de contacto: e-mail y teléfono	carolinareyespuig@cibio.up.pt/+351911868754
Departamento/Instituto/Grupo de Investigación/Otros	Facultad de Ciencias, Universidad de Porto. CIBIO-InBIO, Programa de Doctorado en Biodiversidad Genética y Evolución BIODIV
Dirección, código postal, provincia	Rua Monte Cativo 192, 4050-397, Porto, Portugal

2. Memoria Técnica. Actividades y resultados de investigación

2.1. Introducción (Planteamiento, objetivos y justificación)

El cambio global es definido como los impactos producidos por actividades humanas sobre la biosfera (Barnard and Thuiller, 2009; Hansen et al., 2011). En la actualidad se han descrito declives poblacionales significativos, cambios en los rangos de distribución y aumentos en las tasas de extinción en algunos organismos (en comparación con eras geológicas pasadas) (Pimm et al., 1994; Bellard et al., 2014). En este contexto, las principales amenazas a la biodiversidad incluyen a la pérdida de hábitat, la sobreexplotación de recursos, el cambio climático, enfermedades emergentes, especies invasivas y sus sinérgicas interacciones (Hoffmann et al., 2010; Hortal et al., 2015). Los cambios asociados con efectos del cambio climático son de particular importancia para organismos que dependen de la temperatura ambiental externa para cumplir con sus procesos de desarrollo, crecimiento y reproducción (i.e. ectotermos) (Angilletta et al., 2004). Las fluctuaciones de temperatura pueden alterar las reacciones termales e inducir un estrés metabólico, teniendo efectos negativos sobre el éxito reproductivo y la dinámica de las poblaciones (Paaijmans et al., 2013; Kingsolver et al., 2013). El cambio ambiental global ya está teniendo fuertes efectos sobre la biodiversidad. Los ectotermos, en particular, se consideran altamente vulnerables al cambio climático, ya que dependen en gran medida de las condiciones ambientales (por ejemplo, la temperatura del aire, la humedad ambiental) (Sunday et al., 2011; Vitt and Caldwell, 2013) Su capacidad de



termorregulación es un mecanismo activo que desencadena importantes procesos ecológicos, incluida la selección de sitios dentro de una matriz de paisaje y el enfrentamiento de los costos energéticos para mantener todas las funciones fisiológicas (Sears et al., 2016). Para comprender los impactos de la variabilidad climática actual y futura sobre la biodiversidad, es necesario aclarar varios mecanismos micro-climáticos y evolutivos que modifican directamente las respuestas fisiológicas y ecológicas en los ectotermos (Sears et al., 2016; Kearnet et al., 2018). Por lo que la exploración de parámetros fisiológicos que incluyan análisis a microescala de variables climáticas externas y la respuesta de dichos organismos es esencial para entender efectos futuros del cambio climático sobre poblaciones de ectotermos. A través de este proyecto proveemos un marco integrado para un mejor entendimiento de las respuestas de organismos modelo (lagartos verdes) frente al ambiente en la cuenca del Mediterráneo. Generamos modelos mecanicistas de nicho en dos especies de lagartos verdes (i.e. los lagartos verdes *Lacerta schreiberi* y *Timon lepidus*) como una aproximación para entender las consecuencias de la variación fisiológica, morfológica y funcional a nivel individual, identificamos las principales variables que contribuyen a la variación de microclimas y exploramos el papel de la variación morfológica en las respuestas fisiológicas y funcionales de los organismos modelos.

2.2. Descripción de la ejecución- Metodología

Trabajo de campo

Las actividades de campo se enfocaron en el posicionamiento, distribución y descarga de datos de 25 dataloggers en dos microhábitats (herbáceo y rocoso) del área de estudio en el norte de Portugal en Castro de São Paio (41.312257°N, -8.737074°W; 12 m), esto con el fin de extraer información microclimática asociada a variables ambientales como temperatura y humedad de los microhábitats mencionados. Esta información ayudó a calibrar y generar modelos microclimáticos que fueron utilizados para los posteriores modelos mecanicistas de dos especies de lagartijas verdes registradas en el área de estudio (i.e., *Lacerta shreiberi* y *Timon lepidus*). Por otro lado, durante el trabajo de campo se realizó la colecta de 26 individuos de *Timon lepidus* y 15 *Lacerta shreiberi*, todos machos adultos. Junto a los individuos colectados registramos información ecológica de variables abióticas, así como también termografía a través del uso de una termo-cámara integrada en el teléfono CAT S62 Pro para poder tener acceso a información de

temperaturas corporales in situ. Los ejemplares fueron movilizados al Laboratorio de Ecofisiología del CIBIO – Centro de Investigación en Biodiversidad y Recursos Genéticos - Laboratorio Asociado InBIO, BIOPOLIS en Vairão. En el laboratorio se realizaron experimentos de desempeño, termogradientes y pérdida de agua detallados a continuación.

Desempeño

Se realizaron corredores de 2 metros de largo por 2 cm de ancho con sustrato de corcho, en donde se realizaron experimentos de desempeño locomotor. Los animales capturados en Castro S. Paio fueron llevados directamente al Laboratorio de Ecofisiología (CIBIO-InBIO) y después de 12 horas de reposo y ambientación del cuarto a 25 grados centígrados, los ejemplares fueron llevados a estufas entre 31-32 grados para que logren su mejor desempeño a la temperatura seleccionada (Ferreira et al. 2016). Para todos los individuos se realizaron tres repeticiones de corridas “sprint speed” en los corredores mencionados, la misma que fue grabada con una cámara Casio EXILIM EX-F1 a una velocidad de filmación de 30 fps. La posición de la lagartija en cada ensayo se digitalizó utilizando el software de análisis de movimiento MaxTRAQ 2D (Innovision Systems Inc., 2009)

Termogradientes

Se calcularon temperaturas preferidas (T_p), las mismas que son consideradas como las temperaturas corporales en ausencia de limitaciones de termorregulación (Angilletta 2009). Los lagartos fueron expuestos a un gradiente fototérmico entre 20 y 50 grados centígrados generado por una bombilla infrarroja de 150 Watts en uno de los bordes de los terrarios siguiendo las sugerencias de (Veríssimo and Carretero, 2009). Cada lagarto fue posicionado en un terrario individual con al menos 24 horas de adaptación antes de registrar datos. Los lagartos no fueron alimentados durante 48 horas. Todo el experimento fue conducido en un cuarto con temperatura controlada a 18 grados centígrados. Realizamos el experimento durante un día completo para cada ejemplar entre las 09:00 AM y las 17:30 PM, tomando mediciones termográficas de temperatura con una termo-cámara integrada en el teléfono CAT S62 Pro y con una FLIR T335 thermal camera para confirmar mediciones. Los registros de temperatura se realizaron evitando la alteración en el comportamiento de los animales y con mediciones cada treinta minutos.

Pérdida de agua

Los experimentos de pérdida de agua fueron realizados con los individuos sin comida durante las últimas 72 horas. Cada lagarto fue mantenido individualmente en un sistema

abierto compuesto de tres cámaras. Cinco oxigenadores se conectaron a la primera llena con silica gel para secar el aire hasta un rango de 3-8%, la segunda cámara fue designada para el lagarto y la tercera cámara contenía registrador de temperatura y humedad marca HOBO U23 Pro V2. El sistema fue conectado a un flujómetro para mantener el flujo de oxígeno estable entre 0.8-1 LPM. Cada experimento tuvo una duración de 2 horas y media. Una vez extraída la información del registrador, se exploraron los datos y se tomaron los cinco tramos más estables de los valores de humedad para los análisis de datos. Es importante mencionar que se realizaron controles dentro del sistema de flujo, cada experimento con animal contó con un respectivo control.

Mesocosmos

Se tomaron muestras de lagartijas verdes (26) de la especie *Timon lepidus* de una población muy densa del norte de Portugal (Castro São Paio). Para estudiar cómo la variación individual influye en la forma en que los animales exploran su entorno (microhábitats y microclimas), construimos cuatro recintos, o mesocosmos (10×10m cada uno), que contienen microhábitats que se asemejan al entorno natural de las lagartijas (Fig. 1). El espacio utilizado para el mesocosmos se encuentra en las instalaciones del CICGE - Centro de Investigación en Ciencias Geoespaciales en el Observatorio Astronómico Profesor Manuel de Barros de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Oporto (Vila Nova de Gaia, Portugal). Las condiciones del microclima de los mesocosmos se registraron con dispositivos de registro de datos (dataloggers) durante todo el experimento. El experimento del mesocosmos duró siete semanas en total en los meses de mayo y junio 2023. Durante este periodo los animales fueron liberados en mesocosmos individuales, en grupos de cuatro cada semana. Cada grupo de cuatro lagartos pasó una semana en sus recintos separados, incluyendo también al menos dos y como máximo tres días para la aclimatación.

Antes de liberar a las lagartijas, las equipábamos con dispositivos de registro externos (<https://www.technosmart.eu/axy-trek-mini/>), adheridos dorsalmente a la base de sus colas, que contenían sensores de aceleración, temperatura, temperatura relativa humedad y luz (Fig. 1). Durante su estancia en los mesocosmos, los animales fueron libres de explorar sus microhábitats y microclimas disponibles según sus necesidades, mientras que los dispositivos de registro en sus espaldas proporcionaban alta resolución, constante (una vez cada décima de segundo para aceleración y una vez por segundo para el resto de las variables) registros de su actividad, la temperatura y humedad relativa a su alrededor y su posición en relación con la luz (p. ej., tomando el sol, resguardados). Después de cuatro

días de observaciones, los lagartos fueron extraídos de los mesocosmos y descargamos la información directamente. Posteriormente, los sensores se conectaron a cuatro nuevos lagartos, que nuevamente fueron liberados en los mesocosmos individuales.

Desarrollamos este experimento durante los meses de primavera, cuando las lagartijas están más activas y su comportamiento es más relevante para los estudios de uso del hábitat.

Al mismo tiempo, durante cuatro días después del período de aclimatación de cada semana, estuvimos tomando observaciones a intervalos durante el día para registrar la posición exacta de cada lagarto en el mesocosmos durante su período de actividad diaria. Registramos las coordenadas directamente en una tableta de campo sobre una ortofotografía digital creado por un dron (Fig. 1). Este mapa de escala fina también contiene información sobre la altura relativa de los microhábitats del mesocosmos (mapa de elevación digital o DEM). Después de la conclusión del experimento para todas las lagartos, los datos sin procesar requirieron un manejo y procesamiento minuciosos debido a su tamaño y detalle. Los individuos fueron liberados en sus puntos de colecta originales en Castro S. Paio una vez culminadas todas las actividades relacionadas con laboratorio y mesocosmos.



Figura 1 cuatro mesocosmos tras su construcción, a principios de mayo, representados a través del ortofotomapa creado por el dron.

Modelos mecanicistas

Como parte del modelado biofísico desarrollamos modelos mecanicistas usando NicheMapR (Kearney and Porter, 2017, 2020). NicheMapR incluye procesos que resuelven gastos energéticos tanto en los microclimas como en los organismos, dando como entrada información abiótica, morfología y fisiología. De este modo estimamos las temperaturas de mayor actividad, y las temperaturas (en equilibrio) que los organismos podrían alcanzar a dados microhábitats. Los parámetros establecidos para el modelo ectotermo fueron extraídos de los datos experimentales de laboratorio (pérdida de agua, temperatura preferida, rangos de temperatura para actividad, etc.)

Análisis de datos

Para los experimentos de termogradientes, las fotografías fueron analizadas con el software FLIR Tools 2.1 (Copyright 2014 FLIR Systems), se extrajeron las temperaturas del ojo, las cuáles son las más cercanas a la temperatura corporal (Barroso et al. 2016). Una vez obtenidas las temperaturas, se calcularon los valores mínimos, máximos, medios y el set-point range de las temperaturas. De los valores extraídos para pérdida de agua se calculó la densidad de vapor a saturación con con la función WETAIR del Paquete NicheMapR (Kearney and Porter, 2017, 2020), y calculamos el total de pérdida de agua por evaporación y finalmente se calculó la pérdida de agua específica de la masa, la mismo que toma en cuenta el peso del organismo. Para los análisis de los datos experimentales de termogradientes, pérdida de agua y locomoción se utilizaron modelos ANOVA y ANCOVA, incorporando los efectos de especies y el tamaño corporal (i.e. longitud rostro-cloaca o peso). Todos los análisis de datos fueron realizados en el programa estadístico R (R Core Tema, 2022)

Durante el experimento del mesocosmos, los lagartos estaban equipados con dispositivos de registro externos, que también contenían un acelerómetro, registrando la aceleración en tres ejes a una frecuencia de 10 Hz. Los acelerómetros triaxiales se pueden utilizar para responder a una amplia gama de preguntas ecológicas y comprender en detalle las relaciones entre el comportamiento animal y el medio ambiente (Patterson et al., 2019). Pueden implementarse para rastrear animales durante largos períodos de tiempo y con alta resolución temporal, midiendo su aceleración en tres dimensiones de movimiento (x: movimiento hacia adelante, y: movimiento lateral, z: movimiento vertical). El sensor de aceleración se ve afectado en los tres ejes tanto por la aceleración gravitatoria debida al campo gravitatorio terrestre (postura del animal) como por la aceleración inercial debida al movimiento del animal. Esto significa que en condiciones estáticas (cuando el animal

está inmóvil) la señal de aceleración solo representa la fuerza gravitatoria que actúa sobre los sensores (Brown et al., 2013).

La salida del acelerómetro sin procesar que se obtuvo del sensor de cada animal, medida en g ($1\text{ g} = 9,8\text{ m/s}^2$), consiste en el componente estático y el componente dinámico. Para calcular los cambios en la velocidad de los animales (movimiento), necesitábamos inferir la aceleración dinámica restando la aceleración estática de cada eje. Para estimar la aceleración estática, los datos de los sensores de cada animal se suavizaron sobre una media móvil de 1 s. La media móvil se tomó de los datos sin procesar de cada eje de aceleración, promediando los datos a ambos lados de un punto medio (Shepard et al., 2018). Luego, se obtuvo la aceleración dinámica del cuerpo (DBA) de cada eje restando la aceleración estática de los datos sin procesar. A partir de estos valores, las métricas generales de aceleración del cuerpo, como la Aceleración Dinámica del Cuerpo Vectorial

($\text{VeDBA} = \sqrt{DBA_x^2 + DBA_y^2 + DBA_z^2}$) se pueden calcular, que combinan la aceleración dinámica del cuerpo en todos los ejes tridimensionales (Qasem et al., 2012). Debido a la falta de un conjunto de datos de entrenamiento, se necesitó un método de clasificación no supervisado. Se consideró que un método de aprendizaje automático no supervisado era la mejor manera y, específicamente, se utilizó el algoritmo CLARA (Clustering Large Applications). CLARA es un algoritmo de agrupamiento basado en el método k-medoids, para manejar grandes conjuntos de datos (Kaufman y Rousseeuw 1990). El algoritmo CLARA se corrió usando el paquete “cluster” en R. Para el conjunto de datos del sensor de cada lagarto, la agrupación se creó utilizando tres estadísticas de resumen relacionadas con el movimiento del eje x (movimiento hacia adelante) que se consideraron más adecuadas para distinguir entre los estados móvil e inmóvil: DBA_x , $SDBA_x$, $\max DBA_x$. En cada caso, los clusters resultantes dieron un valor umbral diferente para el VeDBA, que va de 0,09 a 0,2 g, por debajo del cual los valores de aceleración significan un estado inmóvil, y por encima del cual implican movimiento. Para tener resultados sin sesgo para los análisis entre los diferentes animales, que podrían atribuirse al proceso de agrupación para cada animal individual, se eligió el mismo umbral para todos los conjuntos de datos de animales. Se consideró que el mejor umbral universal es el mínimo de todos ($\text{VeDBA} = 0,09\text{ g}$), que funciona mejor para clasificar el tiempo de movimiento o inmovilidad de todos los individuos.

2.3. Resultados obtenidos (cumplimiento de objetivos)

Con respecto al desempeño en velocidad de carrera hallamos que no existen diferencias entre las dos especies ($F = 0.9386$, $Z = 0.48009$, $p = 0.346$) y del mismo modo el tamaño corporal se relacionó con las velocidades de corrida respectivamente ($F = 0.5791$, $Z = 0.15087$, $p = 0.478$). Con respecto a las temperaturas preferidas (T_p), se identificó que *L. schreiberi* posee valores de T_p ligeramente mayores que *T. lepidus* (Tabla 1, Figura 2), sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($F = 0.0668$, $Z = -0.88345$, $p = 0.8045$). Por otro lado, los valores de T_p máximos si mostraron diferencias significativas entre especies ($F = 8.8758$, $Z = 2.358$, $p = 0.004$ **), así como los mínimos ($F = 9.0762$, $Z = 2.4799$, $p = 0.003$ **).

Tabla 1. Temperaturas preferidas en dos especies de lagartos verdes

T_p^*	<i>Lacerta schreiberi</i>	<i>Timon lepidus</i>
Mínimo	20.4	25.2
Máximo	35.7	34.7
Media	30.38	30.32
Set-point-range	29.2-31.62	29.26-31.35

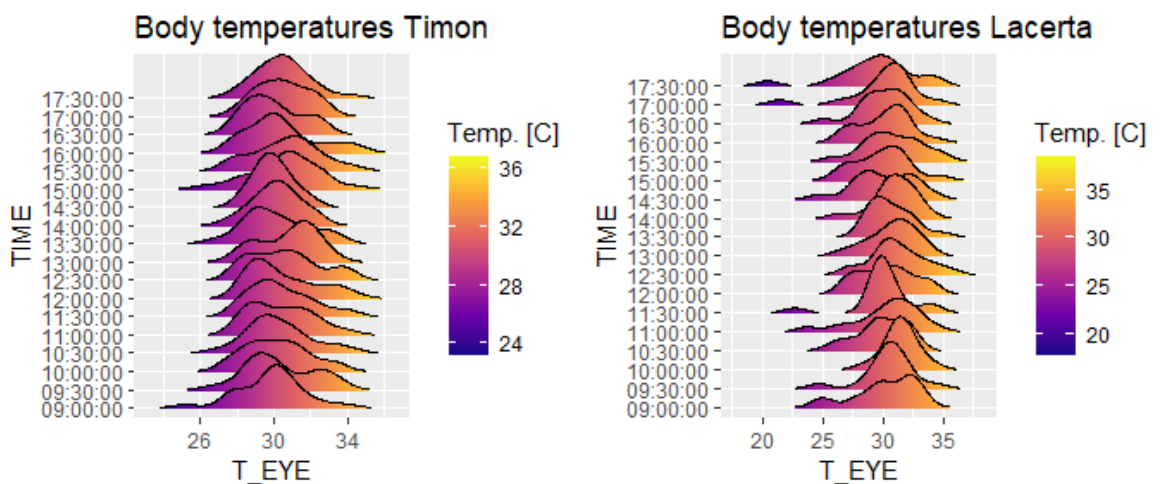


Figura 2. Temperaturas preferidas de dos lagartos verdes del Mediterráneo.

Los resultados relacionados con pérdida de agua mostraron que la especie con mayor pérdida de agua es *L. schreiberi* para todas las replicas (Fig. 3).

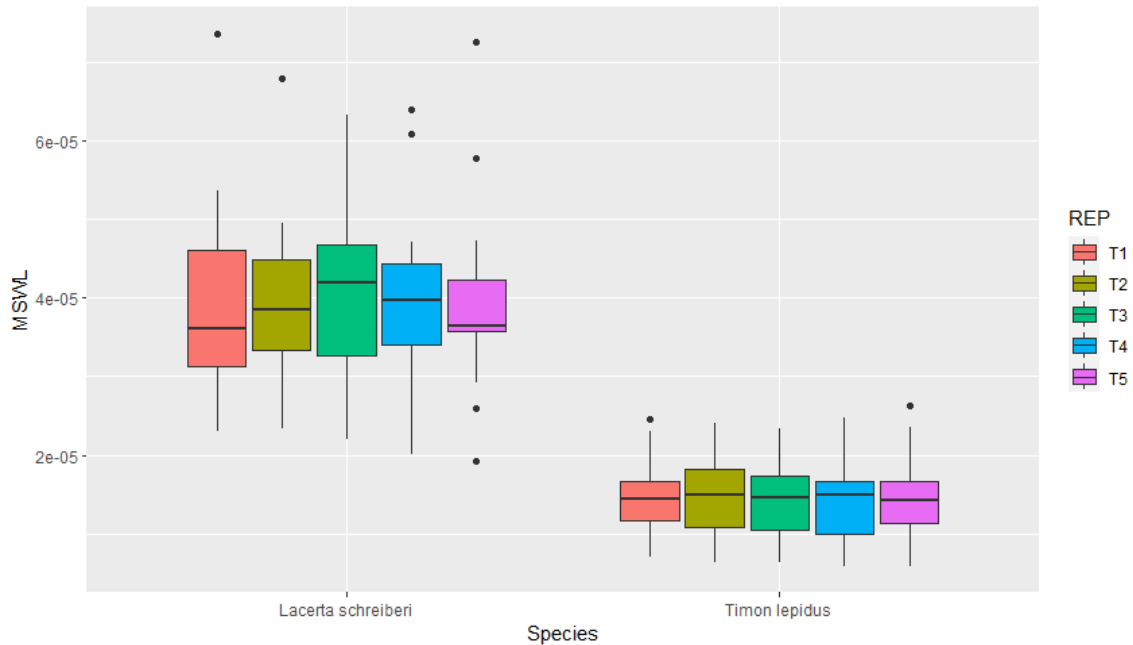


Figura 3. MSWL (pérdida de agua específica de masa) de dos especies de lagartos verdes del Mediterráneo

Además, se detectaron diferencias significativas entre especies ($t = -2.278$, $p = 0.02893$ *) y se detectó una relación negativa entre la pérdida de agua específica de masa y el peso de los animales ($t = -3.274$, $p = 0.00239$ **).

Los resultados preliminares del mesocosmos y actividad de los individuos monitorizados muestran que los picos de mayor actividad se congregan a partir de los 20 grados centígrados hasta los 38 grados (Fig. 4).

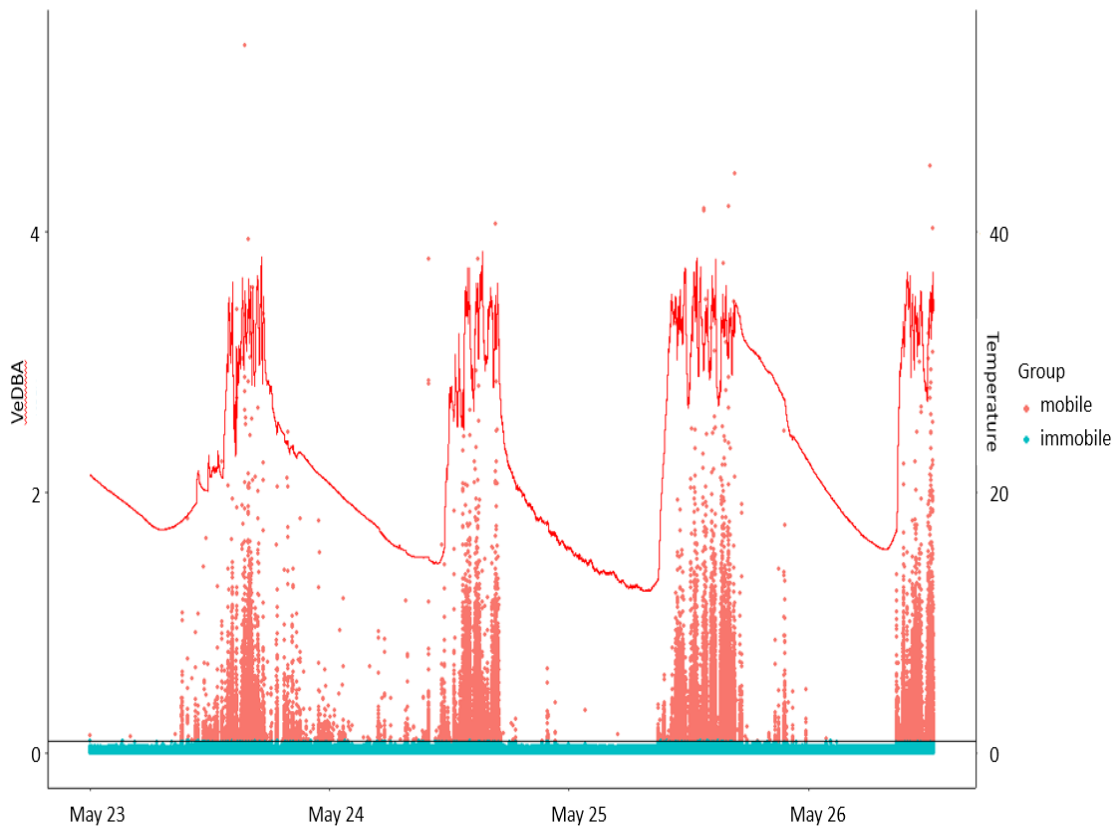


Figure 4. Gráfico de puntos de la aceleración corporal dinámica vectorial (VeDBA) de un lagarto durante los cuatro días que pasó en el recinto del mesocosmo, junto con un gráfico de líneas de la temperatura en el entorno del animal, según lo registrado por el sensor en su espalda. La línea negra horizontal indica el umbral por encima del cual los valores de VeDBA indican que el animal se movía (distinción móvil frente a inmóvil).

Como parte de los modelos mecanicistas, los modelos microclimáticos fueron calibrados mostrando un buen ajuste (Fig. 5-6)

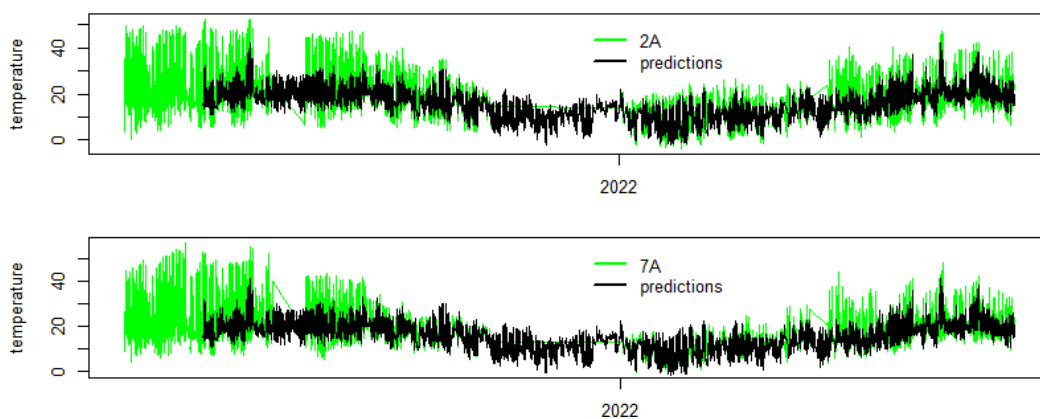


Figura 5. Ajuste y calibración de modelos microclimáticos para vegetación herbácea.

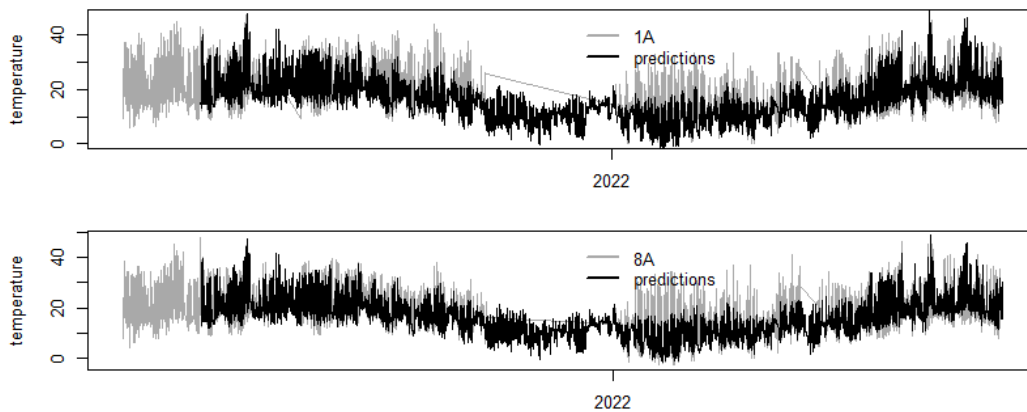


Figura 6. Ajuste y calibración de modelos microclimáticos para microhábitat rocoso.

Los modelos mecanicistas para *Timon lepidus* mostraron que la temperatura corporal alcanza los valores más altos entre los meses de mayo y agosto, del mismo modo la búsqueda de mayor proporción de sombra aumenta en dichos meses (Fig. 7). Por otro lado, la actividad asociada con forrajeo (color amarillo en la Figura 8) puede extenderse desde las 5-6 de la mañana hasta las 7 de la tarde durante los meses de verano, mientras que en los días de primavera y otoño se restringen principalmente entre las 9-10 de la mañana hasta 4-5 de la tarde (Fig. 8)

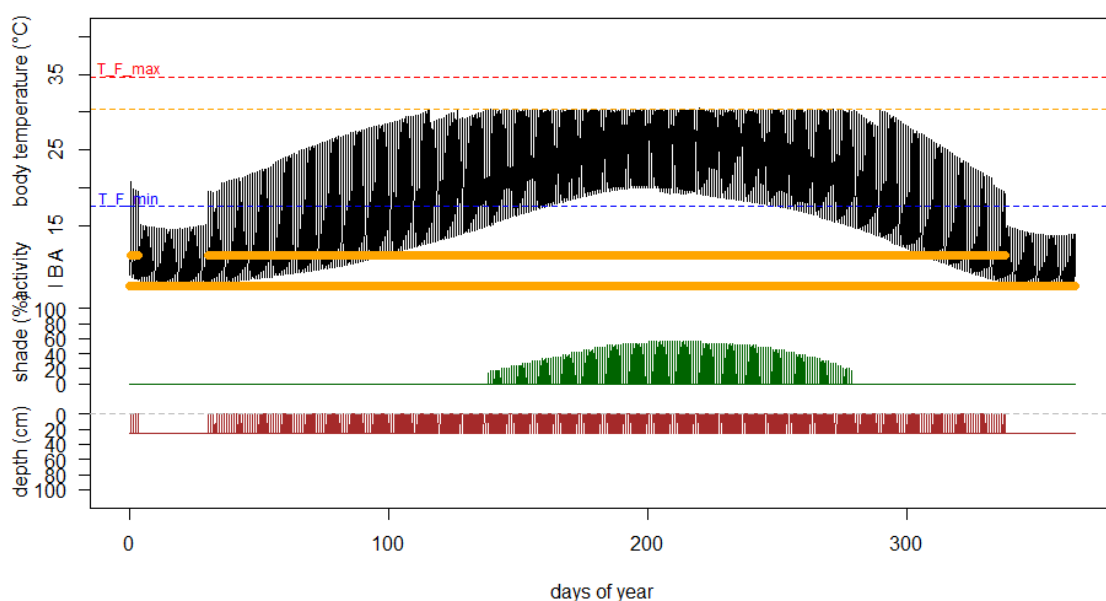


Figura 7. Temperatura corporal, profundidad, sombra y actividad del lagarto verde *Timon lepidus* con opciones de sombra que van del 0% al 90% en la localidad de Castro Sao Paio

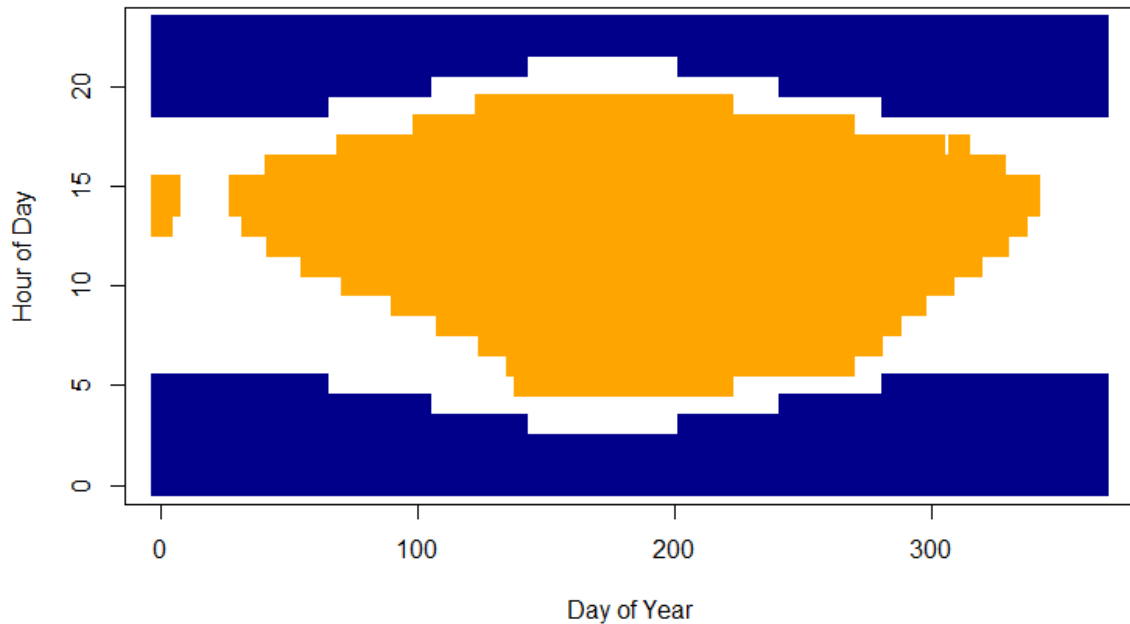


Figura 8. Ventana de actividad anual para el lagarto verde *Timon lepidus* con opciones de sombra que van del 0% al 90%

Los modelos mecanicistas para *Lacerta schreiberi* mostraron que la temperatura corporal alcanza los valores más altos durante los meses de verano, del mismo modo la búsqueda de mayor proporción de sombra aumenta en dichos meses (Fig. 9). Por otro lado, la actividad asociada con forrajeo (color amarillo en la Figura 9) puede extenderse desde las 5-6 de la mañana hasta las 7 de la tarde durante los meses de verano, mientras que en los días de primavera y otoño se restringen principalmente entre las 9-10 de la mañana hasta 4-5 de la tarde (Fig. 10)

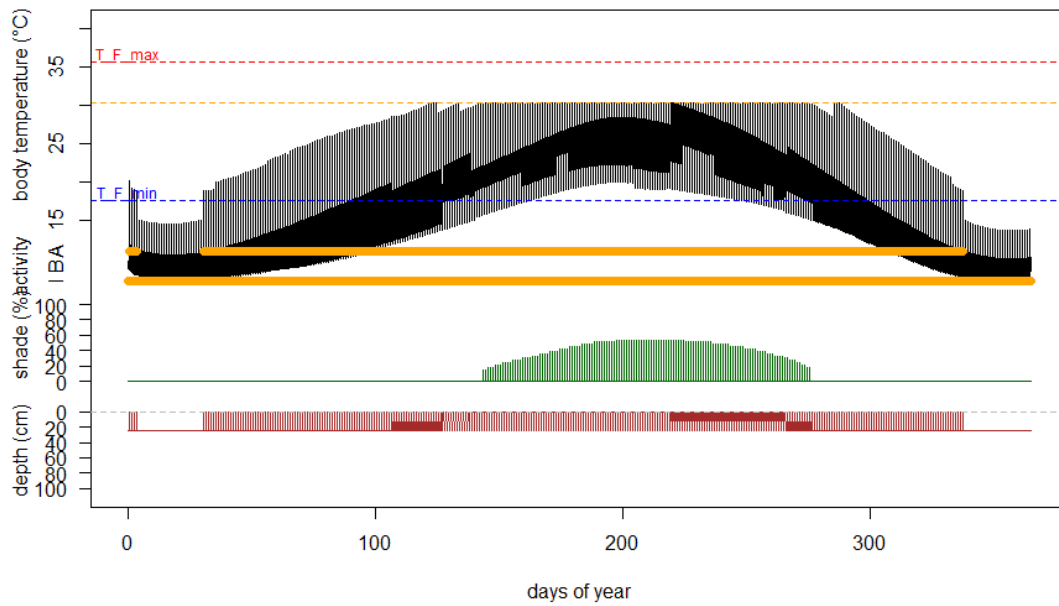


Figura 9. Temperatura corporal, profundidad, sombra y actividad del lagarto verde *Lacerta schreiberi* con opciones de sombra que van del 0% al 90% en la localidad de Castro Sao Paio

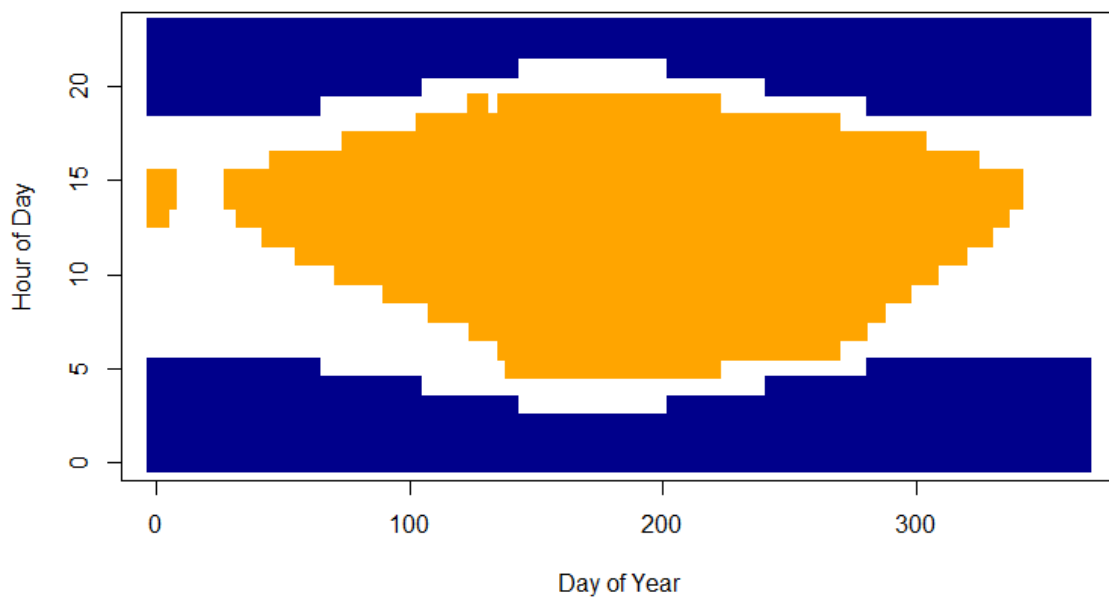


Figura 10. Ventana de actividad anual para el lagarto verde *Lacerta schreiberi* con opciones de sombra que van del 0% al 90%

2.4. Conclusiones y valoración de la ejecución

- La velocidad de corrida no mostró diferencias entre especies, por lo que el efecto del tamaño corporal, al parecer no estaría relacionado con las respuestas a las velocidades de ambas especies. Esto es interesante ya que podrían ser otros rasgos los que se relacionan con la velocidad y no el tamaño corporal, por ejemplo, tamaños relativos de extremidades. Mismos rasgos que pueden responder de forma diferente al ambiente circundante en comparación al tamaño corporal.
- Las temperaturas preferidas para ambas especies mostraron ser similares, sin embargo, es importante recalcar que los individuos se encontraban sin alimento. El agua estaba disponible ad libitum durante el experimento, pero la alimentación fue restringida. Esta podría ser la razón por la que los valores registrados de temperatura preferida son diferentes a otros previamente publicados. Del mismo modo el tamaño corporal no se relacionó con las temperaturas preferidas en los organismos.
- La pérdida de agua por otro lado es un rasgo que se relaciona significativamente con el peso dentro de las especies, pero que también es significativamente mayor en *Lacerta schreiberi*. Esta información es muy relevante en términos de respuesta fisiológicas a cambio climático, ya que esta especie tendría mayor vulnerabilidad a la pérdida de agua en comparación del lagarto verde ocelado.
- La ejecución de los mesocosmos como proyecto experimental permitió generar un primer protocolo para lagartos verdes y seguimiento a escala fina para poder calibrar modelos mecanicistas. El uso de tags de seguimiento con información de aceleración, temperaturas y otras variables bioclimáticas resultó ser una herramienta útil para la generación de dichos modelos. Sin embargo, es necesario utilizar datos de entrenamiento para mejorar la aplicabilidad de los tags.
- Los modelos mecanicistas para ambas especies mostraron resultados similares, sin embargo, los modelos realizados son preliminares y es necesario afinar los parámetros para cada uno ya que algunos datos se continúan analizando. No obstante, como conclusión general se pudo estimar que los meses de verano son los que agregan mayor actividad de forrajeo para ambas especies. Y por lo otro lado, los meses de primavera y

otoño tienden a ser más relacionados con la actividad de tomar el sol “basking”. Todas estas respuestas de actividad pueden verse influidas por los cambios globales en los cambios de temperatura, por lo que el siguiente paso será modelar estas respuestas en escenarios de cambio climático.

- Los efectos del tamaño corporal parecen ser rasgo-específicos, por lo que, algunas respuestas fisiológicas pueden verse afectadas por el tamaño o peso corporal, mientras que otras no. Esta información brinda un marco de referencia para explorar rasgos individuales y entender mejor como la morfología se integra con la ecofisiología y sus potenciales efectos en poblaciones de ectotermos.

2.5. Publicaciones resultantes

Por el momento continuamos analizando los datos y generando modelos mecanicistas para otros microhábitats. Tenemos previsto someter al menos dos manuscritos relacionados con los resultados para finales de mayo y junio 2023. Incluiremos los respectivos agradecimientos a la AEET como se señalan en los lineamientos de adjudicación de la ayuda económica.

2.6. Referencias

Angilletta Jr, M. J., & Angilletta, M. J. (2009). Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis.

Angilletta Jr, M. J., Steury, T. D., & Sears, M. W. (2004). Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integrative and comparative biology*, 44(6), 498-509.

Barnard, P., & Thuiller, W. (2008). Introduction. *Global change and biodiversity: future challenges*. *Biology Letters*, 4(5), 553-555.

Brown, D.D., Kays, R., Wikelski, M., Wilson, R. & Klimley, A.P. (2013). Observing the unwatchable through acceleration logging of animal behavior. *Animal Biotelemetry* 1:20.

Bellard, C., Leclerc, C., Leroy, B., Bakkenes, M., Veloz, S., Thuiller, W., & Courchamp, F. (2014). Vulnerability of biodiversity hotspots to global change. *Global Ecology and Biogeography*, 23(12), 1376-1386.

Ferreira, C. C., Santos, X., & Carretero, M. A. (2016). Does ecophysiology mediate reptile responses to fire regimes? Evidence from Iberian lizards. *PeerJ*, 4, e2107.

Hansen, A. J., Neilson, R. P., Dale, V. H., Flather, C. H., Iverson, L. R., Currie, D. J., ... & Bartlein, P. J. (2001). Global change in forests: responses of species, communities, and

biomes: interactions between climate change and land use are projected to cause large shifts in biodiversity. *BioScience*, 51(9), 765-779.

Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T. M., Butchart, S. H., ... & Veloso, A. (2010). The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *science*, 330(6010), 1503-1509.

Hortal, J., de Bello, F., Diniz-Filho, J. A. F., Lewinsohn, T. M., Lobo, J. M., & Ladle, R. J. (2015). Seven shortfalls that beset large-scale knowledge of biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 46, 523-549.

Kaufman, L. & Rousseeuw, P.J. (2009). *Finding groups in data: an introduction to cluster analysis*, vol. 344. John Wiley & Sons.

Kearney, M. R., & Porter, W. P. (2017). NicheMapR—an R package for biophysical modelling: the microclimate model. *Ecography*, 40(5), 664-674.

Kearney, M. R., Munns, S. L., Moore, D., Malishev, M., & Bull, C. M. (2018). Field tests of a general ectotherm niche model show how water can limit lizard activity and distribution. *Ecological Monographs*, 88(4), 672-693.

Kearney, M. R., & Porter, W. P. (2020). NicheMapR—an R package for biophysical modelling: the ectotherm and dynamic energy budget models. *Ecography*, 43(1), 85-96.

Kingsolver, J. G., Diamond, S. E., & Buckley, L. B. (2013). Heat stress and the fitness consequences of climate change for terrestrial ectotherms. *Functional Ecology*, 27(6), 1415-1423.

Patterson, A., Gilchrist, H.G., Chivers, L., Hatch, S. & Elliott, K. (2019). A comparison of techniques for classifying behavior from accelerometers for two species of seabird. *Ecology and Evolution* 9: 3030–3045.

Paaijmans, K. P., Heinig, R. L., Seliga, R. A., Blanford, J. I., Blanford, S., Murdock, C. C., & Thomas, M. B. (2013). Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global change biology*, 19(8), 2373-2380.

Pimm, S. L., Russell, G. J., Gittleman, J. L., & Brooks, T. M. (1995). The future of biodiversity. *Science*, 269(5222), 347-350.

Qasem, L., Cardew, A., Wilson, A., Griffiths, I., Halsey, L.G., Shepard, E.L.C., Gleiss, A.C. & Wilson, R. (2012). Tri-Axial Dynamic Acceleration as a Proxy for Animal Energy Expenditure; Should We Be Summing Values or Calculating the Vector? *PLoS ONE* 7(2): e31187.

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Shepard, E.L.C., Wilson, R.P., Halsey, L.G., Quintana, F., Laich, A.G., Gleiss, A.C., Liebsch, N., Myers, A.E., & Norman, B. (2008). Derivation of body motion via appropriate smoothing of acceleration data. *Aquatic Biology* 4: 235–241.

Sears, M. W., Angilletta Jr, M. J., Schuler, M. S., Borchert, J., Dilliplane, K. F., Stegman, M., ... & Mitchell, W. A. (2016). Configuration of the thermal landscape determines thermoregulatory performance of ectotherms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(38), 10595-10600.

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(1713), 1823-1830.

Veríssimo, C. V., & Carretero, M. A. (2009). Preferred temperatures of *Podarcis vaucheri* from Morocco: intraspecific variation and interspecific comparisons. *Amphibia-Reptilia*, 30(1), 17-23.

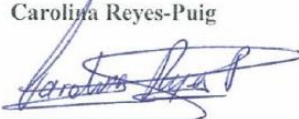
Vitt, L. J., & Caldwell, J. P. (2013). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic press.

- Informe de gastos del proyecto.** Relación de partidas de gastos y sus importes. Se deberán aportar justificantes originales de los pagos realizados (tickets, recibos o facturas). Los principales gastos asociados a la ayuda económica estuvieron relacionados con la compra de materiales para creación y adecuación de los mesocosmos. Así como también para los materiales para los experimentos de laboratorio. Se adjunta todas las facturas y fotos relacionadas en una carpeta comprimida .zip.

Tabla 2. Detalle de gastos

Proveedor	Item	Costo
BricoMarché	Material mesocosmos	116.25
Shan Xiaolue	Material mesocosmos y experimentos de laboratorio	42.9
Leroy Merlin	Performance and lab experiments	386.7
Cooperativa Agrícola de Vila do Conde	Plástico para mesocosmos	120.96
Uber	Transporte	7.8
		4.31
		4.33
		4.27
BricoDepot	Material, varas de metal para construcción mesocosmos	311.85
Worten	Caterpillar S62 Pro (con termocámara incluida, sticks)	572.89
Amazon	Materiales (fluxometro, higrometro)	107
Chen Xudong	Materiales laboratorio, mesocosmos	60
Chen Xudong	Materiales laboratorio, mesocosmos	26.26
Worten	Tarjetas microSD	42.98
Chen Xudong	Materiales laboratorio, mesocosmos	45
Brico Depot	Herramientas mesocosmos	72.65
Merlin Leroy	Materiales mesocosmos	45.96
Decathlon	Cana de pesca para captura de lagartos	28.8
Total		2000.91

Fdo:

Carolina Reyes-Puig


Fdo.: **CAROLINA REYES-PUIG**

Carolina Reyes-Puig

en Porto, a 8 de febrero de 2023