Stefanny Christie Gomes Monteiro

Relações entre taxa de vocalização, níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824).

São Paulo
2013

Stefanny Christie Gomes Monteiro

Relações entre taxa de vocalização, níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824).

Relationships between calling rate, corticosterone plasma levels and immunocompetence of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824).

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador: Fernando Ribeiro Gomes

São Paulo
2013

Monteiro, Stefanny Christie Gomes

Relações entre taxa de vocalização, níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em Hypsiboas albopunctatus (Spix, 1824).

Número de páginas:60

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia

1. Taxa de vocalização 2. Corticosterona
3 Imunocompetência
I Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Dedicatória

Dedico este trabalho:

*A **Deus**, que me deu vida e me guia pelo caminho certo. A Ele que me sustenta e encoraja, mesmo quando as coisas são contrárias. A este maravilhoso Deus que me ama incondicionalmente e me proporcionou mais esta realização.*

*Ao Meu **Pai Luiz** e minha **Mãe Lúcia** e meus **Irmãos Rafael e Renata**. Em especial aos meus **Pais** pela educação que me deram, assim como pelo apoio e incentivo para lutar com determinação em busca dos meus sonhos.*

*Ao Meu **noivo Braz Junior** que tem construído comigo uma vida a dois, com muito amor e carinho, repleta de sonhos, obstáculos e realizações. E que, além disto, tem sido meu companheiro de coletas e experimentos, e, algumas vezes, financiador do meu trabalho.*

*A Minha **sogra Cida** e meu **sogro Braz**, que me receberam com muito amor e carinho e estiveram ao meu lado como uma segunda família, me apoiando e incentivando.*

Epígrafe

"a tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê"

(Arthur Schopenhauer).

Agradecimentos

Ao Professor Dr. ***Fernando Ribeiro Gomes*** *que me orientou me ajudando e apoiando, acreditando no meu trabalho desde o início. Sem o qual nada disto poderia ter sido feito. Além de mestre um amigo, que tem me aconselhado em questões acadêmicas e pessoais que levarei por toda a vida.*

Aos ***companheiros do laboratório de Comportamento e Fisiologia evolutiva*** *– Eduardo (técnico), Eduardo, Maya, Letícia, Mariana, Clara, Carla e especialmente a* ***Vânia*** *e* ***Adriana*** *que se tornaram grandes amigas além de, juntamente com o* ***Braz Junior,*** *me auxiliarem na coleta de dados em todos os momentos, sendo imprescindíveis para a realização deste trabalho.*

*Ao S****andro*** *por nos permitir coletar em sua propriedade (Pesqueiro do Sandro), a* ***Alexandre*** *pela ajuda nas coletas, e aos professores* ***Dr. Beny Spira, Dra. Cristina Massoco*** *e* ***Dra. Eliana Reiko Matushima*** *pela atenção e ajuda com algumas metodologias.*

A todos do Departamento de Fisiologia Geral, em especial ***Roseli, Gisele*** *e* ***Susi,*** *vocês são parte desta caminhada e da realização deste trabalho.*

Aos ***amigos*** *de longe, aqueles que de alguma maneira sempre estiveram comigo, em especial* ***Kaline, Aline, Carla, Nice, Daniela*** *e tantos que eu gostaria de citar... Agradeço a vocês, por fazerem parte desta conquista.*

Com carinho...

Stefanny Christie Gomes Monteiro

O presente trabalho contou com o apoio das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior – CAPES:

Bolsa de estudo (Aluna).

Suporte financeiro para coletas e compra de materiais.

Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP:

Projeto Jovem Pesquisador (2006/54699-1).

Programa de Pós-graduação em Fisiologia Geral – Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências – USP – São Paulo.

Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências – USP – São Paulo.

Sumário:

Lista de figuras ..... J

Lista de tabelas ..... K

Apresentação L

I. Resumo e Abstract 01

II. Contextualização 04

Seleção sexual 05

Relações entre comportamento sexual, fisiologia da reprodução, andrógenos e glicocorticóides 07

Glicocorticóides possuem papel imunomodulador em vertebrados 08

III. Referências gerais 11

IV. Artigo 16

Introdução 17

Metodologia 19

Resultados 26

Discussão 29

Referências 34

V. Conclusões gerais 42

VII. Anexos 43

Anexo 1 44

Lista de figuras:

Figura 1: Foto de *Hypsiboas albunctatus.* Imagem capturada por Stefanny Monteiro no dia 06 de março de 2012, em São Luis do Paraitinga (local de coleta dos espécimes)

Figura 2: Tipos celulares sanguíneos de *Hypsiboas albopunctatus*. Os leucócitos estão evidenciados individualmente, com seta, em cada caixa: Neutrófilo (A), Linfócito (B), Eosinófilo (C), Monócito (D) e Basófilo (E). As células ao redor dos leucócitos são hemáceas nucleadas. A escala representada é a mesma para todas as imagens.

Figura 3: Inchaço das patas controle (10 µL de solução salina) e experimental (10 µL de uma solução de PHA (20mg de PHA / mL de solução salina) de 32 indivíduos machos da espécie *Hypsiboas albopunctatus* durante vinte e quatro horas. Os pontos e barras representam a média e o desvio-padrão, respectivamente. ***** representa diferença estatística ($P < 0,05$) entre o grupo controle e o experimental.

Figura 4: Correlação entre o inchaço da pata experimental após 12 horas da injeção de PHA (10 µL de uma solução de PHA (20mg de PHA / mL de solução salina) de 22 indivíduos machos da espécie *Hypsiboas albopunctatus* durante vinte e quatro horas e o escore do componente 3 da PCA (relação positiva ente vocalização por minuto e os níveis plasmáticos de corticosterona e negativa destes dois com a hora de observação).

Lista de tabelas:

Tabela 1: Estatística descritiva com o número de indivíduos e os valores mínimo, máximo, média e desvio-padrão para os parâmetros abióticos, comportamentais, fisiológicos e morfológicos de *Hypsiboas albopunctatus*.

Tabela 2: Componentes retidos da análise de componentes principais (PCA) incluindo variáveis abióticas, comportamentais, fisiológicas e morfológicas de *Hypsiboas. albopunctatus*.

Apresentação

Esta dissertação está composta por um resumo inicial, seguido de uma contextualização teórica do estudo realizado e referências da mesma. Em seguida, encontra-se um artigo científico contendo todos os resultados da dissertação, composto por introdução, material e método, resultados, discussão e referências. O resumo do artigo não foi apresentado por ser equivalente ao já apresentado no início da dissertação. Para encerrar a parte textual, estão descritas as conclusões gerais.

I – Resumo e Abstract

Resumo

De acordo com o modelo de seleção intersexual mediado por parasitas, variações nas condições de ornamentos ou taxa de displays sexuais refletem diferentes graus de resistência ao parasitismo. Em coros naturais de anfíbios, vocalizações mais altas, longas e complexas e/ou emitidas a maiores taxas são, provavelmente, mais facilmente detectadas e atraem mais fêmeas. Entretanto, o esforço vocal está positivamente relacionado aos níveis plasmáticos de esteróides potencialmente imunossupressores, tais como testosterona e corticosterona. O objetivo deste trabalho foi avaliar as relações entre taxa de vocalização, imunocompetência e níveis plasmáticos de corticosterona em *Hypsiboas albopunctatus*, um anuro de médio porte que ocorre na América do Sul. Tais relações foram estudadas a partir de observação focal do comportamento vocal em coro natural, seguido de coleta de sangue para dosagem de corticosterona e avaliação de alguns parâmetros imunitários. O presente estudo demonstrou uma relação positiva entre a taxa de vocalização com níveis plasmáticos de corticosterona e negativa entre estes dois parâmetros com a imunocompetência mediada por células. Estes resultados apontam para a corticosterona como possível hormônio mediador do compromisso entre esforço vocal e imunidade mediada por células em anuros.

Palavras chave: anfíbio, vocalização, corticosterona, imunocompetência, seleção sexual.

Abstract

According to the model of intersexual selection mediated by parasites, changes in conditions of sexual ornaments or display rates reflect different degrees of resistance to parasitism. In natural choruses of amphibians, calls that are higher, longer, more complex and / or issued at higher rates are probably more easily detected and attract more females. However, the vocal effort is positively related to plasma levels of potentially immunosuppressive steroids, such as testosterone and corticosterone. The aim of this study was to evaluate the relationship between calling rates, immunocompetence and plasma levels of corticosterone in *Hypsiboas albopunctatus*, a midsize anuran occurring in South America. Such relationships were studied from focal observations of calling behavior, followed by blood collection for measurements of corticosterone plasma levels and evaluation of some immune parameters. The present study showed a positive relationship between the calling rate with plasma levels of corticosterone, and a negative correlation between these two parameters with cell-mediated immunocompetence. These results highlight the importance of the hormone corticosterone as a possible mediator of trade-off between vocal effort and cell-mediated immunity in anurans.

Keywords: amphibian, vocalization, corticosterone, immunocompetence, sexual selection.

II - Contextualização

Seleção sexual

De acordo com Darwin (1871), a seleção sexual representa uma forma de seleção natural decorrente das diferenças em habilidade de competir com outros do mesmo sexo pela obtenção de acasalamentos ou de atrair parceiros do sexo oposto. A competição pela obtenção de acasalamentos geralmente ocorre entre os machos (seleção intra-sexual), enquanto a escolha dos parceiros do sexo oposto é exercida pelas fêmeas (seleção intersexual), fato que deve estar associado à assimetria entre os sexos em investimento parental: fêmeas são caracterizadas pela produção de um número limitado de gametas com alto custo energético e, em muitos casos, maior comprometimento com o cuidado parental em relação aos machos, que produzem muitos gametas com baixo custo energético (Trivers, 1972; Anderson, 1994; Danchin & Cézilly, 2008). Esta diferença em investimento reprodutivo entre sexos implica também na existência de uma proporção muito maior de machos sexualmente receptivos em relação às fêmeas em um determinado período (Alcock, 2009).

A evolução dos caracteres sexuais secundários por escolha das fêmeas representa um dos paradoxos evolutivos mais fascinantes, especialmente quando os machos não provêm benefícios diretos às fêmeas e sua descendência (Anderson 1994). Uma das propostas para solucionar este paradoxo envolve a seleção intersexual baseada na expressão dos caracteres sexuais secundários dependentes da condição dos machos, funcionando como uma sinalização honesta das qualidades genéticas destes (Fisher, 1915; Zahavi, 1975). Segundo Zahavi (1975), as fêmeas tendem a escolher machos com ornamentos e displays sexuais exuberantes por estes serem indicativos de bons genes, que ao serem herdados pela sua descendência aumentam o valor adaptativo das fêmeas (Zahavi, 1975). Este raciocínio é baseado no princípio da desvantagem, o qual diz que as fêmeas preferem os machos com ornamentos hereditários mais elaborados por estes apresentarem um alto custo de desenvolvimento e manutenção.

Desta forma, o grau de elaboração destes ornamentos revelaria, sem trapaças, a qualidade genética dos machos (Zahavi, 1975; Alcock, 2009).

Entretanto, um impasse teórico para este modelo evolutivo conhecido como a hipótese dos “bons genes”, é que a seleção direcional persistente deveria resultar em perda da variância genética aditiva para o valor adaptativo (*fitness*) (Roff 1997). Em 1982, Hamilton & Zuk propuseram que mudanças contínuas na composição genética das populações de parasitas poderiam manter a variância genética aditiva da resistência à infecção parasitária e, consequentemente, do valor adaptativo das populações de seus hospedeiros. Desta forma, a hipótese de Hamilton & Zuk (1982) pressupõe a seleção de machos com caracteres sexuais secundários muito desenvolvidos, refletindo um alto nível de resistência ao parasitismo. Uma das condições necessárias para que o modelo de seleção sexual mediada por parasitas seja corroborado é a de que a condição ornamental ou taxa de sinalização sexual (*display*) diminuam com o aumento da intensidade parasitária, condição esta que tem sido parcialmente corroborada por estudos realizados com diferentes grupos filogenéticos (Anderson 1994).

Considerando que um determinado animal seja mais resistente aos parasitas e o sistema imune destes é responsável pelo combate e destruição destes parasitas, é plausível extrapolar que os indivíduos mais resistentes apresentem uma melhor imunocompetência. A existência de um compromisso entre a expressão de caracteres sexuais secundários e a imunocompetência, modulada pela testosterona, foi inicialmente sugerida por Folstad e Carter (1992). Eles propuseram que a testosterona, hormônio androgênico primário, tem um efeito dualístico sobre componentes do valor adaptativo, uma vez que estimula o desenvolvimento de caracteres sexuais, que são selecionados pelas fêmeas, mas reduz a imunocompetência. Desta forma, esta relação cria um compromisso que influencia a intensidade parasitária (Folstad e Carter, 1992).

Relações entre comportamento sexual, fisiologia da reprodução, andrógenos e glicocorticóides

Em diferentes grupos de vertebrados de reprodução sazonal, ocorre não somente um aumento dos níveis plasmáticos de andrógenos, mas também de glicocorticoides (Moore e Jessop, 2003). Os andrógenos estão particularmente associados à formação e manutenção de caracteres sexuais secundários e dos displays sexuais, além da produção dos gametas (Randall *et. al*., 2002), enquanto que os glicocorticóides tem um importante papel na mobilização de recursos energéticos para sustentar processos fisiológicos e comportamentais associados à reprodução (Sapolsky, 1993; Moore e Jassop, 2003). Em vertebrados, os glicocorticóides apresentam um papel fundamental na mobilização de aminoácidos e lipídeos, assim como no estímulo da neoglicogênese e oxidação de lipídeos em situações de aumento da demanda energética, incluindo exercício aeróbio prolongado (Tharp, 1975; Pough *et al.*, 1992; Weber, 1992; Landys *et. al*., 2006; Malisch *et al.*, 2007; Hau *et. al*., 2010). Em anfíbios, variações sazonais nos níveis plasmáticos de glicocorticóides estão associados à duração da temporada reprodutiva, defesa de território, agressividade e manutenção do esforço vocal (Mendonça *et. al*., 1985; Carr, 2011; Assis *et. al*., 2012). A vocalização em anuros é uma atividade de alto custo energético, podendo aumentar a taxa metabólica mais de 20 vezes em relação aos valores basais (Pough *et al.*, 1992; Emerson, 2001; Wells, 2001). Diversas espécies de anuros apresentam uma correlação positiva entre o esforço vocal ou a taxa de vocalização com níveis plasmáticos de corticosterona (CORT, entendido como níveis plasmáticos de corticosterona) (Emerson e Hess, 2001; Leary *et. al*., 2006; Assis *et. al*., 2012). A preparação para a atividade vocal e sua manutenção ao longo da temporada reprodutiva são também dependentes de andrógenos na corrente sanguínea (Tsai, 2011).

Além de estarem diretamente associados à reprodução, níveis elevados de testosterona também estão associados à regulação da resposta imunitária através de diversos mecanismos,

como o aumento da resposta celular através do influxo de cálcio, promovendo liberação e/ou inibição da liberação de citocinas e redução de órgãos linfoides (Nava-Castro *et. al*., 2012). De acordo com a hipótese da desvantagem da imunocompetência, a testosterona – principal andrógeno em muitos vertebrados, normalmente está associada a uma redução da eficiência da resposta imune (Folstad e Carter, 1992). De forma associada, os glicocorticóides, além de atuar como importantes reguladores do metabolismo, exercem um papel fundamental na modulação e direcionamento da resposta imunitária e inflamatória (Lehninger *et. al*., 2002; Sapolsky, 1993).

Glicocorticóides possuem papel imunomodulador em vertebrados

Assim como os demais vertebrados, os anfíbios possuem um sistema imunológico constituído pelas respostas inata e adquirida, ambas compostas de elementos humorais (proteínas de adesão, citocinas, fatores de crescimento, componentes do sistema complemento, anticorpos naturais e específicos) e celulares (macrófagos, granulócitos, linfócitos) (Robert e Ohta, 2009). Embora uma resposta imunológica seja desencadeada diante de uma infecção, é importante ressaltar que a eficácia desta resposta depende da síntese e proliferação dos componentes humorais e celulares das respostas inata e adquirida, o que pode ser influenciado direta e indiretamente por moduladores endógenos (Sapolsky, 1993; Matson *et al*, 2006).

Dado que os níveis plasmáticos de andrógenos e glicocorticóides estão elevados durante a época reprodutiva, estes esteroides devem atuar como importantes moduladores da resposta imunológica humoral e celular durante esta fase. Os glicocorticóides possuem um papel bidirecional na resposta imunológica. Inicialmente, níveis de glicocorticoides elevados promovem a liberação de moléculas constituintes da resposta humoral que podem, por sua vez, ativar os mediadores celulares da resposta imune e direcionar os neutrófilos e linfócitos

circulantes para tecidos específicos (Wiegers & Reul, 1998; Riccardi, *et al*, 2002; Cavalcanti *et. al*., 2006). Além disto, a redistribuição de neutrófilos e linfócitos entre a circulação e os tecidos causada pelo aumento dos níveis plasmáticos de glicorticóides acarreta em aumento da relação neutrófilo/linfócito (N/L) no sangue (Bishop *et. al*., 1968; Dabhar, 2002; Cavalcanti *et. al*., 2006; Davis *et. al*., 2008). Entretanto, é importante ressaltar que, em níveis cronicamente elevados, os glicorticóides podem bloquear e inibir a maturação e desenvolvimento dos linfócitos, além de atuarem na diminuição da massa e função dos órgãos linfoides (Ahmed *et. al*., 1985; Wiegers & Reul, 1998; Riccardi, *et al*, 2002; Cavalcanti *et. al*., 2006).

No início do evento reprodutivo dos anfíbios ocorre um aumento da concentração de glicocorticóides no plasma, e estes níveis se mantém elevados por boa parte da temporada reprodutiva (Mendonça *et al*, 1985; Emerson, 2001). Embora os níveis de andrógenos estejam altos durante a época reprodutiva, uma correlação positiva fina em nível interindividual ocorre principalmente entre taxa de vocalização e CORT (Emerson & Heiss, 2001; Assis *et al*, 2012), o que aponta para este hormônio como potencial mediador do compromisso entre esforço vocal e imunocompetência em anuros. Segundo o modelo da energética-vocalização-hormônios proposto por Emerson (2001), existe uma relação positiva entre esforço vocal e níveis plasmáticos de glicocorticóides e andrógenos em anuros. Precedendo a atividade vocal os níveis plasmáticos de testosterona se elevam, promovendo o início da vocalização. Os níveis plasmáticos de glicocorticóides também se elevam de acordo com o aumento da demanda metabólica associada ao exercício vocal. Com o passar das horas e/ou dos dias no coro, os níveis de glicocorticóides se elevam de tal modo que promovem a inibição da função do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, de forma que o animal cessa o comportamento vocal e inicia o forrageamento, indicando assim que a interação entre glicocorticóides e andrógenos regularia o ciclo reprodutivo em anfíbios anuros (Emerson, 2001). Com a alta concentração

destes hormônios no sangue por um determinado período, é possível que a resposta imunológica apresente uma tendência a diminuir atingindo níveis abaixo dos limites basais, caracterizando um efeito imunossupressor (Sapolsky *et al*, 2000). Embora uma correlação direta entre taxa de vocalização e CORT esteja documentada para algumas espécies de anuros, incluindo para anuros brasileiros (Assis *et al*., 2012), as relações a médio e longo prazo entre estes, bem como suas implicações imunológicas permanecem inexploradas. De acordo com o que foi discutido, resolvemos estudar as relações entre CORT, comportamento vocal e diferentes aspectos da imunocompetência em machos de uma espécie de Hilídeo brasileiro.

III – Referências gerais

Ahmed, S.A., Dauphinée, M.J. & Talal, N. 1985. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoinmune mice. **J. Immunol.** 134, 204-210.

Alcock, J. (2009). The Evolution of reproductive behavior. *In*: Alcock, J. **Animal Behavior: An Evolutional Approach**. Nineth Edition, Sinauer Associates, INC. Pp. 329-376.

Anderson, M. (1994). **Sexual selection.** Monographs in Behavior and Ecology. Princeton University Press.

Assis, V. R.; Navas, C. A.; Mendonça, M. T.; Gomes, F. R. (2012). Vocal and territorial behavior in the Smith frog (*Hypsiboas faber*): Relationships with plasma levels of corticosterone and testosterone. **Comp. Biochem. and Physiol** A 265-271.

Bishop, C.R., Athens, J.W., Boggs, D.R., Warner, H.R., Cartwrig, Ge & Wintrobe, M.M. 1968. Leukokinetic Studies 13. A non-steady-state kinetic evaluation of mechanism of cortisone-induced granulocytosis. **J. Clin. Investig.** 47, 249-260.

Carr, J.A., 2011. Stress and reproduction in amphibians. *In*: Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds.), **Hormones and reproduction of vertebrates. Amphibians, Volume 2**. Academic Press, Burlington and San Diego, pp. 99–116.

Cavalcanti, D. M. H., Lotufo, C. M. C., Borelli, P., Tavassi, A. M. C., Pereira, A. L. M., Markus, R. P., Farsky, S. H. P. (2006). Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. **Molecular and Cellular Endocrinology** 249: 32-39.

Danchin, E. and Cézilly, F. (2008). Sexual selection: Another Evolutionary Process. *In*: Danchin, E.; Giraudeau, L. A.; Cézilly, F. **Behavioral Ecology**. Oxford Press. Pp. 363-428.

Davis, A. K., Maney, D. L.; Maerz, J. C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Funct. Ecol.** *22*, 760-772.

Dhabhar, F.S. 2002. A hassle a day may keep the doctor away: stress and the augmentation of immune function. **Integr. Comp. Biol.** 42, 556-564.

Emerson, S. B. (2001). Male advertisement calls behavioral variation and physiological processes. Pp. 36-44. *In*: M.J. Ryan (ed.). **Anuran communication**. Smithsonian Institution Press, Washington and London.

Emerson, S. B. & Hess, D. (2001). Glucocorticoids, Androgens, Testis Mass, and the energetic of Vocalization in Breeding Male Frogs. **Hormones and Behavior** 39, 59-69.

Fisher (1915)

Folstad, I. and A.J. Karter. 1992. Parasites, bright males, and immunocompetence handicap. **The American Naturalist** 139:603-622.

Hamilton, W. D., Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? **Science** 218:384-387.

Hau, M., Ricklefs, R. E., Wikelski, M., Lee, K. A., Brawn, J. D. (2010). Corticosterone, testosterone and life-history strategies of birds. **Proceedings of the Royal Society** *B*, 277:3203-3212.

Leary, C.J., Garcia, A.M., Knapp, R., 2006. Elevated corticosterone levels elicit non-calling mating tactics in male toads independently of changes in circulating androgens. **Horm. Behav.** 49, 425–432.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. (2002). **Princípios de Bioquímica**. 3ª Edição, São Paulo, Editora Sarvier.

Malisch, J.L., Saltzman, W., Gomes, F.R., Rezende, E.L., Jeske, D.R. & Garland Jr., T. 2007. Baseline and stress-induced plasma corticosterone concentrations of mice selectively bred for high voluntary wheel running. **Physiol. Biochem. Zool.** 80,146-156.

Matson, K. D., Tieleman, B. I., Klasing, K. C. (2006). Capture Stress and the Bactericidal Competence of Blood and Plasma in Five Species of Tropical Birds. **Physiol. Biochem. Zool.** 79(3): 556-564.

Mendonça, M. T.; Licht, P.; Ryan, M. J.; Barnes, R. (1985). Changes in hormones levels in relation to breeding behavior in male bullfrogs (Rana catesbeiana) at the individual and population levels. **General and Comparative Endocrinology** 58:270-279.

Moore, I. T., AND T. S. Jessop. 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. **Hormones and Behavior** 43:39–47.

Nava-Castro, K.; Hernández-Bello, R.; Muñiz-Hernandez, S.; Camacho-Arroyo, I.; Morales-Montor, J. (2012). Sex steroids, immune system, and parasitic infections: facts and hypotheses. **Annals of The New York Academy of Sciences** 1262:16-26.

Pough, F.H., Magnusson, W.E., Ryan, M.J., Wells, K.D. & Taigen, T.L. 1992. Behavioral energetic. Pp. 395-436. *In:* Feder M.E. & Burggren W.W. (eds.). **Environmental Physiology of Amphibians**. University of Chicago Press, Chicago.

Randall, D.; Burggren, W. W.; Kathleen, F.; Eckert, R. (2002b). Hormones In: **Eckert Animal Physiology mechanisms and adaptation**. Fifth edition. Freeman and Company. Pp. 667-697.

Riccardi, C., Bruscoli, S., Migliorati, G. (2002). Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. **Pharmacological Research** 45(5): 361-368.

Robert, J.; Ohta, Y. (2009). Comparative and developmental study of the immune system in Xenopus. **Developmental Dynamics** 238: 1249-1270.

Roff, D.A. 1997. **Evolutionary Quantitative Genetics**. Chapman and Hall, London, U.K.

Sapolsky, Y. R. M. (1993). Neuroendocrinology of the stress response. ***In*** **Behavioral Endocrinology**, J. B. Becker, S. M. Breedlove, and D. Crews (eds.). MIT press, Cambridge, Massachusetts.

Sapolsky, R.M., Romero, L.M. & Muck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrinol. Rev.** 21, 55-89.

Tharp G.D. 1975. The role of glucocorticoids in exercise. **Med. Sci. Sports Exercise.** 7, 6-11.

Tsai, P. S. (2011). Neuroendocrine control of reproduction in amphibians. In: Norris, D. O. and Lopez, K. H. **Hormones and reproduction of vertebrates Volume 2: amphibians**. Fisrt Edition, Ed. Elsevier. Pp. 21-38.

Trivers, R.L. (1972). Parental investment and sexual selection. In: Campbell, B. **Sexual selection and the descent of man.** Heinemann, London. Pp. 136-179.

Weber, J.M., 1992. Pathways for oxidative fuel provision to working muscles: ecological consequences of maximal supply limitations. **Experientia** 48, 557–564.

Wells, K.D. (2001). The energetics of calling in frogs. Pp. 45-60. *In*: M.J. Ryan (ed.). **Anuran communication**. Smithsonian Institution Press, Washington and London.

Wiegers, G.J. & Reul, J.M.H.M. (1998). Induction of cytokine receptors by glococorticoids; functional and pathological significance. **Trends Pharmacol. Sci.** 19, 317-321.

Zahavi, A. (1975). Mate selection – a selection for a handcap. **Journal of Theoretical Biology** 53:205-214

IV – Artigo

Relações entre taxa de vocalização, níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824)

Monteiro, S. C. G[*], Assis, V. R., Titon Junior, B., Barsotti, A. M. G., Gomes, F. R.
Departamento de Fisiologia Geral, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
* Autor para correspondência: Tel.: +55 11 3091 7522; Endereço de e-mail: stefannychristie@gmail.com

Introdução

De acordo com o modelo de seleção intersexual mediado por parasitas, variações nas condições de ornamentos ou taxa de displays sexuais refletem diferentes graus de resistência ao parasitismo (Hamilton e Zuk, 1982). Este modelo pressupõe que indivíduos com melhores displays sexuais apresentem uma menor carga parasitária e, uma vez que o sistema imunológico é responsável por identificar e destruir patógenos, é plausível inferir que estes animais possuam também um sistema imunológico melhor desenvolvido (Abbas e & Lichtman, 2003; Alcock, 2009). Adicionalmente, Folstad e Carter (1992) propuseram que os níveis elevados de andrógenos no plasma dos machos durante o período reprodutivo estimulam o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, os quais são selecionados pelas fêmeas. Entretanto, andrógenos apresentam um efeito imunossupressor, podendo assim ser moduladores do compromisso entre expressão de caracteres sexuais secundários e imunocompetência (Folstad e Carter, 1992).

Sabe-se que não apenas os níveis plasmáticos de andrógenos estão elevados durante a época reprodutiva em machos de diferentes vertebrados, mas também os de glicocorticóides (Norris, 2007). Os glicocorticóides atuam como moduladores da resposta imunológica humoral e celular e, em níveis cronicamente elevados, podem bloquear e inibir a maturação e desenvolvimento dos linfócitos, inibir a produção de proteínas responsáveis pela adesão dos leucócitos no endotélio, e consequentemente, inibir o processo inflamatório, além de atuarem

na diminuição da massa e função dos órgãos linfoides (Ahmed *et. al*., 1985; Folstad & Carter, 1992; Wiegers & Reul, 1998; Riccardi, *et al*, 2002; Cavalcanti *et. al*., 2006).

Em anfíbios, o coaxo de anúncio é produzido unicamente pelos machos na maior parte das espécies de anuros durante a estação reprodutiva, com função de atrair as fêmeas e manter outros machos à distância (Wells, 2007). Em coros naturais, machos que emitem vocalizações mais intensas, longas, complexas e/ou emitidas a maiores taxas são, provavelmente, mais facilmente detectados, atraindo uma maior quantidade de fêmeas (Wells, 2007). Embora a manutenção da atividade vocal em anuros seja essencial para a reprodução, a vocalização é uma atividade de alto custo metabólico (Pough *et al.*, 1992; Emerson, 2001; Wells, 2001). Os glicocorticóides apresentam um papel fundamental na mobilização de aminoácidos e lipídeos, assim como no estímulo da neoglicogênese e oxidação de lipídeos em situações de aumento da demanda energética, incluindo exercício aeróbio prolongado, como, por exemplo, a vocalização de anuros (Tharp, 1975; Pough *et al.*, 1992; Weber, 1992; Malisch *et al.*, 2007). Embora Emerson e Hess (2001) tenham encontrado para Hilídeos uma relação interespecífica positiva do esforço vocal com os níveis plasmáticos de andrógenos e níveis plasmáticos de corticosterona (CORT, entendido como níveis plasmáticos de corticosterona), em nível intraespecífico, as taxas de vocalização guardam relação linear positiva com CORT (Leary *et al*, 2004; Leary *et al*, 2006, Assis *et al*, 2012). Desta forma, é possível que a variação em desempenho vocal de machos em um coro e suas possíveis implicações em imunocopetência sejam mediados por CORT.

Embora outros estudos tenham procurado por uma relação entre a intensidade parasitária e aspectos do investimento reprodutivo em anuros (Hausfater *et. al*., 1990; Moretti, 2011); uma relação negativa entre taxa de vocalização e intensidade parasitária foi encontrada em *Hypsiboas prasinus*, indicando um possível compromisso entre taxa de vocalização e imunocompetência (Madelaire *et al*, *in press*). Embora as inter-relações entre vocalização,

imunocompetência e CORT tenham clara importância comportamental e evolutiva para os anuros, estas permanecem inexploradas. O objetivo deste trabalho foi avaliar as relações entre a taxa de vocalização, a imunocompetência e CORT em uma espécie de anfíbio anuro: *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824). As hipóteses testadas foram: 1) Machos adultos apresentam variação interindividual em relação à taxa de vocalização, imunocompetência e níveis plasmáticos de CORT; 2) Altas taxas de vocalização estão positivamente correlacionadas com CORT e negativamente relacionadas à imunocompetência.

Metodologia

Sítio de estudo e espécie estudada

Hypsiboas albopunctatus (Figura 1) é uma espécie de Hilídeo de médio porte, pertencente ao grupo *Hypsiboas albopunctatus* (Frost, 2007), de hábito arborícola com ampla distribuição na América do Sul, especialmente em áreas com vegetação aberta nas regiões Central, Sudeste e Sul do Brasil, apresentando reprodução contínua com pico reprodutivo de outubro a março (Guimarães *et al*., 2011; Maffei *et al*., 2011).

Foram realizadas observações do comportamento vocal e coleta de indivíduos machos adultos nos meses de Fevereiro (N = 11) e Março (N= 27) de 2012, no município de São Luiz do Paraitinga (23°13'23" S, 45°18'38" WO) – São Paulo/Brasil. Os animais foram coletados sob a licença de captura e transporte do IBAMA (processo número 29896-1) e os procedimentos de coleta e utilização do material biológico foram realizados com a autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA – n° 135/2011) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Figura 1: Foto de *Hypsiboas albunctatus.* Imagem capturada por Stefanny Monteiro no dia 06 de março de 2012, em São Luis do Paraitinga (local de coleta dos espécimes).

Observações de comportamento

Foram observados 35 indivíduos da espécie *H. albopunctatus* de uma mesma população. Outros 3 indivíduos foram coletados para padronização de algumas metodologias. Cada animal observado foi localizado por inspeção visual com uma luz branca e observado durante 40 minutos com filtros de luz vermelha. O início dos registros comportamentais se iniciou após 10 minutos da localização e aproximação do indivíduo, para minimizar a interferência do observador sobre o comportamento apresentado pelo animal. Todas as observações foram exclusivamente noturnas, durante o horário de atividade vocal dos animais. Também foram registrados os horários de observação, os substratos utilizados pelo indivíduo, distância da água, número de machos no coro, bem como a distância entre o indivíduo focal e o macho mais próximo vocalmente ativo. Para cada indivíduo, a taxa de vocalização foi calculada a partir do número total de vocalizações dividido pelo período de observação.

Dado que a temperatura pode afetar diversos parâmetros do comportamento vocal em anuros (Navas & Bevier, 2001), nos dois meses de coleta foram utilizados carregadores de dados (HOBO) programados para registrar dados de temperatura do ar a intervalos de 5 minutos, os quais estavam localizados próximos dos animais observados. Para cada indivíduo observado, foi calculada a média das temperaturas registradas pelos carregadores de dados durante a observação, sendo estes dados posteriormente incorporados nas análises.

Amostras de sangue

Após o período de observação, os indivíduos foram capturados manualmente e uma amostra de sangue foi coletada em campo (cerca de 60 μL), através de punção cardíaca com seringas de 1 mL e agulhas 26Gx1/2'' previamente heparinizadas [41,2 μL de heparina (5000 U.I./mL) em 958,8 μL de água destilada]. Somente foram consideradas as amostras de sangue cuja coleta foi realizada dentro de 3 minutos após a captura do animal. Tal restrição deve-se ao fato de que após 3 minutos da captura, os níveis de corticosterona podem ser influenciados pelo estresse da captura e manipulação, não existindo a confiabilidade desta representar uma situação de nível plasmático basal (Romero & Reed, 2005).

Todas as amostras de sangue foram identificadas e mantidas em gelo até serem, na mesma noite, processadas. As amostras foram transferidas para um microtubo, a partir do qual foi separada uma alíquota para a montagem da lâmina de esfregaço sanguíneo. O restante do sangue foi centrifugado (4 minutos a 3000 rpm) para a separação do plasma. As amostras de plasma foram divididas em tubos criogênicos, sendo mantidas em nitrogênio líquido até que puderam ser transferidas para um freezer -80°C. Estas amostras foram utilizadas posteriormente para a realização de testes de capacidade bactericida plasmática (CBP) e dosagem de CORT.

Perfil leucocitário

Uma gota de sangue foi pipetada em uma lâmina para microscopia, sendo o esfregaço realizado com uma segunda lâmina. O esfregaço secou por 30 minutos, sendo em seguida fixado com álcool metílico durante 2 minutos. As lâminas foram montadas em duplicata para cada indivíduo. Posteriormente uma delas foi corada com solução de eosina azul de metileno – solução de Giemsa (10%) (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) por 15 minutos e observada através de microscopia óptica a um aumento de 1000X (Nikon E200, 104c) com auxílio de óleo de imersão próprio do fabricante. Cem leucócitos foram contados e identificados com base na morfologia celular de anfíbios segundo Terry (2006).

Foi calculada a relação entre neutrófilos e linfócitos (N/L) a partir da proporção destes tipos celulares em um total de 100 leucócitos contados. Dado que a relação N/L encontra-se positivamente relacionada à CORT e a porcentagem de eosinófilos encontram-se negativamente relacionada à CORT em situações de estresse, (Davis et al., 2008), e, além disto, a porcentagem de eosinófilos também encontra-se positivamente relacionada com a carga parasitária durante um combate de verminoses (Abbas & Lichtman, 2003), estas duas variáveis derivadas do perfil leucocitário foram incluídas na análise.

Desafio imunológico com Fitohemaglutinina (PHA) e morfometria

Após a coleta de sangue, os animais foram mantidos em potes de plástico individualizados e transportados para o laboratório para realização de um teste de resposta inflamatória à injeção subcutânea de PHA. O procedimento foi realizado 24 horas após a coleta do indivíduo. A espessura da palma da pata traseira direita do animal foi medida com um espessímetro (Digimess, precisão de 0,01 mm) antes de injetarmos 10 µL de uma solução de PHA (20mg de PHA / mL de solução salina) com seringas de vidro de 10 µL e agulhas 30Gx1/2’’, enquanto a espessura da palma da pata traseira esquerda do animal foi medida

antes de injetarmos 10 µL de solução salina (Brown et al., 2011). A espessura da palma das patas foi medida novamente após 12h e 24h. O edema em resposta à solução salina e PHA foi calculado a partir do aumento proporcional da espessura da pata antes e após a injeção, no intervalo de 12 e 24h. Cada pata foi medida três vezes em cada tempo, sendo a média destes valores utilizada para os cálculos. Ao final deste procedimento os animais foram anestesiados com gelo, espinhalados, medidos (comprimento rostro-cloacal – CRC, 0,01mm) e pesados (massa total e massa dos testículos, 0,0001g).

Capacidade Bactericida Plasmática (CBP)

A CBP de *H. albopunctatus* contra *Escherichia coli in vitro* foi avaliada a partir de modificações de Liebl & Martin (2009). Brevemente, pellets de *E. coli* não patogênica (Microbiologics, #24311 - ATCC 8739) foram ressuspendidos em 1 mL de Solução tampão fosfatada (PBS) estéril. A seguir, 100 µL desta solução foi adicionado a 5 mL de caldo tripticaseína de soja esterilizado (caldo TSB), e essa mistura foi mantida *overnight* à temperatura constante de 37ºC. No dia seguinte, a concentração das bactérias foi estimada através da leitura da densidade óptica em aparelho de espectrofotometria de placa (Espectrofotômetro ELISA, Spectra Max 250) com comprimento de onda de 600 nanômetros e diluições em série, em uma solução estéril de Ringer para anfíbios [para 1 litro desta solução temos: 6,5g de NaCl; 2g de $C_6H_{12}O_6$; 100µL de NaH_2PO_4(10%); 400µL de KCL(25%); 450µL de $CaCl_2$(25%) e 0,2g de $NaHCO_3$] foram realizadas para obtenção da concentração de trabalho ($1x10^6$ micro-organismos mL^{-1}). As amostras de plasma foram diluídas em solução estéril de Ringer (10 µL de plasma em 190 µL de Ringer) sendo então adicionados 10 µL da diluição de *E. coli* ($1x10^6$ micro-organismos mL^{-1}). A mistura foi agitada e incubada a 37ºC por 1 hora. O controle positivo do ensaio foi determinado pela adição de 10 µL da solução de trabalho de *E. coli* a 200µL de Ringer estéril, e o controle negativo foi determinado com 210

µL de Ringer estéril, sendo ambos incubados nas mesmas condições das amostras com plasma. Após a incubação, 500 µL de caldo TSB foram adicionados a cada amostra. A seguir, as amostras foram agitadas e transferidas em duplicata (300 µL por poço) para a placa de cultura de 96 poços, a qual foi incubada a 37°C. Após 2 horas de incubação, teve início uma sequência de quatro leituras da densidade óptica das amostras em espectrofotômetro com intervalos de 1 hora. A capacidade bactericida do plasma foi calculada como: *1 - (densidade óptica da amostra / densidade óptica do controle positivo)*, ou a proporção de micro-organismos mortos nas amostras em relação ao controle positivo. Para a realização dos cálculos utilizamos os dados de densidade óptica no momento inicial da fase de crescimento exponencial da *E. coli* no controle positivo, uma vez que neste momento evidenciamos o crescimento máximo da bactéria e, consequentemente, o maior índice de capacidade bactericida plasmática das amostras.

Dosagem dos níveis de corticosterona plasmática

Inicialmente, as amostras foram extraídas com éter segundo Mendonça *et al* (1996). Resumidamente, foram adicionados 3 mL de éter etílico às amostras de plasma, agitadas por 30 segundos e centrifugadas a 4ºC por 9 minutos a 1800 rpm, sendo os tubos de ensaio contendo as amostras mantidos a -80ºC por 7 min. A fase líquida foi então transferida para novos tubos de ensaio, os quais foram mantidos em capela de exaustão de gases para evaporação do éter, por aproximadamente 24 horas.

CORT foi dosado através de kits de ELISA (Cayman Chemicals). Todos os regentes utilizados foram fornecidos pelo fabricante. Antes da realização do ensaio, as amostras foram ressuspensas em EIA buffer. Brevemente, foram pipetados 50 µL de calibradores e amostras (em duplicata) em cada poço da respectiva placa de 96 poços. A seguir, foram adicionados 50 µL de traçador para corticosterona e 50 µL de antissoro para corticosterona, sendo a placa

então incubada à temperatura ambiente em um shaker orbital por 2h. As placas foram lavadas por 5 vezes com uma solução wash buffer e logo após foram pipetados 200 µL de reagente Ellman, seguindo-se de incubação em um shaker orbital por 50 min. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (comprimento de onda 412nm). A média do coeficiente de variação intra e inter-ensaios foi de 5,1 e 12,9%, respectivamente.

Análise estatística

A estatística descritiva completa foi realizada para todas as variáveis contínuas, os dados subsequentes foram transformados em $\log_{10}$ para as análises seguintes. Um teste-t para amostras repetidas foi usado para avaliar as medidas do inchaço em resposta à injeção de solução salina 0h, 12h e 24h e as medidas do inchaço em resposta à PHA 0h, 12h e 24h e um teste-t para amostras independentes foi utilizado para avaliar as diferenças entre o inchaço em resposta à PHA e o inchaço em resposta à solução salina 12h e 24h.

Uma análise de componentes principais (PCA) com rotação (*Varimax*, com normalização *Kaiser*) foi realizada para as seguintes variáveis: 1) Dia [onde o dia 1 equivale ao primeiro (06/fev) e 32 ao último dia (08/mar) de observação e coleta]; 2) Densidade do coro (os valores indicam o número de machos vocalizando próximo do animal observado); 3) Horário (hora do início da observação em minutos); 4) Taxa de vocalização (Vocalizações por minuto); 5) CORT; 6) Relação N/L; 7) Porcentagem de eosinófilos; 8) Índice corpóreo (calculado como residuais da regressão da massa corpórea em função do comprimento rostro-cloacal); 9) Massa testicular (calculada como residuais da regressão da massa do testículo em função da massa do indivíduo). Os escores resultantes da PCA foram testados para correlações paramétricas (Pearson) com o inchaço da pata experimental após 12 horas da injeção com PHA. Os dados foram analisados com SPSS 13.0 para Windows.

Resultados

Observações comportamentais e descrição das variáveis encontradas

Todos os animais foram coletados a partir de uma única população ao redor de dois lagos separados por uma barragem de areia de 15 metros de largura. O coro se formou, principalmente, onde havia uma vegetação típica de taboa (*Typha domingensis)* estabelecida na margem dos lagos. Os indivíduos foram encontrados vocalizando no solo e sobre a vegetação de taboa próximo da água. A estatística descritiva dos dados comportamentais, temperatura ambiente e das variáveis morfológicas e fisiológicas de *H. albopunctatus* encontram-se na Tabela 1. Foram identificados e contados os cinco tipos de leucócitos: linfócitos, neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos (Figura 2).

Tabela 1: Estatística descritiva com o número de indivíduos e os valores mínimo, máximo, média e desvio-padrão para os parâmetros abióticos, comportamentais, fisiológicos e morfológicos de *Hypsiboas albopunctatus*.

Parâmetro		N	Mínimo	Máximo	Média ± DP
Vocalizações por minuto		35	0	37,4	9,1 ± 10,3
Temperatura (°C)		30	13,5	22	18,1 ± 2,5
Massa (g)		37	4,244	8,995	6,878 ± 1,243
Testículos (g)		36	0,007	0,015	0,011 ± 0,003
Rins (g)		37	0,008	0,049	0,029 ± 0,008
Baço (g)		35	0,0008	0,0083	0,0038 ± 0,0019
CRC (mm)		37	46,11	59,19	52,86 ± 3,20
Corticosterona (ng/ml)		30	3,65	33,24	12,17 ± 6,53
Inchaço em 12 horas (mm)*		33	0,08	0,34	0,19 ± 0,07
Hematócrito (%)		35	0,11	0,43	0,25 ± 0,08
Perfil Leucocitário (%)	**Neutrófilo**	38	0,01	0,39	0,12 ± 0,10
	Linfócito	38	0,23	0,89	0,63 ± 0,14
	Eosinófilo	38	0	0,5	0,07 ± 0,10
	Basófilo	38	0	0,45	0,10 ± 0,10
	Monócito	38	0,01	0,15	0,08 ± 0,04

* Inchaço da pata experimental 12 horas após a injeção de PHA.

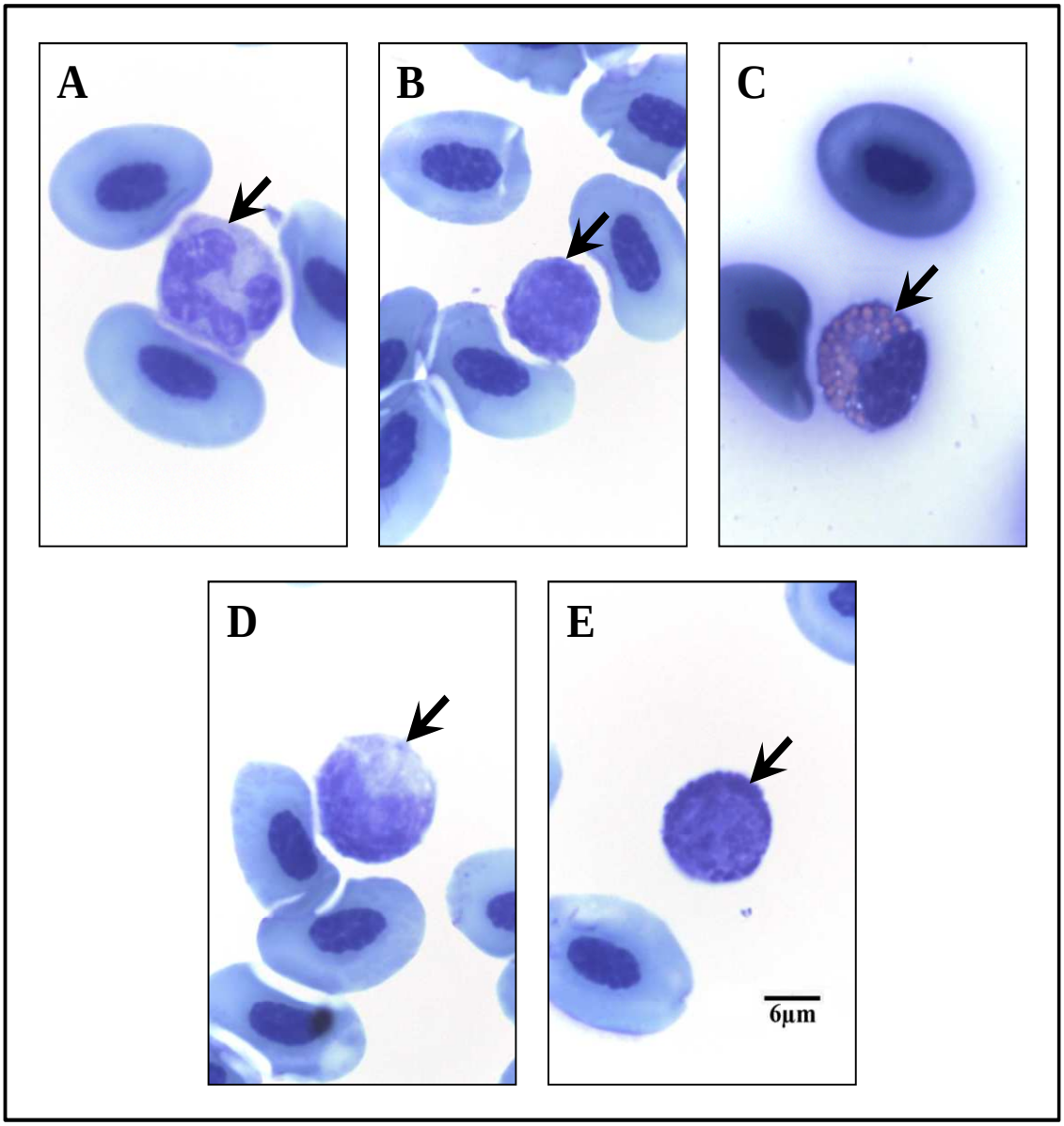

Figura 2: Tipos celulares sanguíneos de *Hypsiboas albopunctatus*. Os leucócitos estão evidenciados individualmente, com seta, em cada caixa: Neutrófilo (A), Linfócito (B), Eosinófilo (C), Monócito (D) e Basófilo (E). As células ao redor dos leucócitos são hemáceas nucleadas. A escala representada é a mesma para todas as imagens.

Desafio imunológico com Fitohemaglutinina

A espessura da palma das patas traseiras de *H. albopunctatus* aumentou em resposta à injeção de solução de PHA após 12 horas (T_{31} = -14,200; P < 0,001) e 24 horas (T_{14} = -4, 648; P < 0,001), sendo o maior inchaço observado após 12 horas (Figura 3). A espessura da palma das patas traseiras não aumentou em resposta à injeção de solução salina, havendo uma leve

tendência de redução após 12 horas (T_{31} = 2,007, *P* = 0,054) e 24 horas (T_{14} = 3,143; *P* = 0,07).

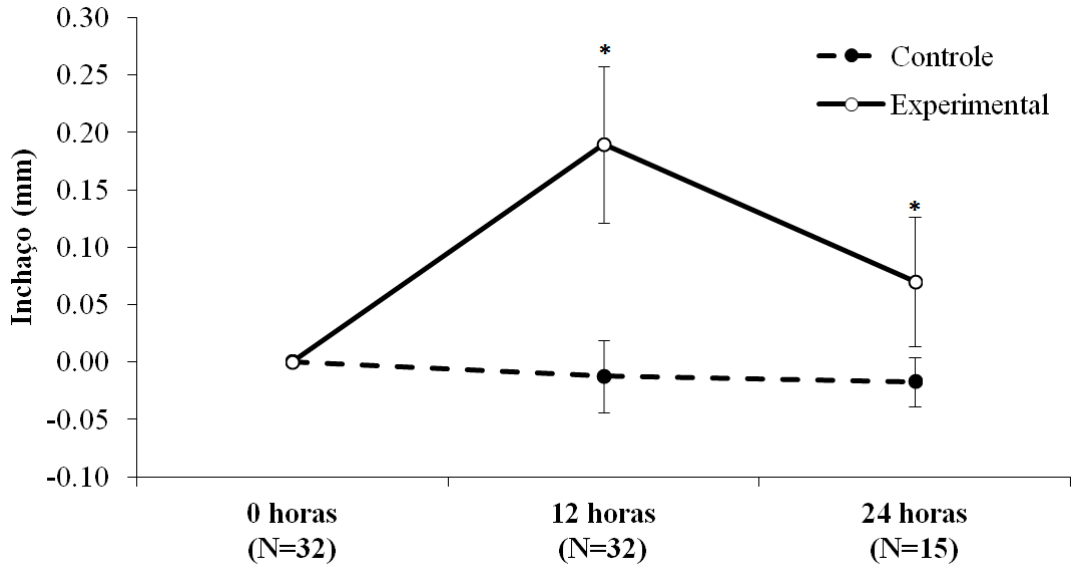

Figura 3: Inchaço das patas controle (10 µL de solução salina) e experimental (10 µL de uma solução de PHA (20mg de PHA / mL de solução salina) de 32 indivíduos machos da espécie *Hypsiboas albopunctatus* durante vinte e quatro horas. Os pontos e barras representam a média e o desvio-padrão, respectivamente. ***** representa diferença estatística (*P* < 0,05) entre o grupo controle e o experimental.

Capacidade Bactericida Plasmática

O plasma dos machos de *H. albopunctatus* não apresentou capacidade bactericida (*N* = 21), sendo o valor da atividade antimicrobiana do plasma, para todos os indivíduos, igual a zero (em porcentagem).

Relações entre variáveis comportamentais, fisiológicas, morfométricas e ambientais

A temperatura não apresentou relação com as variáveis comportamentais e fisiológicas (P > 0,147), e, portanto, não foi incluída nas análises subsequentes.

A análise de componentes principais (PCA) resultou em três componentes com *Eigenvalues* maiores que 1,0 (Tabela 2). O primeiro componente (C1) explicou 20,39% da variância e apresenta uma relação positiva entre o índice corpóreo e massa testicular e negativa com a relação N/L. O segundo componente (C2) explicou 20,25% da variância e

mostra uma relação positiva entre o dia da coleta, densidade do coro e porcentagem de eosinófilos. O terceiro componente (C3) explicou 19,59% da variância e apresentou uma relação positiva entre CORT e a taxa de vocalização e negativa com o horário da coleta dos animais. O inchaço em resposta a PHA após 12 horas foi negativamente correlacionado com o terceiro componente (C3) da PCA (r = -0,524, P = 0,012) (Figura 4).

Tabela 2: Componentes retidos da análise de componentes principais (PCA) incluindo variáveis abióticas, comportamentais, fisiológicas e morfológicas de *Hypsiboas. albopunctatus*.

Variáveis	**Componente 1**	**Componente 2**	**Componente 3**
Dia da observação	0,054	**0,301**	0,161
Densidade do coro	0,132	**0,467**	-0,089
Hora da observação	0,065	-0,105	**-0,366**
Vocalização por minuto	-0,064	-0,002	**0,415**
Nível de corticosterona	0,044	-0,234	**0,396**
Relação N/L	**-0,395**	0,041	-0,029
% de eosinófilo	-0,316	**0,417**	-0,05
Índice Corpóreo	**0,444**	0,075	-0,233
Massa testicular	**0,269**	0,078	0,175
% Total da variância	20,39	20,25	19,59

As variáveis com maior contribuição para cada componente estão destacadas em negrito. A variação total explicada por estes três componentes é 60,23%. O índice corpóreo foi calculado como residuais da regressão da massa corpórea em função do comprimento rostro-cloacal. A massa testicular foi calculada como residuais da regressão da massa do testículo em função da massa do indivíduo.

Discussão

Machos de *H. albopunctatus* que vocalizaram a taxas mais altas apresentaram maiores CORT e menor inchaço em resposta a PHA, indicando que estes indivíduos apresentam uma menor imunocompetência celular. Segundo o modelo de seleção intersexual mediada por parasitas proposto por Hamilton & Zuk (1982), a intensidade de expressão dos caracteres sexuais secundários refletiria o estado de saúde dos machos, sinalizando para as fêmeas a qualidade genética destes com relação à resistência à infecção parasitária. Em ambientes

naturais, as fêmeas de anuros tendem escolher os machos com vocalizações mais intensas e emitidas a maiores taxas (Wells, 2007). Em machos de *Hypsiboas prasinus*, indivíduos que apresentam maiores taxas de vocalização apresentam menor intensidade parasitária por helmintos (Madelaire *et al.*, *in press*). Altas taxas de vocalização em anuros, por sua vez, estão associadas a níveis elevados de andrógenos e CORT (Emerson & Heiss, 2001, Assis *et al.*, 2012), os quais apresentam um papel modulador do sistema imune, podendo apresentar um efeito imunossupressor quando cronicamente elevados (Nava-Castro *et. al*., 2012; Duffy *et. al*., 2000; Sapolsky, 1993). Desta forma, uma possível imunossupressão mediada por níveis elevados destes esteroides durante a temporada reprodutiva poderia representar o mecanismo responsável pelo aumento da intensidade parasitária associada à expressão dos caracteres sexuais secundários, postulada pelo modelo de seleção sexual mediada por parasitas (Zahavi, 1975; Folstad & Carter, 1992; Roberts *et al.*, 2007).

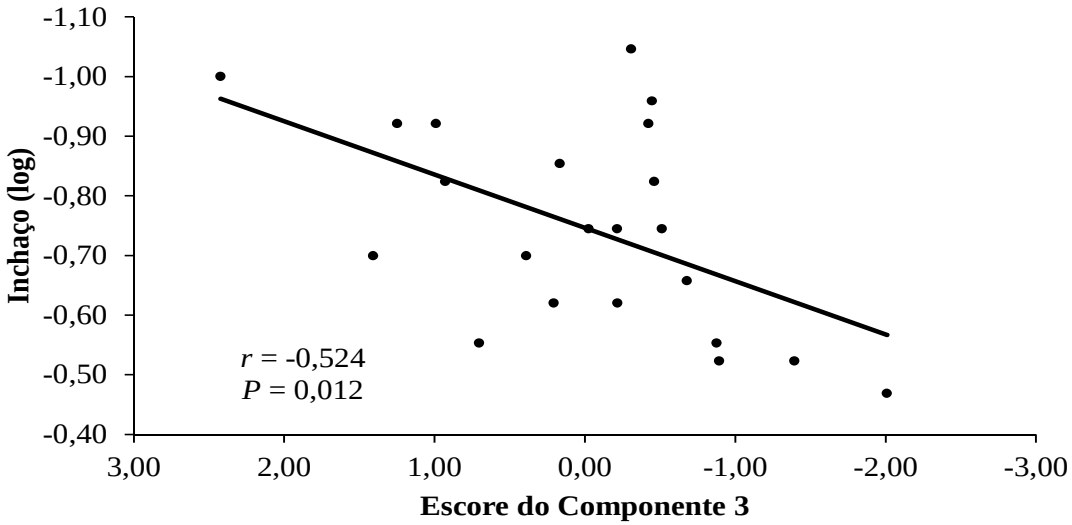

Figura 4: Correlação entre o inchaço da pata experimental após 12 horas da injeção de PHA (10 µL de uma solução de PHA (20mg de PHA / mL de solução salina) de 22 indivíduos machos da espécie *Hypsiboas albopunctatus* durante vinte e quatro horas e o escore do componente 3 da PCA (relação positiva ente vocalização por minuto e os níveis plasmáticos de corticosterona e negativa destes dois com a hora de observação).

Hypsiboas albopunctatus é uma espécie de reprodução contínua, mas com maiores registros de ocorrência nos meses chuvosos (Guimarães *et. al*., 2011; Maffei *et al*., 2011). Desta forma, o aumento do número de indivíduos no coro observado no segundo mês de coleta de dados pode estar associado à maior ocorrência de chuvas no período de coleta. Este período foi caracterizado também por indivíduos que apresentaram uma maior contagem de eosinófilos. Os eosinófilos são células da imunidade inata associadas, principalmente, ao combate de verminoses (Abbas & Lichtman, 2003). Durante as chuvas, pode haver um aumento do número de larvas nos lagos devido ao escoamento de água (Rocha *et al.,* 2011), além destas apresentarem menores taxas de dessecação, maiores taxas de sobrevivência e maior probabilidade de infectar um hospedeiro (Anderson, 2000). Assim, durante as chuvas, observamos o aumento da densidade de hospedeiros ao redor dos corpos de água e, possivelmente, um aumento do número de larvas infectantes. Esta situação deve favorecer a infecção por helmintos, o que poderia explicar o aumento na contagem de eosinófilos. Associado a isto, o período de maior atividade reprodutiva para *H. albopunctatus* ocorre de outubro a março, sendo assim, é possível que após meses de vocalização intensa, os níveis elevados de esteroides imunossupressores e uma maior disponibilidade de larvas no sítio reprodutivo tenham promovido um aumento da intensidade parasitária (Folstad & Karter, 1992; Saino *et al.,* 1995). A relação entre a ocorrência de chuvas, aumento na intensidade parasitária e aumento na contagem de eosinófilos nesta espécie permanece como uma hipótese a ser testada.

Diversos mecanismos da resposta imune humoral apresentam potencial para atividade bactericida pronunciada em vários grupos de vertebrados, incluindo anuros (Cooper, 1985; Merchant *et. al*., 2003; Millet *et. al*., 2007; Gomes *et. al*., 2012). Ensaios com algumas espécies de anuros do Brasil, tais como *Rhinella icterica, R. ornata, R. jimi, R. schneideri*, *Scinax fuscovaris* e *Hypsiboas faber*, comprovaram uma capacidade bactericida plasmática

contra *E. coli* com valores entre 30 e 100% de mortalidade bacteriana (Assis *et. al*., dados enviados para publicação). Entretanto, o plasma de nenhum macho de *H. albopunctatus* incluído no presente estudo demonstrou capacidade bactericida, mesmo quando a proporção entre plasma e patógeno foi nove vezes mais alta que a rotineiramente utilizada para anuros. A resposta imunitária em anfíbios é complexa e constituída por diversos mecanismos que incluem tanto componentes humorais como anticorpos, citocinas, entre outros, quanto células da imunidade inata e adquirida (neutrófilos, macrófagos, linfócitos), responsáveis pela atividade fagocitíca de partículas e células indesejáveis (Robert & Ohta, 2009). Adicionalmente, existem peptídeos cutâneos produzidos e espalhados sobre a pele com ação bactericida, atuando assim como primeira barreira protetora da imunidade inata (Rollins-Smith *et. al*., 2005). É possível que *H. albopunctatus* apresente, em alternativa aos componentes da resposta humoral, maior investimento em mecanismos de defesa celular mais pronunciados, como a resposta celular inflamatória à PHA evidenciada em nosso trabalho, e produção de peptídeos cutâneos que apresentem uma ação bactericida pronunciada.

A relação N/L tem sido considerada uma medida de estresse, dado que um aumento dos níveis de glicocorticoides em resposta a um evento estressor altera a relação N/L, promovendo neutrofilia e linfopenia na corrente sanguínea em diversos grupos de vertebrados, incluindo anfíbios (Davis *et. al*., 2008). Em resposta a um estressor, entretanto, alterações em CORT costumam ser muito mais rápidas e efêmeras que as alterações na relação N/L (Davis *et. al*., 2008). Esta defasagem temporal existente entre as alterações de CORT e da relação N/L em resposta a um estressor, como o esforço vocal sustentado em anuros, pode possivelmente explicar o fato de CORT aparecer associado à taxa de vocalização em um componente isolado da variação na relação N/L em machos de *H. albopunctatus*. Nesta espécie, indivíduos que apresentaram uma maior relação N/L apresentaram também menor massa testicular e menor índice corpóreo. É possível que este conjunto de

características reflita uma situação de catabolismo, inibição da função testicular e alterações celulares imunológicas associadas à ativação crônica do eixo HPI durante a temporada reprodutiva (Sapolsky, 1993; Emerson, 2001; Davis *et. al*., 2008). As relações causais entre CORT, índice corpóreo, massa testicular e imunocompetência permanecem por serem estudadas nesta espécie.

Assim como outras espécies de anfíbios anuros, *H. albopunctatus* apresenta a taxa de vocalização diretamente relacionada a CORT (Emerson, 2001; Assis *et. al*., 2012). Este padrão tem sido interpretado como resultado do fato de que o esforço vocal em anuros é uma atividade de alto custo metabólico (Taigen & Wells, 1985; Wells & Bevier, 1997), e a corticosterona apresenta um papel fundamental na manutenção da atividade física através da mobilização de reservas energéticas e da gliconeogênese a partir de ácidos graxos e aminoácidos (Tharp, 1975; Weber, 1992; Malisch *et al.,* 2007; Norris, 2007; Wack *et. al*., 2012). Desta maneira, seria possível inferir que indivíduos com maiores taxas de vocalização tenderiam a requerer maiores gastos energéticos e, consequentemente, maiores CORT. O coro de *H. albopunctatus* se estabeleceu no início da noite com maior número de machos no coro, CORT e maiores taxas de vocalização, sendo que a atividade vocal cessava gradativamente após as três primeiras horas de início do coro. Este fato poderia refletir em uma diminuição de CORT após as horas iniciais. Entretanto, Emerson e Hess, 2001 encontraram um padrão diferenciado para *Pseudacris triseriata*, onde CORT se elevou com o passar do tempo durante atividade vocal. Contudo, esta espécie apresenta taxas de vocalizações muito altas, com uma média de 1332 vocalizações/hora (Cocroft e Ryan, 1995), diferentes do padrão encontrado para *H. albopunctatus*, com uma média de 640 vocalizações/hora. A contribuição da demanda associada ao exercício aeróbio e da variação circadiana sobre CORT para espécies com diferentes taxas de vocalização permanece por ser investigada. Adicionalmente, indivíduos com maiores taxas de vocalização e maior CORT apresentaram menor resposta inflamatória

cutânea ao desafio com PHA. Níveis cronicamente elevados de corticosterona na corrente sanguínea podem atuar na inibição da adesão e migração de neutrófilos para tecidos lesados, reduzindo ou até mesmo inibindo a formação do processo inflamatório (Perretti & Flower, 2003). Em resposta à PHA, os neutrófilos migram inicialmente para o tecido lesado e, juntamente com os linfócitos, são responsáveis por promover o processo inflamatório e pela reparação do tecido lesado (Martin II *et. al*., 2005; Brown *et. al*., 2011). Desta maneira é possível considerar que os indivíduos com maiores taxas de vocalização e CORT e que apresentaram menor inchaço em resposta à PHA, possam estar sob efeito de uma possível imunossupressão celular. Entretanto, a relação causal entre CORT e imunidade mediada por células permanece por ser estudada.

Considerações finais

Este é o primeiro estudo mostrando uma relação positiva entre a taxa de vocalização com CORT e negativa com um aspecto da imunocompetência em uma espécie de anfíbio anuro. Estes resultados evidenciam a possível importância da corticosterona como um hormônio mediador do compromisso entre a manutenção do esforço vocal em anuros e uma potencial imunossupressão em relação à imunidade mediada por células durante a temporada reprodutiva. As relações causais entre esforço vocal, níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência, bem como sua relevância para a intensidade parasitária e a seleção intersexual, permanecem por ser investigadas neste grupo.

Referências

Abbas, A. K. & Lichtman, A. H. (2003). **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª Edição, Elsevier, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

Ahmed, S.A., Dauphinée, M.J. & Talal, N. 1985. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoinmune mice. **J. Immunol.** 134, 204-210.

Alcock, J. (2009). The Evolution of reproductive behavior. *In*: Alcock, J. **Animal Behavior: An Evolutional Approach**. Nineth Edition, Sinauer Associates, INC. Pp. 329-376.

Anderson R. C. (2000). **Nematodes parasites of vertebrates: their development and transmission.** CABI Publishing, New York, Pp. 245-347.

Assis, V. R.; Navas, C. A.; Mendonça, M. T.; Gomes, F. R. (2012). Vocal and territorial behavior in the Smith frog (*Hypsiboas faber*): Relationships with plasma levels of corticosterone and testosterone. **Comp. Biochem. and Physiol** A 265-271.

Brown, G.P., Shilton, C.M., Shine, R. (2011). Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. **Meth. Ecol. Evol.** 2, 341-348.

Cavalcanti, D. M. H., Lotufo, C. M. C., Borelli, P., Tavassi, A. M. C., Pereira, A. L. M., Markus, R. P., Farsky, S. H. P. (2006). Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. **Molecular and Cellular Endocrinology** 249: 32-39.

Cocroft, R. B.; Ryan, M. J. (1995). Patterns of advertisement call evolution in toads and chorus frogs. **Animal Behavior** 49: 283-303.

Cooper, E. L. (1985). Comparative immunology. **Integ. Comp. Biol.** 25(3): 649-664.

Davis, A. K., Maney, D. L.; Maerz, J. C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Funct. Ecol.** *22*, 760-772.

Duffy, D. L.; Bentley, G. E.; Drazen, D. L.; Ball, G. F. (2000). Effects of testosterone on cell-mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. Behavioral Ecology 11(6): 654-662.

Emerson, S. B. (2001). Male advertisement calls behavioral variation and physiological processes. Pp. 36-44. *In*: M.J. Ryan (ed.). **Anuran Communication**. Smithsonian Institution Press, Washington and London.

Emerson, S. B. & Hess, D. (2001). Glucocorticoids, Androgens, Testis Mass, and the energetic of Vocalization in Breeding Male Frogs. **Hormones and Behavior** 39, 59-69.

Fisher, R.A. (1915). The evolution of sexual preferences. **Eugenics Review** 7:184-192.

Folstad, I. and Karter. A.J. 1992. Parasites, bright males, and immunocompetence handicap. **The American Naturalist** 139:603-622.

Frost, D. R. (2013). Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.3 (04 de maio de 2013). Acessado eletronicamente: http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/ São Paulo, Brasil.

Gomes, F. R., Oliveira, R. V., Assis, V. R., Titon-Junior, B., Moretti, E. H., Mendonça, M. T. (2012). Interespecific variation in innate immune defenses and stress response of toads from Botucatu (São Paulo, Brasil). **South American Journal of Herpetology**, 7(1): 1-8.

Guimarães, T. C. S., Figueiredo, G. B., Mesquita, D. O., Vasconcellos, M. M. (2011). Ecology of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) in a Neotropical Savanna. **Journal of Herpetology**, 45: 244-250.

Hamilton, W. D., Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? **Science** 218:384-387.

Hausfater, G., H.C. Gerhardt, and G.M. Klump. 1990. Parasites and mate choice in gray treefrog, *Hyla versicolor*. **American Zoologist** 30:99-311.

Leary, C. J.; Jessop, T. S.; Garcia, A. M.; Knapp, R. (2004). Steroid hormone profiles and relative body condition of calling and satellite toads: implications for proximate regulation of behavior in anurans. **Behavioral Ecology** 15(2): 313-320.

Leary, C.J., Garcia, A.M., Knapp, R., 2006. Elevated corticosterone levels elicit non-calling mating tactics in male toads independently of changes in circulating androgens. **Horm. Behav.** 49, 425–432.

Liebl, A.L. & Martin, L.B. 2009. Simple quantification of blood and plasma antimicrobial capacity using spectrophotometry. **Func. Ecol.** 23, 1091-1096.

Madelaire, C. B., Silva, R. J., Gomes, F. R. Calling behavior and parasite intensity in tree-frogs, *Hypsiboas prasinus*. **Journal of Herpetology** *in press*.

Maffei, F., Ubaid, F. K., Jim, J. (2011). Anurofauna em area de cerrado aberto no município de Borebi, estado de São Paulo, Sudeste do Brasil: uso do habitat, abundância e variação sazonal. **Biota Neotrop.** 11(2): 201-213.

Malisch, J.L., Saltzman, W., Gomes, F.R., Rezende, E.L., Jeske, D.R. & Garland Jr., T. 2007. Baseline and stress-induced plasma corticosterone concentrations of mice selectively bred for high voluntary wheel running. **Physiol. Biochem. Zool.** 80,146-156.

Martin II, L. B., Gilliam, J., Han, P., Lee, K., Wikelski, M. (2005). Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 140: 126-135.

Merchant, M.E., Roche, C., Elsey, R.M. & Prudhomme, J. (2003). Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Comp. Biochem. Physiol. B.** 136, 505-513.

Mendonça, M.T., Chernetsby, S.D., Nester, K.E., Gardner, G.L., 1996. Effects of sex steroids on sexual behavior in the big brown bat, Eptesicus fuscus. **Horm. Behav.** 30,153–161.

Millet, S., Bennett, J., Lee, K.A., Hau, M. & Klassing, K.C. (2007). Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. **Develop. Comp. Immun.** 31, 188-201.

Moretti, E. H. (2011). **Correlações comportamentais, fisiológicas e morfológicas da carga parasitária em Rhinella icterica (Anura: bufonidae).** Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

Nava-Castro, K.; Hernández-Bello, R.; Muñiz-Hernandez, S.; Camacho-Arroyo, I.; Morales-Montor, J. (2012). Sex steroids, immune system, and parasitic infections: facts and hypotheses. **Annals of The New York Academy of Sciences** 1262:16-26.

Navas, C. A.; Bevier, C. R. (2001). Thermal dependency of calling performance in the eurythermic frog colostethus subpunctatus. **Herpetologica** 57(3): 384-395.

Norris, D. O. (2007). Comparative aspects of vertebrate reproduction. *In:* **Vertebrate Endocrinology**, Norris, D. O. Quarta edição Ed. Elsevier. Pp. 371- 426.

Perretti, M., Flower, R. J. (2004). Annexin 1 and the biology of the neutrophil. **Journal of Leukocyte Biology** 75: 25-29.

Pough, F.H., Magnusson, W.E., Ryan, M.J., Wells, K.D. & Taigen, T.L. 1992. Behavioral energetic. Pp. 395-436. *In:* Feder M.E. & Burggren W.W. (eds.). **Environmental Physiology of Amphibians**. University of Chicago Press, Chicago.

Riccardi, C., Bruscoli, S., Migliorati, G. (2002). Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. **Pharmacological Research** 45(5): 361-368.

Robert, J.; Ohta, Y. (2009). Comparative and developmental study of the immune system in Xenopus. **Developmental Dynamics** 238: 1249-1270.

Roberts, M. L., Buchanan, K. L., Hasselquist, D., Bennett, A. T. D., Evans, M. R. (2007). Physiological, morphological and behavioural effects of selecting zebra finches for divergent levels of corticosterona. **J. Exp. Biol.** 210:4368-4378.

Rocha, S., Pinto, R. M. F., Floriano, A. P., Teixeira, L. H., Bassili, B., Martinez, A. Costa, S. O. P., Caseiro, M. M. (2011). Environmental analyses of the parasitic profile found in

the Sandy soil from the Santos municipality beaches, SP, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 53 (5):277-281.

Rollins-Smith, L. A., Reinert, L. K., O'Leary, C. J., Houston, L.E., Woodhams, D.C. (2005). Antimicrobial peptide defenses in Amphibian Skin. **Integrative and Comparative Biology** 45: 137-142.

Romero, L.M. & Reed, J.M. (2005). Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? **Comp. Biochem. Physiol. A** 140, 73-79.

Saino, N., Møller, A. P., Bolzerna, A. M. (1995). Testosterone effects on the immune system and parasite infestations in the barn swallow (Hirundo rústica): na experimental test f the immunocompetence hypothesis. **Behavioral Ecology** 6 (4): 397-404.

Sapolsky, Y. R. M. (1993). Neuroendocrinology of the stress response. ***In*** **Behavioral Endocrinology**, J. B. Becker, S. M. Breedlove, and D. Crews (eds.). MIT press, Cambridge, Massachusetts.

Taigen, T. & Wells, K. 1985. Energetics of vocalizations by an anuran amphibian. **J. Comp. Physiol. A.** 155, 163-170.

Tharp G.D. 1975. The role of glucocorticoids in exercise. **Med. Sci. Sports Exercise.** 7, 6-11.

Terry, W. C. (2006). Hematologia de Anfíbios. ***In*** **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, Mary Anna Trall, D. V. M., M. S., D. A. C. V. P.. Ed. Roca. Brasil. Pp. 277-281.

Wack, C. L., DuRant, S. E., Hopkins, W. A., Lovern, M. B., Feldhoff, R. C., Woodley, S. K. (2012). Elevated plasma corticosterona increases metabolic rate in a terrestrial salamander. **Comp. Biochem. and Physiol. A** 161: 153-158.

Weber, J.M., 1992. Pathways for oxidative fuel provision to working muscles: ecological consequences of maximal supply limitations. **Experientia** 48, 557–564.

Wells, K. D. & Bevier, C. R. (1997). Contrasting patterns of energy substrate use in two species of frogs that breed in cold weather. **Herpetologica** 53: 70-80.

Wells, K.D. (2001). The energetics of calling in frogs. Pp. 45-60. *In*: M.J. Ryan (ed.). **Anuran Communication**. Smithsonian Institution Press, Washington and London.

Wells, K. D. (2007). Anuran Vocal Communication. *In*: **The Ecology and Behaviour of Amphibians**, Wells, K. D. The University of Chicago Press. Pp. 268-337.

Wiegers, G.J. & Reul, J.M.H.M. (1998). Induction of cytokine receptors by glococorticoids; functional and pathological significance. **Trends Pharmacol. Sci.** 19, 317-321.

Zahavi, A. (1975). Mate selection – a selection for a handcap. **Journal of Theoretical Biology** 53:205-214.

V – Conclusões gerais

- *H. albopunctatus* não apresentou capacidade bactericida plasmática contra *E. coli* não patogênica, demonstrando assim uma resposta humoral pouco pronunciada contra este antígeno;

- Houve uma relação negativa entre a relação N/L com o índice corpóreo e massa testicular, indicando uma possível situação de catabolismo e diminuição da atividade testicular através da ativação frequente do eixo hipotálamo-hipófise-inter-renais;

- Em períodos com maior número de indivíduos no coro, houve uma maior contagem de eosinófilos, indicando uma possível relação entre densidade de hospedeiros no coro e ocorrência de infecções helmínticas;

- O coro de *H. albopunctatus* se estabeleceu no início da noite com altas taxas de vocalização e CORT, havendo uma redução das taxas de vocalização e dos níveis hormonais no decorrer do período total de atividade vocal;

- Indivíduos que vocalizaram mais cedo, com maiores taxas de vocalização e CORT apresentaram menor inchaço em resposta a PHA, indicando um possível compromisso entre a CORT e a imunidade mediada por células.

VI – Anexos

instituto de biociências

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF.CEUA/IB/011/2013
Ref. 2013.1.509.41.2

São Paulo, 22 de março de 2013

Prezado Senhor

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 19 de março de 2013, **APROVOU** o Projeto "Relações entre taxa de vocalização, níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em *Hipsiboas albopuctatus* (Anura: Hylidae)" - **Protocolo 179/2013**, de sua responsabilidade (Colaboradora Stefanny Christie Gomes Monteiro).

O pesquisador responsável deverá comunicar a esta Comissão qualquer alteração e/ou intercorrência que houver durante a realização da pesquisa.

Lembramos que deverão ser apresentados os relatórios anuais ou final, conforme modelo disponível no link desta Comissão.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariz Vainzof
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. FERNANDO RIBEIRO GOMES
Departamento de Fisiologia - IBUSP

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-900 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - http://www.ib.usp.br

Anexo1: Certificado do comitê de ética do projeto: "Relações entre taxa de vocalização, níveis plasmáticos de corticosterona e imunocompetência em Hypsiboas albopunctatus (Anura: Hylidae)