Mariana Bentim Góes

**Desafio hormonal em roedores silvestres:
investigando relações entre corticosterona,
metabolismo energético e perfil leucocitário**

*Hormonal challenge in free-living rodents:
investigating relations between corticosterone,
energy metabolism and leukocyte profile*

São Paulo

2015

Mariana Bentim Góes

**Desafio hormonal em roedores silvestres: investigando
relações entre corticosterona, metabolismo energético e
perfil leucocitário**

*Hormonal challenge in free-living rodents: investigating
relations between corticosterone, energy metabolism and
leukocyte profile*

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: Prof. Dr. Fernando
Ribeiro Gomes

Colaborador: Prof. Dr. Ariovaldo
Pereira Cruz Neto

São Paulo

2015

Góes, Mariana Bentim

Desafio hormonal em roedores silvestres:
investigando relações entre corticosterona,
metabolismo energético e perfil leucocitário

55 páginas.

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

1. Estresse. 2. ACTH. 3. *Akodon montensis*.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia.

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a).

DEDICATÓRIA

À minha família, por laços de sangue e por escolha,
seu amor é o que faz a vida valer.

EPÍGRAFE

“Pior que não terminar uma viagem é nunca partir.”

Amyr Klink

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos três anos de mestrado muitas mudanças ocorreram na minha vida e sou grata por cada pessoa envolvida nesse processo.

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Fernando R. Gomes e Dr. Ariovaldo P. C. Neto, que de forma complementar contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Ao Fernando, por estar sempre por perto, guiando (e muitas vezes acalmando) com suas palavras de sabedoria. Ao Neto, por me fazer forte e ensinar que posso trilhar meus próprios caminhos.

Agradeço ao técnico Eduardo Braga, pelos dias de auxílio em todos os experimentos necessários.

Aos amigos do departamento e do Laboratório de Comportamento e Fisiologia Evolutiva, Carla Madelaire, Bruna Cassettari, Adriana Barsotti, Jessyca Citadini, Maya Maia, Eduardo Moretti, Leonardo Crisóstomo...seus conselhos e presença deram vida à rotina paulistana. Já sinto saudades!

Agradeço à minha família, por compreender os dramas acadêmicos e serem os primeiros a acreditar na minha capacidade. Sem o seu apoio nenhuma conquista seria possível.

E finalmente agradeço ao meu marido Haru, por estar ao meu lado e ajudar a construir a vida que sempre sonhei.

O presente trabalho contou com o apoio das seguintes instituições:

- **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**

Através de bolsa de mestrado concedida à aluna Mariana Bentim Góes (processo 130300/2012-8);

- **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

Vinculado ao projeto temático “*Effects of global climate change of the Brazilian fauna: a conservation physiology approach*” (processo 2008/57687-0).

- **Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral** (Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências – USP).

Os procedimentos obtiveram autorização prévia do Comitê de Ética Animal (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - Protocolo 167/2012) e as coletas foram realizadas sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (licença SISBIO nº 33096).

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Espécie estudada, local de coleta e manutenção em cativeiro.....	16
3.2. Desafio hormonal: tratamento exógeno com DXM e ACTH.....	17
3.3. Amostras sanguíneas.....	18
3.4. Perfil leucocitário.....	18
3.5. Dosagem hormonal.....	18
3.6. Respirometria.....	19
3.7. Índice de condição corpórea.....	20
4. ANÁLISE DE DADOS.....	22
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO.....	26
6.1. Corticosterona.....	26
6.2. Perfil leucocitário.....	28
6.3. Metabolismo energético.....	29
6.4. Índice de condição corpórea.....	31
7. CONCLUSÕES.....	32
8. FIGURAS E TABELAS.....	33
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho experimental de desafio hormonal aplicado em machos e fêmeas de *Akodon montensis*..... 33
- Figura 2.** Níveis plasmáticos de corticosterona (ng/mL) em fêmeas de *Akodon montensis* após aplicação de DXM e após aplicação de estressores (salina e ACTH) em dois horários distintos: 30 minutos e 60 minutos. 34
- Figura 3.** Níveis plasmáticos de corticosterona (ng/mL) em machos de *Akodon montensis* após aplicação de DXM e após aplicação de estressores (salina e ACTH) em dois horários distintos: 30 minutos e 60 minutos. 34
- Figura 4.** Amplitude da resposta hormonal em machos e fêmeas de *Akodon montensis* 30 minutos após aplicação de salina e ACTH. 35
- Figura 5.** Relação N:L em *Akodon montensis* após aplicação de DXM e após aplicação de estressores: 30 minutos após salina e 30 e 60 minutos após ACTH..... 35
- Figura 6.** Relação entre taxa metabólica e concentração plasmática de corticosterona, ambas após aplicação de DXM. ($R^2 = 0,124$; $P = 0,038$). 36
- Figura 7.** Relação entre proporção N:L e concentração plasmática de corticosterona, ambas após aplicação de DXM. ($R^2 = 0,065$; $P = 0,198$). 36
- Figura 8.** Relação entre proporção N:L 30 minutos após aplicação de ACTH e concentração plasmática de corticosterona após aplicação de DXM. ($R^2 = 0,707$; $P < 0,001$). 36

Figura 9. Relação entre variação na proporção N:L 30 minutos após aplicação de ACTH e concentração plasmática de corticosterona após aplicação de DXM. ($R^2 = 0,841$; $P < 0,001$)	36
Figura 10. Relação entre concentração plasmática de corticosterona 30 minutos após aplicação de ACTH e IMC. ($R^2 = 0,145$; $P = 0,209$).	37
Figura 11. Relação entre taxa metabólica e amplitude da resposta hormonal, ambas 30 minutos após aplicação de ACTH. ($R^2 = 0,13$; $P = 0,762$).	37
Figura 12. Relação entre taxa metabólica e concentração plasmática de corticosterona, ambas 30 minutos após aplicação de ACTH. ($R^2 = 0,075$; $P = 0,482$).	37
Figura 13. Relação entre taxa metabólica 3h após aplicação de ACTH e concentração plasmática de corticosterona 30 minutos após aplicação de ACTH. ($R^2 = 0,165$; $P = 0,168$).	37
Figura 14. Relação entre taxa metabólica 6h após aplicação de ACTH e concentração plasmática de corticosterona 30 minutos após aplicação de ACTH. ($R^2 = 0,186$; $P = 0,239$).	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Estatística descritiva dos parâmetros avaliados em indivíduos de *Akodon montensis* 30 minutos após aplicação de salina e ACTH. 39
- Tabela 2.** Estatística descritiva dos parâmetros avaliados em indivíduos de *Akodon montensis* 60 minutos após aplicação de salina e ACTH. 40
- Tabela 3.** Média $\pm$ Desvio padrão da contagem diferencial de leucócitos (%) em *Akodon montensis*. Foram realizados esfregaços de sangue referentes aos momentos: 3 horas após aplicação de DXM e 30 e 60 minutos após aplicação de estressores (ACTH ou salina). 41
- Tabela 4.** Média $\pm$ Desvio padrão da taxa metabólica (O_2 mL/g h) em indivíduos de *Akodon montensis*. Foram registrados os momentos: 1h após aplicação de DXM e 30 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas após aplicação de estressores (ACTH ou salina). 42
- Tabela 5.** Estatística de Akaike para modelos de concentração plasmática de corticosterona, relação N:L e taxa metabólica após aplicação de DXM. 42
- Tabela 6.** Estatística de Akaike para modelos de concentração plasmática de corticosterona, amplitude da resposta hormonal e relação N:L 30 minutos após aplicação de ACTH. 43
- Tabela 7.** Estatística de Akaike para modelos de taxa metabólica após aplicação de ACTH. 44

RESUMO

O processo de perda e fragmentação do habitat induzido pela ação humana é considerado a principal causa da diminuição global da biodiversidade. Apesar de muitos estudos fornecerem indicações sobre o grau de tolerância das espécies, poucos permitem determinar os mecanismos subjacentes à tolerância diferencial, o que seria de suma importância conservacionista. Neste foram investigados aspectos da responsividade ao estresse em *Akodon montensis*, uma espécie de roedor classificada em trabalhos prévios como tolerante ao processo de fragmentação. O objetivo do presente estudo foi avaliar possíveis alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona, taxa metabólica e perfil leucocitário de machos e fêmeas em resposta a desafio hormonal, que consistiu na aplicação de Dexametasona (DXM) seguida pela aplicação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) ou salina (grupo controle), bem como o curso temporal destas respostas e suas possíveis relações. Foram capturados 41 indivíduos em área de Floresta Atlântica (Reserva Florestal do Morro Grande) e transportados para laboratório em alojamento. Um dia após a captura foi realizado experimento e os indivíduos divididos em dois horários distintos de coleta sanguínea: 30 e 60 minutos. O tratamento com ACTH aumentou significativamente os níveis plasmáticos de corticosterona, com pico 30 minutos após a aplicação e forte tendência à diminuição após este período. Observamos relação diretamente proporcional entre a concentração plasmática de corticosterona, taxa metabólica, relação neutrófilo:linfócito (N:L) e índice de condição corpórea (IMC), apesar do tratamento com ACTH não afetar diretamente estes parâmetros dentro do intervalo amostrado (30 minutos a 6 horas). Os resultados sugerem a existência de uma relação entre a ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), através da concentração plasmática de corticosterona, e aspectos metabólicos e leucocitários, embora seus possíveis efeitos possam se dar em intervalos temporais mais tardios ou após a repetição de estímulos. A realização de novos experimentos, com a obtenção de maior número de indivíduos e maior intervalo de coleta de amostras, se faz necessária para mais inferências sobre o perfil fisiológico de indivíduos desta espécie frente a estímulos estressores.

Palavras-chave: Estresse; ACTH; *Akodon montensis*.

ABSTRACT

The process of habitat loss and fragmentation caused by anthropic action is considered the main cause of global biodiversity loss. Despite many studies provide data about the degree of tolerance of the species, few of them determine the differential tolerance mechanisms, which would be very important for conservation decision processes. This study investigated aspects of responsiveness to stress in Akodon montensis, a rodent specie classified as tolerant to habitat fragmentation process in previous works. The aim of the present study was to evaluate possible changes in plasma corticosterone levels, metabolic rate and leukocyte profile of males and females in response to hormonal challenge, which involves the injection of dexamethasone followed by the administration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) or saline (control treatment), the accompaniment along time of these responses and their possible relationships. Forty-one individuals were captured in an Atlantic forest area (Reserva Florestal do Morro Grande) and transported to the laboratory in the field station. One day after capture, the experiment subjects were conducted and individuals divided into two different times of blood sample collection: 30 and 60 minutes. The treatment with ACTH significantly increased plasma corticosterone levels, showing a peak 30 minutes after application and strong tendency to decrease thereafter. We observed a positive relationship between the corticosterone plasma levels, metabolic rate, neutrophil:lymphocyte ratio and body condition index, despite the treatment with ACTH not affect directly these parameters (30 minutes to 6 hours). These results suggest a relationship between the activation of the Hypothalamic Pituitary Axis (HPA) and metabolic and leukocyte aspects, indicated by plasma corticosterone levels, however possible effects of corticosterone could occur later or after repeated stimuli. Complementary experiments, with a large number of individuals and more blood sample collection along time, are necessary to infer more thoroughly about the physiological profile of stressful stimuli in individuals from this specie.

Key-words: Stress ; ACTH; Akodon montensis.

1. INTRODUÇÃO

O processo de perda e alteração antrópica da paisagem (degradação e fragmentação de habitats) é considerado uma das principais causas da perda global da biodiversidade (Laurance e Bierregaard, 1997; Fahrig, 2003; Paglia et al., 2006; Homyack, 2010). Estudos direcionados a entender como populações respondem a este processo, tradicionalmente envolvem métricas que relacionam padrões de distribuição, riqueza e abundância de diferentes espécies com características da paisagem (Mazerolle e Villard, 1999; Olifiers et al., 2005; Elith e Leathwick, 2009; Vieira et al., 2009). Evidências sugerem que algumas espécies são mais resilientes que outras (Gascon et al., 1999; Viveiros de Castro e Fernandez, 2004; Umetsu e Pardini, 2007; Püttker et al., 2008a, 2008b), porém a comparação entre estes padrões não permite detectar quais seriam os mecanismos subjacentes à tolerância diferencial. Compreender os mecanismos atuantes é fundamental tanto do ponto de vista teórico como prático, para determinar a amplitude de respostas que as espécies podem apresentar quando confrontadas com distúrbios e assim, determinar *a priori*, seu grau de tolerância aos efeitos da alteração antrópica da paisagem. Recentemente, a ideia de que protocolos e métodos derivados da fisiologia poderiam auxiliar na construção deste conhecimento levou ao surgimento de um novo campo de pesquisa, conhecido como Fisiologia da Conservação (Wikelski e Cooke, 2006; Cooke e O'Connor, 2010; Cooke et al., 2013). Um dos conceitos fundamentais no uso de biomarcadores fisiológicos para acessar o potencial de resposta das espécies a distúrbios antrópicos é o conceito de alostase, definido na literatura como os processos de ajuste fenotípico desempenhados por um indivíduo, a fim de manter sua homeostase em resposta a um desafio ambiental, ou seja, em uma resposta de estresse (McEwen e Wingfield, 2003; Romero et al., 2009). Tais ajustes, realizados frente a mudanças ambientais previsíveis ou imprevisíveis, podem envolver caracteres morfológicos, fisiológicos e comportamentais, implicando em um substancial custo energético em sua história de vida (carga alostática - McEwen e Wingfield, 2003).

Em um contexto de mudança ambiental antrópica, os animais devem lidar não só com mudanças ambientais previsíveis e associadas a sua história natural, mas também com estressores potenciais como subdivisão de habitat, invasão de competidores generalistas, predadores exóticos e alterações microclimáticas (Bierregaard et al., 1992; Fischer e

Lindenmayer, 2007; Ellis et al., 2012; Johnstone et al., 2012a; Wingfield, 2013). Em teoria, tais mudanças podem levar a um estado elevado de carga alostática, resultando em um aumento na ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) dos indivíduos e na consequente liberação de hormônios glicocorticoides (GCs) no plasma sanguíneo, um dos principais mediadores da manutenção da alostase em vertebrados (McEwen e Wingfield, 2003; Goymann e Wingfield, 2004; Landys et al., 2006). Antes da liberação de GCs, a ativação do eixo HHA envolve uma cascata de eventos hormonais: no hipotálamo é secretado o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o qual estimula células da adeno-hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH); via sistema circulatório, o ACTH atinge a glândula adrenal, estimulando a síntese e liberação de hormônios GCs (Sapolsky et al., 2000; Reeder e Kramer, 2005), sendo a corticosterona considerada o GC primário em roedores (Romero, 2004; Touma e Palme, 2005). A modulação exercida pelos GCs é fundamental para a manutenção da homeostase por modular importantes processos de ajuste fisiológico, tais como a disponibilização de substrato energético via quebra de lipídeos e proteínas, gliconeogênese, e inibição de comportamentos para realocar energia para processos essenciais à sobrevivência (Sapolsky et al., 2000). Entretanto, a persistência desses estímulos de forma frequente ou prolongada pode levar a um estado de sobrecarga alostática, afetando-o fisiologicamente e resultando em progressivo declínio populacional (Mullner et al., 2004; Arlettaz et al., 2007). Assim, indivíduos capazes de reagir de forma eficiente às novas condições ambientais, desempenhando respostas fisiológicas e mantendo seu balanço energético e homeostático, teriam maior probabilidade de sobrevivência e capacidade de ocupação em áreas fragmentadas (Angelier e Wingfield, 2013).

Uma das formas de se investigar a relação entre vertebrados e seu ambiente é através da avaliação de estresse fisiológico (Romero, 2004; Suorsa et al., 2004; Wikelski e Cooke, 2006; Davis et al., 2008; Homyack, 2010; Johnstone et al., 2012a, 2012b). Entre os índices de estresse utilizados atualmente podemos citar a concentração de hormônios GCs (ex: corticosterona no plasma sanguíneo e metabólitos desses hormônios em fezes e urina), a contagem diferencial de leucócitos (ex: proporção entre neutrófilos e linfócitos – N:L), avaliações do sistema imunológico (ex: teste de capacidade antimicrobiana plasmática) e avaliações do estado corpóreo geral (ex: índices estimados por massa e métricas corpóreas). Devemos considerar, contudo, o desafio de interpretação desses dados, uma vez que as métricas podem ser rapidamente alteradas

frente à retenção por armadilhas e manipulação dos indivíduos (Romero e Romero, 2002; Fletcher e Boonstra, 2006; Lynn e Porter, 2008; Delehanty e Boonstra, 2009). Sabe-se que concentrações de GCs podem ser alteradas entre três e cinco minutos no plasma sanguíneo de vertebrados, enquanto métricas envolvendo células do sistema imune podem ser alteradas após 20 minutos (Romero e Romero, 2002; McLaren et al., 2003; Romero e Reed, 2005; Davis et al., 2008; Johnstone et al., 2012*b*). No caso de trabalhos com animais de vida livre, uma forma de contornar tal limitação é através da abordagem experimental, submetendo os indivíduos a desafios comportamentais ou fisiológicos após a captura (Sheriff et al., 2011).

Um exemplo de desafio fisiológico realizado em estudos com roedores é o desafio hormonal, onde há diminuição artificial dos níveis plasmáticos de corticosterona, através da aplicação de Dexametasona (DXM), seguido pela simulação de estímulo estressor com a aplicação de ACTH (Amirat e Brudieux, 1993; Boonstra et al., 2001; Touma et al., 2004). A DXM inibe a secreção de GCs através de mecanismos de *feedback* negativo a nível cerebral (eixo HHA), causando redução do ACTH e consequente diminuição da secreção de corticosterona. A aplicação de ACTH por sua vez estimula a liberação de corticosterona pelas glândulas adrenais. Esta é uma maneira de acessar a sensibilidade do eixo HHA como uma medida de responsividade a estímulos agudos e imprevisíveis, mesmo que não haja uma relação direta entre o método de indução de estresse e os estímulos nocivos experimentados pelos animais em vida livre (Boonstra, 2005).

2. OBJETIVOS

Dentro desse contexto, este estudo teve por objetivo analisar a responsividade ao estresse em roedores da espécie *Akodon montensis*, previamente classificados como tolerantes ao processo de fragmentação (Pardini, 2004; Pardini et al., 2005; Pardini e Umetsu, 2006). Para tanto, os indivíduos foram submetidos a teste de desafio hormonal, que consiste na aplicação de DXM seguida de ACTH ou salina (grupo controle). O perfil de resposta foi obtido investigando-se os seguintes aspectos: hormonal (concentração plasmática de corticosterona), metabólico (taxa de consumo de oxigênio) e leucocitário (relação N:L). A obtenção destes dados representa um primeiro passo para o entendimento do perfil de resposta de *Akodon montensis* frente a estímulos estressores, contribuindo assim na investigação de fatores que devem ser considerados no quadro de sensibilidade diferencial à fragmentação (Hammond et al., 2015).

As seguintes hipóteses foram testadas:

- 1) A aplicação de desafio hormonal deve resultar na ativação do eixo HHA e consequente liberação de hormônios GCs, representada pelo aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona em relação aos níveis pré-estressores (após DXM) (Boonstra, 2005). Adicionalmente, a aplicação de ACTH deve gerar resposta de estresse mais acentuada em comparação à aplicação de solução salina (grupo controle).
- 2) O perfil leucocitário é considerado particularmente útil em estudos de fisiologia da conservação por sofrer alterações frente a estressores e relacionar-se diretamente aos níveis de GCs (Davis et al., 2008). Dessa forma esperamos que, após a aplicação de desafio hormonal, com o aumento da concentração plasmática de corticosterona, ocorra concomitante aumento da proporção N:L (Dhabhar et al. 1996; Dhabhar, 2002; Davis et al., 2008).
- 3) Por estarem envolvidos na regulação de disponibilização de energia, a liberação de hormônios GCs deve elevar a taxa metabólica intermediária, aumentando também o metabolismo geral do organismo e sua demanda energética (Durant et al., 2008). De acordo, o estressor imposto aos roedores deve gerar elevação da taxa metabólica quando comparados aos níveis pré-estressores e ao grupo controle.

- 4) O conceito de “condição”, o qual é geralmente baseado em medidas de massa e tamanho corpóreos, ocupa grande importância em estudos ecológicos, uma vez que se assume que animais em melhor condição são mais aptos a resistir a eventos ambientais adversos (Evans, 1969; Barnett et al., 2015). Indivíduos com melhor condição teriam portanto melhor estado geral e estariam mais capacitados a desempenhar uma resposta de estresse, o que se refletiria numa relação positiva entre o índice corpóreo e a responsividade ao estímulo estressor.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Espécie estudada, local de coleta e manutenção em cativeiro*

Akodon montensis são pequenos roedores terrestres (superfamília Muroidea, família Cricetidae, subfamília Sigmodontinae) (Musser e Carleton, 2008), de hábito noturno, insetívoro-onívoro (Bonvicino et al., 2008). Neste estudo os indivíduos foram coletados na Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG) (10870 ha) (23°39'-23°48' S, 47°01'-46°55' W) (Cotia - SP), em áreas contínuas de vegetação nativa de Floresta Atlântica em estágio médio e avançado de regeneração (Pinotti, 2010).

O clima na região é caracterizado como temperado quente e úmido (Köppen 1948), sem uma estação seca bem definida no inverno (Metzger et al., 2006). Apesar de haver uma sazonalidade na região, com diminuição na pluviosidade e nas temperaturas médias entre os meses de abril e agosto, não há déficit hídrico e as variações de precipitação não são suficientes para caracterizar um clima com estação seca marcada (Metzger et al., 2006). As temperaturas médias registradas nas áreas de coleta, através de carregadores de dados entre os anos de 2010 e 2014, foram de 20,72°C entre Setembro e Março (máxima de 37,63°C e mínima de 6,60°C) e 15,59°C entre Abril e Agosto (máxima de 34,17°C e mínima de 1,10°C). Informações adicionais sobre a área encontram-se descritas em Metzger e colaboradores (2006).

A coleta de roedores ocorreu ao longo dos anos de 2013 e 2014, em quatro expedições durante os meses de janeiro, fevereiro, abril e julho. O método de captura utilizado foi o uso de armadilhas *Sherman* (37,5 x 10 x 12 cm) e de interceptação e queda (*pitfalls*), com esforço amostral de aproximadamente 200 armadilhas por noite. Como o estado reprodutivo pode afetar a resposta ao desafio hormonal, características morfológicas como mamas visíveis, vagina aberta e testículos escrotados foram observadas, sendo mantidos em alojamento na cidade de Cotia (SP) machos e fêmeas adultos fora de período reprodutivo. Os animais foram mantidos em caixas de biotério individuais, com água e ração especial para *hamsters* fornecidas *ad libitum* [composição: grãos (soja, milho, arroz, amendoim), sementes (linhaça, girassol e abóbora), aveia descascada, frutas cristalizadas e ração extrusada].

3.2. *Desafio hormonal: tratamento exógeno com DXM e ACTH*

Os procedimentos experimentais foram realizados em laboratório montado em alojamento na cidade de Cotia (SP). Com a preocupação de não incorrerem em aumento da variabilidade de resposta associadas ao tempo de manutenção em cativeiro, padronizamos a realização dos experimentos um dia após a captura dos indivíduos. Adicionalmente, para minimizar o efeito da variação circadiana de GCs, os experimentos foram realizados no período da manhã. O protocolo experimental encontra-se descrito abaixo e exposto na Figura 1.

- a) Entre 6h e 8h da manhã, cada indivíduo recebeu dose única de DXM, um hormônio GC sintético, capaz de inibir a secreção de GCs (Decadron injetável 4mg/mL; dosagem 300 µg/100 g de massa corpórea). A substância foi diluída em solução salina e administrada via injeção intraperitoneal (IP), com volume total injetado de aproximadamente 23 µL.
- b) Após três horas, foi colhida amostra de sangue representativa da concentração de GCs após DXM (Romero et al., 2008), análoga a uma concentração basal em cativeiro (Boonstra, 2005).
- c) Os indivíduos foram então submetidos a tratamento de indução de estresse com dose única de ACTH (Sigma Aldrich A0298) (0,5 IU/100g de massa corpórea), suspenso em DMSO e diluído em solução salina, administrado via IP. Apesar de não haver uma única dose recomendada para todas as espécies de vertebrados, concentrações semelhantes foram utilizadas em outros estudos com pequenos mamíferos (Amirat e Bredeux, 1993; Boonstra et al., 2001; Touma et al., 2004). O volume total injetado foi de aproximadamente 30µL. O grupo controle recebeu apenas aplicação de solução salina, por mesma via e com mesmo volume.
- d) A fim de minimizar erros experimentais por excesso de manuseio dos animais, foi utilizado método de obtenção de amostras únicas após efeito estressor (Johnstone et al., 2012b), no qual cada indivíduo tinha seu sangue coletado 30 ou 60 minutos após o tratamento.

3.3. *Amostras sanguíneas*

As amostras de sangue foram obtidas do plexo retro orbital dos roedores, com a utilização de pipetas Pasteur (230 mm) previamente heparinizadas, com os animais imobilizados em tubos de PVC e anestesiados com Xylocaina 2% (uso tópico).

As amostras foram obtidas em média 3 minutos após a retirada dos animais de suas gaiolas. Após a coleta, as amostras (volume médio de 100 µL) foram imediatamente centrifugadas (5 minutos a 3000 rpm) e apenas o plasma conservado em tubos e galão criogênicos. Posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer -20°C, até serem analisadas.

3.4. *Perfil leucocitário*

Antes de centrifugar as amostras sanguíneas destinadas à dosagem hormonal, cerca de 10 µL de sangue foram utilizados para a realização de esfregaços. As lâminas foram fixadas em álcool metílico, armazenadas e posteriormente coradas com Guinsa (20%) por 20 minutos, para a contagem diferencial de leucócitos. Em cada esfregaço, cem leucócitos foram contados e classificados em neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos, através do uso de microscópio óptico Nikon 104c (aumento 100x). A proporção entre neutrófilos e linfócitos (N:L) foi calculada a partir da divisão entre os valores totais de neutrófilos e linfócitos encontrados em cada esfregaço.

Além da relação N:L, a fim de comparar a amplitude e direção de uma possível resposta leucocitária criamos a variável “variação na relação N:L”, obtida através da subtração entre a relação N:L após estressor (salina ou ACTH) e após DXM.

3.5. *Dosagem hormonal*

Já em laboratório na cidade de São Paulo, as amostras de plasma passaram por processo de extração com éter etílico (Mendonça et al., 1996). Resumidamente, foram adicionados 3 mL de éter etílico às amostras de plasma, sendo esta mistura agitada por 30 segundos e centrifugada a 4°C por 9 minutos a 1800 rpm. Os tubos de ensaio contendo as amostras foram então mantidos a -80°C por 10 minutos. A fase líquida foi transferida para novos tubos de ensaio, os quais foram mantidos em capela de exaustão de gases para evaporação do éter, por aproximadamente 48

horas. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em diluente (*Corticosterone Null Standard – IBL International RE52217*) e dosada concentração de corticosterona através de kits comerciais de imunoensaio enzimático, segundo orientações do fabricante (*IBL International RE52211*).

A média e desvio padrão do coeficiente de variação intra-ensaio foi de $2,57 \pm 2,91\%$ entre duplicatas e de $7,68 \pm 5,37\%$ entre diluições. Já o coeficiente de variação inter-ensaio, obtido pela repetição da dosagem de 7 amostras com intervalos de 8 à 28 dias, teve média e desvio padrão de $14,83 \pm 12,74\%$. Os coeficientes de variação inferiores a 20% indicam ser possível a dosagem de corticosterona nessa espécie através dos kits de imunoensaio enzimático utilizados.

Além dos valores absolutos de concentração plasmática de corticosterona, a fim de quantificar o escopo da resposta hormonal criamos a variável “amplitude da resposta hormonal”, obtida através da razão entre a concentração plasmática de corticosterona após estressor (salina ou ACTH) e após DXM.

3.6. *Respirometria*

Em conjunto ao protocolo de desafio hormonal, cada animal teve sua taxa metabólica estimada através da medida da taxa de consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) através de respirometria aberta. Estas medidas foram feitas em zona de termoneutralidade (30°C), em animais sob dieta restrita há no mínimo 12 horas. A média da massa corpórea dos animais, quantificada antes e depois das medidas metabólicas (balança eletrônica Ohaus, Modelo SP2001; capacidade 2000g, precisão 0,1 g), foi utilizada para os cálculos das taxas de consumo de oxigênio. A temperatura corpórea retal foi medida imediatamente após os experimentos (Thermocouple Cole Parmer 91100-20), a fim de certificar que a mesma se encontrava em faixa de temperatura normotérmica.

Para a medição do $\dot{V}O_2$, utilizamos sistema respirométrico que permitia a leitura sequencial de três animais. Para tanto, estes animais eram acondicionados em respirômetros de PVC (volume interno 400 mL), os quais eram então inseridos em gabinete tipo Peltier para controle da temperatura experimental. Uma bomba de vácuo (Gast, Modelo DOA-P161-AA) enviava ar (fluxo $> 2000 \text{ mL/min}$) para uma coluna de Drierite (remoção da água), e posteriormente para um sistema de manifold (Sable System MF-8, Las Vegas, NV, USA), ao qual era ajustado

manualmente para subdividir e direcionar simultaneamente um fluxo médio de 550 mL/min para cada respirômetro. As saídas de ar eram então conectadas a um multiplexer (Sable Systems Respirometer Multiplexer V2.0, Las Vegas, NV, USA), programado para direcionar o fluxo para outra coluna de Drierite, ligada a um fluxímetro (capacidade 3L/min, Sierra Instruments, Monterey, CA, USA) que realizava o registro do fluxo de saída de cada respirômetro. Após a leitura do fluxo, o ar era então sub-amostrado (PP-2 Dual Pump System V1.0, Sable System, Las Vegas, NV, USA) e uma alíquota de 100-150 mL/min era direcionada para um analisador de O₂ (Sable System FC-10, Las Vegas, NV, USA). Todos os equipamentos encontravam-se ligados a um conversor A/D (Sable System UI-2, Las Vegas, NV, USA) o qual, através de software (ExpeData versão Pro 1.3.2 - Sable Systems International), controlava qual respirômetro teria seu fluxo enviado, e por quanto tempo, ao analisador de O₂, além de registrar, armazenar e analisar os dados resultantes destas leituras.

Os experimentos duraram em média 12 horas, com quatro registros contínuos de 45 minutos por animal, referentes aos seguintes momentos: (a) 1h após DXM; (b) 30 ou 60 minutos após estressores (salina ou ACTH); (c) 3h após estressores; e (d) 6h após estressores. Um período de 5 a 10 minutos de traços estáveis de cada registro foi utilizado para o cálculo do VO₂ (mL O₂. g⁻¹. h⁻¹). Os valores de VO₂ foram calculados segundo equação de Respirometria, fornecida pelo próprio software, para configurações sem remoção de CO₂, onde o fluxímetro se encontra posterior às câmaras respirométricas ($VO_2 = (FiO_2 - FeO_2) * FR / (1 - FiO_2 * (1 - RQ))$). FiO₂ representa a fração de O₂ lida, FeO₂ a concentração de O₂ atmosférico (0,2095), FR o fluxo de ar lido (mL/min) e RQ o quociente respiratório, assumido como 0,80 (Gessaman e Nagy, 1988).

3.7. *Índice de condição corpórea*

O índice de condição corpórea (IMC) foi estimado através da regressão linear entre o comprimento do corpo (mm) (variável independente) e a massa corpórea (g) (variável dependente); os valores de resíduo dessa regressão foram então utilizados. Entre as abordagens indiretas para se medir condição em animais de vida livre, a abordagem residual ainda é considerada a forma mais confiável (Jakob et al. 1996; Schulte-Hostedde et al., 2001, 2005).

A fim de minimizar a manipulação dos indivíduos, o comprimento cabeça-corpo foi mensurado após término dos experimentos hormonais e metabólicos, enquanto os valores de

massa corpórea utilizados no cálculo referem-se à primeira pesagem dos animais, após chegada em alojamento.

4. ANÁLISE DE DADOS

A estatística descritiva completa foi realizada para as variáveis em machos e fêmeas de *Akodon montensis*, independente do período de coleta. Os dados experimentais foram transformados em $\log_{10}$ a fim de aumentar a normalidade para as análises estatísticas, com exceção das variáveis: 1) IMC e 2) variação na relação N:L, que apresentavam valores negativos e foram submetidas aos testes sem transformação.

A fim de verificar se os indivíduos apresentavam diferenças prévias aos tratamentos experimentais, realizamos teste de Kruskal-Wallis para os parâmetros massa corpórea, IMC, taxa metabólica após DXM, concentração plasmática de corticosterona após DXM e proporção N:L após DXM.

Para testar se houve efeito dos tratamentos (DXM seguido de ACTH e DXM seguido de salina), realizamos teste de Friedman para os dados de taxa metabólica e teste de Wilcoxon para as variáveis concentração plasmática de corticosterona e relação N:L. Já para verificar se houve diferença entre tratamentos: 1) Salina 30 minutos *versus* ACTH 30 minutos e 2) Salina 60 minutos *versus* ACTH 60 minutos, realizamos teste de Mann-Whitney.

Possíveis relações entre os dados foram investigadas através do teste de seleção de modelos lineares generalizados. Nesses testes, as variáveis proporção N:L, concentração plasmática de corticosterona e taxa metabólica foram utilizadas como variáveis dependentes, enquanto sexo e IMC foram inseridos como variáveis independentes. No caso de modelos de proporção N:L e metabolismo, a concentração de corticosterona foi adicionada às variáveis independentes, uma vez que estudos prévios têm encontrado relações significativas entre essas variáveis (Davis et al., 2008; Durant et al., 2008). Para a seleção de modelos foram utilizados os critérios de valor de $dAICc \leq 2,0$ juntamente com o maior valor de peso ($WAICc$) (Mazerolle, 2006).

Os modelos foram construídos conforme o exemplo a seguir, que examina relações entre a proporção N:L 30 minutos após aplicação de ACTH, sexo, IMC e parâmetros hormonais. Foram construídos neste caso seis modelos possíveis:

r1) $\phi \sim 1$ (Modelo nulo - A variável dependente não é explicada por nenhuma das variáveis testadas);

r2) $\phi \sim \text{Sexo}$ (A variável dependente é explicada pelo sexo dos indivíduos);

r2) $\varphi \sim \text{IMC}$ (A variável dependente é explicada pelo índice de condição corpórea);

r3) $\varphi \sim \text{Corticosterona após DXM}$ (A variável dependente é explicada pela concentração plasmática de corticosterona após aplicação de DXM, equivalente à concentração inicial, pré-estressores);

r4) $\varphi \sim \text{Corticosterona após tratamento}$ (A variável dependente é explicada pela concentração plasmática de corticosterona após a aplicação de ACTH);

r5) $\varphi \sim \text{Amplitude da resposta hormonal}$ (A variável dependente é explicada pela amplitude da resposta hormonal, isto é, pela razão entre os níveis plasmáticos de corticosterona antes e após tratamento estressor).

Os testes de seleção de modelos foram realizados no programa RStudio versão 0.97.551 (RStudio Inc. 2009-2012) e as demais análises realizadas no programa SPSS versão 13.0 (SPSS Inc. 1989-2004).

5. RESULTADOS

A estatística descritiva dos dados 30 minutos e 60 minutos após os animais serem submetidos aos tratamentos encontra-se nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Previamente à aplicação de salina ou ACTH, machos e fêmeas apresentaram diferenças no nível plasmático de corticosterona, com concentração hormonal 1,63 vezes superior em fêmeas ($P = 0,004$). As demais variáveis (massa corpórea, IMC, taxa metabólica após DXM e proporção N:L após DXM) não apresentaram diferenças entre os sexos ($P \geq 0,279$).

A aplicação de ACTH aumentou a concentração plasmática de corticosterona em relação aos valores observados após DXM. Em fêmeas esse aumento é significativo após 30 minutos ($Z = -2,366$, $P = 0,018$; Figura 2), enquanto em machos ocorre pico em 30 minutos, com valores ainda superiores após 60 minutos (ACTH 30': $Z = -2,666$, $P = 0,008$; ACTH 60': $Z = -2,201$, $P = 0,028$; Figura 3). Com a aplicação de salina, houve aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona apenas em machos, após 30 minutos ($Z = -2,201$, $P = 0,028$; Figura 3). Comparando-se os tratamentos salina *versus* ACTH observamos que 30 minutos após a aplicação indivíduos tratados com ACTH apresentaram maior amplitude de resposta hormonal, com valores 6,72 vezes maiores em fêmeas ($U \leq 0,001$, $P \leq 0,001$; Figura 4) e 5,92 vezes maiores em machos ($U \leq 0,001$, $P = 0,024$; Figura 4). Após 60 minutos não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

Dentro do intervalo amostrado, nenhum dos tratamentos afetou significativamente a proporção N:L (Machos: $P \geq 0,285$; Fêmeas: $P \geq 0,068$; Figura 5; Tabela 3) ou os valores de taxa metabólica (Machos: $P \geq 0,075$; Fêmeas: $P \geq 0,724$; Tabela 4).

Quanto à relação entre as variáveis morfológicas, sanguíneas e metabólicas, os modelos testados e selecionados encontram-se expostos nas tabelas 5, 6 e 7. Após aplicação de DXM, indivíduos com maior concentração plasmática de corticosterona apresentaram maior taxa metabólica (Figura 6) e maior proporção N:L (Figura 7). Durante a resposta ao desafio hormonal (grupo experimental ACTH 30 minutos), machos apresentaram maior amplitude de resposta em relação a fêmeas (Figura 4). A proporção N:L (Figura 8) e a variação na proporção N:L (Figura 9) apresentaram relação diretamente proporcional com a concentração plasmática de corticosterona inicial (após aplicação de DXM). Observamos também que indivíduos com maior

IMC apresentaram maiores níveis plasmáticos de corticosterona após a aplicação de ACTH (Figura 10) e indivíduos com maior amplitude de resposta hormonal apresentaram maior taxa metabólica (Figura 11). Durante todo o intervalo amostrado (30 minutos a 6 horas) há relação diretamente proporcional entre a taxa metabólica e níveis plasmáticos de corticosterona após o estressor (Figuras 12, 13 e 14).

6. DISCUSSÃO

6.1. Corticosterona

A corticosterona em níveis basais é envolvida principalmente na manutenção da homeostase em atividades diárias (Homberger et al., 2015). Enquanto para algumas espécies a concentração basal de corticosterona não varia significativamente entre gêneros (Kitaysky et al., 1999), para uma grande quantidade de espécies, fêmeas apresentam níveis basais mais elevados quando comparadas a machos, incluindo camundongos (Malisch et al., 2007), pardais (Astheimer et al., 1994), corujas (Wasser et al., 1997), pinguins (Ninnes et al., 2010) e pássaros mandarim (Khan e Robert, 2013). Desta forma, nossos resultados corroboram a tendência dominante, onde previamente aos tratamentos estressores, fêmeas apresentaram concentração plasmática de corticosterona em média 62,98% superior quando comparado a machos.

A secreção de GCs como uma medida da responsividade ao estresse vem sendo amplamente utilizada em estudos de ecologia e biologia da conservação para inferir a saúde ou bem-estar de uma população (Wingfield et al., 1997; Wasser et al., 1997; Janin et al., 2011). Altas concentrações de GCs após estímulos estressores não indicam necessariamente que um animal encontra-se em estado prejudicial de saúde; ao contrário, a capacidade de responder a estímulos nocivos através da secreção desses hormônios contribui para a sobrevivência (Romero, 2004). Estudos com diferentes espécies demonstram que sob uma situação de estresse crônico, pode ocorrer dessensibilização do eixo HHA e consequente baixa liberação de GCs frente a estressores, o que poderia prejudicar a capacidade de sobrevivência (Hopkins et al., 1999; Norris et al., 1999; Rich e Romero, 2005). Considerando que os indivíduos aqui testados não demonstraram resistência à DXM, isto é, apresentaram mecanismo eficiente de *feedback* negativo, e foram capazes de desempenhar resposta hormonal frente ao estímulo estressor, através do aumento da concentração de corticosterona, podemos sugerir que todos apresentavam-se saudáveis no que tange à integridade de seu eixo HHA.

Diferenças na amplitude de resposta hormonal entre o tratamento com ACTH e o grupo controle (salina) foram observadas em ambos os sexos 30 minutos após a aplicação. Ambos os sexos também apresentaram pico na concentração plasmática de corticosterona após 30 minutos

da aplicação do ACTH, com tendência de redução acentuada após este período. Tal resultado é condizente com o esperado para roedores, em que o pico de corticosterona após aplicação de ACTH encontra-se entre 30 e 60 minutos (Olfe et al., 2010; Vera et al., 2011). Em situações de vida livre, onde ameaças de vida são constantes, a ativação rápida e pronunciada do eixo HHA pode ser adaptativa. A iniciação rápida de uma resposta de estresse pode não apenas ajudar a entrar rapidamente em um estado emergencial de história de vida, mas também permite o término rápido da resposta fisiológica, através de *feedback* negativo após o término do estressor (Wingfield et al., 1998; Romero, 2012). Dessa forma, início e término rápidos podem representar uma estratégia eficiente de resposta de estresse (Romero, 2012).

Apesar das similaridades entre machos e fêmeas, observamos diferenças na magnitude da resposta de estresse, que sugerem a influência do sexo em *Akodon montensis*. Aparentemente fêmeas apresentam resposta mais intensa de estresse à manipulação, fazendo com que não haja diferença significativa entre a concentração plasmática de corticosterona nos tratamentos ACTH e salina após 30 minutos. Já os machos, apesar de também apresentarem resposta de estresse relacionada à contenção e obtenção de amostra sanguínea, apresentam um aumento mais pronunciado dos níveis plasmáticos de corticosterona em resposta à aplicação de ACTH. A menor concentração plasmática inicial de corticosterona, somada à resposta de estresse mais acentuada após ACTH, contribuem para que machos apresentem maior amplitude de resposta hormonal 30 minutos após a aplicação de ACTH, quando comparado a fêmeas.

Estudos com diferentes espécies demonstram ainda grande variabilidade intraespecífica na concentração plasmática de corticosterona tanto em níveis basais (Vleck et al., 2000; Cockrem and Silverin, 2002) quanto na magnitude da resposta de estresse (Koolhaas et al., 1999; Littin and Cockrem, 2001; Nilsson et al., 2008). Em *Akodon montensis* também observamos alta variabilidade intraespecífica, com a amplitude da resposta hormonal variando entre 42,15 e 279,83 vezes em machos e 20,04 e 133,52 vezes em fêmeas, dentro do mesmo grupo de tratamento (ACTH 30 minutos). Esta variabilidade interindividual pode ser um reflexo de uma alta flexibilidade fenotípica em indivíduos de *Akodon montensis*. Em ambientes alterados, onde a intensidade e a duração de condições favoráveis e desfavoráveis são instáveis, a flexibilidade fenotípica é considerada uma característica de alto valor adaptativo, pois permite que indivíduos ajustem seu fenótipo frente a mudanças imprevisíveis (Sultan e Spencer, 2002; Canale e Henry, 2010). Indivíduos com variação na sensibilidade do eixo HHA e consequente flexibilidade na

resposta de estresse poderiam apresentar, portanto, maior sobrevivência. Tal ideia é corroborada por Canale e Henry (2010), uma vez que espécies que evoluíram em ambientes com diferentes graus de heterogeneidade ambiental, como é o caso de *Akodon montensis*, podem apresentar maior resiliência a distúrbios por possuírem repertório de respostas fisiológicas mais plásticas do que espécies que evoluíram em ambientes homogêneos. Dessa forma, além da variabilidade de resposta entre diferentes espécies, estudos explorando a flexibilidade fenotípica de indivíduos frente a desafios ambientais podem contribuir para o entendimento dos mecanismos subjacentes à tolerância antrópica.

6.2. Perfil leucocitário

A maioria dos vertebrados apresenta cinco variações de leucócitos no sangue: linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos, sendo a proporção de cada tipo celular denominada perfil leucocitário. O perfil leucocitário basal varia consideravelmente entre grupos de vertebrados, com variações também significativas entre espécies de um mesmo grupo (Davis et al., 2008). Em mamíferos, neutrófilos e linfócitos representam aproximadamente 80% dos leucócitos (Davis et al., 2008), enquanto especificamente em camundongos de laboratório, linfócitos representam de 70 a 75% dos leucócitos, neutrófilos de 20 a 25%, monócitos de 2 a 6%, eosinófilos de 0 a 3% e basófilos representam menos de 0,1% (McGarry et al., 2009). Em *Akodon montensis* não obtivemos amostras sanguíneas equivalentes aos níveis basais de vida livre, porém, nas amostras pré-estressores (após aplicação de DXM) também observamos o predomínio de linfócitos (55,94%), seguido por neutrófilos (36,19%), eosinófilos (4,75%), basófilos (1,69%) e monócitos (1,44%).

Em uma resposta de estresse agudo, ocorrem alterações no perfil leucocitário devido ao processo de redistribuição de tipos celulares. Linfócitos aderem-se às células endoteliais, que delimitam as paredes dos vasos sanguíneos, e são levados da circulação para outros tecidos como linfonodos, baço e pele (linfopenia) (Fauci 1975; Dhabhar 2002; Davis et al., 2008). Por outro lado, GCs também estimulam o influxo de neutrófilos da medula óssea para a circulação sanguínea e diminuem sua saída para outros compartimentos (neutrofilia) (Bishop et al. 1968; Davis et al., 2008). Tais mudanças contribuem para que diferentes tipos celulares sejam transferidos a locais onde são mais necessários durante a resposta de estresse (Dhabhar et al.

1994, 1996; Davis et al., 2008). Nossa hipótese de trabalho postula que, uma vez que a secreção de corticosterona é estimulada pela aplicação de ACTH, deveríamos observar efeito desse aumento na concentração de GCs sobre o perfil leucocitário, com aumento da proporção N:L devido aos processos de neutrofilia e linfopenia. Contudo, em nosso estudo, não foram observadas alterações no perfil leucocitário em resposta a nenhum dos tratamentos (salina ou ACTH). Em vertebrados, a resposta leucocitária de estresse pode demorar de horas a dias, dependendo do grupo filogenético (ex: 2,5 horas em ratos de laboratório – Cox e Ford, 1982; 24 horas em javalis - Bilandzic *et al.* 2006). Como a magnitude do estressor aplicado foi suficiente para o aumento significativo da concentração plasmática de corticosterona, é possível que o curto intervalo de tempo amostrado (30 e 60 minutos) seja responsável pela falta de observação de mudanças hematológicas em *Akodon montensis*.

Por outro lado, previamente à aplicação de estressores, observamos relação positiva entre a proporção N:L e a concentração plasmática de corticosterona, condizente com o esperado (Davis et al., 2008). Após estressores, observamos também relação entre a concentração inicial de corticosterona e a amplitude da resposta leucocitária, isto é, indivíduos com maior concentração plasmática de corticosterona após DXM apresentaram maior aumento na relação N:L 30 minutos após a aplicação de ACTH. Este resultado pode estar relacionado à velocidade de resposta leucocitária, aparentemente maior em indivíduos com alta concentração plasmática de corticosterona. É possível que os processos de neutrofilia e linfopenia nesses indivíduos ocorram mais rapidamente devido sua concentração plasmática de corticosterona estar mais próxima de um nível crítico para resposta, porém, mais estudos são necessários para avaliar este processo e suas implicações.

6.3. *Metabolismo energético*

Estudos indicam que a elevação de GCs pode gerar efeitos significativos no metabolismo energético de diferentes animais, porém o consenso geral sobre os componentes e direção desse efeito se mantém incerto, principalmente devido variações nos métodos e dosagens empregadas (Durant et al., 2008). Enquanto aplicações exógenas de corticosterona aumentam a taxa metabólica basal em algumas espécies de pássaros (Hissa e Palokangas, 1970; Palokangas e Hissa, 1971), lagartos (Durant et al., 2008) e salamandras (Wack et al., 2012), outras espécies

não apresentam efeitos significativos (Hissa et al., 1980) ou apresentam alterações somente na taxa metabólica noturna (Buttemer et al., 1991; Astheimer et al., 1992). Nossa hipótese de trabalho baseia-se em resultados e discussão obtidos por Durant e colaboradores (2008), em que a aplicação exógena de corticosterona gerou aumento da concentração plasmática de corticosterona e da taxa metabólica, ambas dependentes da dose aplicada. Durant e colaboradores discutem que isso pode ser explicado pelos efeitos que GCs apresentam sobre a regulação do metabolismo intermediário, incluindo um intenso estímulo ao catabolismo de proteínas, lipólise e gliconeogênese (Dallman e Bhatnagar, 2001). Na ausência de mecanismos compensatórios, este efeito dos GCs poderia acarretar em um aumento detectável da taxa metabólica em nível de organismo. Considerando que neste estudo mensuramos a taxa metabólica dos indivíduos durante período inativo do seu ciclo circadiano e sob repouso, aumentos no metabolismo intermediário deveriam ser diretamente observados. No entanto, dentro do intervalo amostrado (30 minutos a 6 horas), não foram observadas alterações na taxa metabólica dos indivíduos, tanto no tratamento com salina quanto no tratamento com ACTH. É possível que o estímulo estressor representado por um único evento não seja suficiente para alterar significativamente a taxa metabólica dos indivíduos. Em estudo com camundongos, somente a repetição de estímulos estressores foi capaz de gerar alterações metabólicas e neuroendócrinas, associadas principalmente a um aumento da demanda energética e redução da tomada de alimentos (Depke et al., 2008).

Apesar da ausência de efeitos diretos do tratamento experimental, observamos relação positiva e prolongada entre os níveis plasmáticos de corticosterona e a taxa metabólica, desde o momento pré-estressores (após aplicação de DXM) até o término de nossas medidas (30 minutos a 6 horas após aplicação de ACTH). Esse resultado é semelhante ao encontrado por Durant e colaboradores, onde maiores concentrações plasmáticas de corticosterona refletiram em maiores requerimentos energéticos (maior taxa metabólica). Provavelmente devido à conexão entre os parâmetros “concentração plasmática de corticosterona” e “amplitude de resposta hormonal”, indivíduos com maior amplitude de resposta apresentaram também maior taxa metabólica.

Até que se realizem mais trabalhos explorando o perfil metabólico frente a estressores, os efeitos do metabolismo durante o estresse permanecem indefinidos. Além disso, novos estudos envolvendo a fisiologia do eixo HHA em espécies silvestres se faz necessário para o melhor

entendimento do papel dos GCs e para o esclarecimento dos custos do estresse para animais de vida livre.

6.4. *Índice de condição corpórea*

Em pequenos mamíferos o IMC representa um índice ecologicamente significativo que reflete, a curto prazo, o estado geral de um organismo com base em seus diferentes constituintes corpóreos (reserva energética, massa magra e estado de hidratação) (Schulte-Hostedde et al., 2001). Um exemplo bastante conhecido é a relação negativa entre condição corpórea e concentração plasmática de corticosterona em níveis basais (Kitaysky et al., 2001, 2010; Lynn et al., 2003b, 2010; Angelier et al., 2015; Homberger et al., 2015). Em nosso trabalho, não foi encontrada relação entre o IMC e os níveis plasmáticos de corticosterona pré-estressores, porém, é possível que a redução dos níveis plasmáticos de corticosterona via indução farmacológica (DXM) sobreponha-se a esses efeitos. Para concluirmos se tal relação inexistente em *Akodon montensis*, seria necessária dosagem de corticosterona em amostras de sangue representativas dos níveis basais em vida livre, ou seja, amostras obtidas em até três minutos após a retenção dos animais em armadilhas (Romero e Romero, 2002).

Estudos em estresse ambiental sugerem também que a modulação da resposta de estresse e o aumento da concentração plasmática de corticosterona encontram-se relacionados à condição corpórea de um indivíduo (Lynn et al., 2003a; Angelier et al., 2015). Dessa forma, esperávamos que indivíduos com melhor IMC, ou seja, melhor estado geral, apresentassem resposta mais eficiente frente a estímulo estressor, o que no caso de animais de vida livre significa uma resposta rápida e acentuada dos níveis plasmáticos de corticosterona (Wingfield et al., 1998; Landys et al., 2006; Homberger et al., 2015). Condizente com esta hipótese, observamos que 30 minutos após a aplicação de ACTH, indivíduos com melhor condição corpórea apresentaram maior concentração plasmática de corticosterona.

7. CONCLUSÕES

O teste de estimulação por ACTH em *Akodon montensis* representou um estressor fisiológico, promovendo aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona 30 minutos após o tratamento, como o esperado, com forte tendência à diminuição após este período. Apesar do tratamento com ACTH não afetar diretamente os aspectos metabólicos e leucocitários dentro do intervalo amostrado, os resultados sugerem a existência de uma relação entre a ativação do eixo HHA e estes parâmetros, sendo possível que efeitos ocorram em intervalos temporais mais tardios ou após a repetição de estímulos. A relação positiva, durante resposta de estresse, entre a concentração plasmática de corticosterona e o IMC, taxa metabólica e relação N:L, corrobora a hipótese de que estes parâmetros representam bons indicadores de estresse fisiológico.

A realização de novos experimentos, com a obtenção de maior número de indivíduos e maior intervalo de coleta de amostras, se faz necessário para mais inferências sobre o perfil hormonal, metabólico e leucocitário da espécie frente a estímulos estressores. Conhecimento importante para a compreensão de como animais de vida livre respondem aos desafios e mudanças ambientais.

8. FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Desenho experimental de desafio hormonal aplicado em machos e fêmeas de *Akodon montensis*.

Entre 6h e 8h da manhã, cada indivíduo recebeu dose única de DXM. Após três horas, foi colhida amostra de sangue análoga a uma concentração basal em cativeiro. Os indivíduos foram então submetidos a tratamento de indução de estresse com dose única de ACTH ou salina, no caso do grupo controle. Cada indivíduo teve seu sangue coletado 30 ou 60 minutos após os tratamentos.

Figura 2. Níveis plasmáticos de corticosterona (ng/mL) em fêmeas de *Akodon montensis* após aplicação de DXM e após aplicação de estressores (salina e ACTH) em dois horários distintos: 30 minutos e 60 minutos.

As barras representam a Média $\pm$ Desvio Padrão, com o tamanho amostral entre parênteses. A designação de letras “b” ou “a” representa respectivamente diferença significativa ($P < 0,05$) ou não entre a concentração plasmática de corticosterona após DXM e após tratamentos estressores.

Figura 3. Níveis plasmáticos de corticosterona (ng/mL) em machos de *Akodon montensis* após aplicação de DXM e após aplicação de estressores (salina e ACTH) em dois horários distintos: 30 minutos e 60 minutos.

As barras representam a Média $\pm$ Desvio Padrão, com o tamanho amostral entre parênteses. O símbolo “*” representa diferença significativa ($P < 0,05$) entre a concentração plasmática de corticosterona após tratamento com salina e ACTH, enquanto a designação de letras “b” ou “a” representa respectivamente diferença significativa ($P < 0,05$) ou não entre a concentração plasmática de corticosterona após DXM e após tratamentos estressores.

Figura 4. Amplitude da resposta hormonal em machos e fêmeas de *Akodon montensis* 30 minutos após aplicação de salina e ACTH.

As barras representam a Média $\pm$ Desvio Padrão, com o tamanho amostral entre parênteses. O símbolo “*” representa diferença significativa ($P < 0,05$).

Figura 5. Relação N:L em *Akodon montensis* após aplicação de DXM e após aplicação de estressores: 30 minutos após salina e 30 e 60 minutos após ACTH.

As barras representam a Média $\pm$ Desvio Padrão, com o tamanho amostral entre parênteses.

Figura 6. Relação entre taxa metabólica e concentração plasmática de corticosterona, ambas após aplicação de DXM. ($R^2 = 0,124$; $P = 0,038$).

Figura 7. Relação entre proporção N:L e concentração plasmática de corticosterona, ambas após aplicação de DXM. ($R^2 = 0,065$; $P = 0,198$).

Figura 8. Relação entre proporção N:L 30 minutos após aplicação de ACTH e concentração plasmática de corticosterona após aplicação de DXM. ($R^2 = 0,707$; $P < 0,001$).

Figura 9. Relação entre variação na proporção N:L 30 minutos após aplicação de ACTH e concentração plasmática de corticosterona após aplicação de DXM. ($R^2 = 0,841$; $P < 0,001$).

Figura 10. Relação entre concentração plasmática de corticosterona 30 minutos após aplicação de ACTH e IMC. ($R^2 = 0,145$; $P = 0,209$).

Figura 11. Relação entre taxa metabólica e amplitude da resposta hormonal, ambas 30 minutos após aplicação de ACTH. ($R^2 = 0,13$; $P = 0,762$).

Figura 12. Relação entre taxa metabólica e concentração plasmática de corticosterona, ambas 30 minutos após aplicação de ACTH. ($R^2 = 0,075$; $P = 0,482$).

Figura 13. Relação entre taxa metabólica 3h após aplicação de ACTH e concentração plasmática de corticosterona 30 minutos após aplicação de ACTH. ($R^2 = 0,165$; $P = 0,168$).

Figura 14. Relação entre taxa metabólica 6h após aplicação de ACTH e concentração plasmática de corticosterona 30 minutos após aplicação de ACTH. ($R^2 = 0,186$; $P = 0,239$).

Tabela 1. Estatística descritiva dos parâmetros avaliados em indivíduos de *Akodon montensis* 30 minutos após aplicação de salina e ACTH.

Grupo experimental	Parâmetros	Sexo	N	Mínimo	Máximo	Média ± Desvio Padrão
Salina 30 minutos	Massa corpórea (g)	Macho	6	19,50	39,70	30,25 ± 7,11
		Fêmea	5	18,70	33,20	26,82 ± 7,01
	IMC	Macho	5	-2,44	3,48	*
		Fêmea	5	-8,44	0,33	*
	Concentração CORT após DXM (ng/mL)	Macho	6	2,10	117,15	28,89 ± 44,41
		Fêmea	4	12,32	28,67	20,65 ± 7,96
	Concentração CORT após tratamento (ng/mL)	Macho	6	25,02	1102,12	356,35 ± 415,20
		Fêmea	4	69,76	1402,08	510,25 ± 620,95
	Amplitude da resposta hormonal	Macho	6	5,41	37,24	18,15 ± 11,08
		Fêmea	3	3,61	17,83	8,65 ± 7,96
	Relação N:L após DXM	Macho	4	0,30	1,43	0,80 ± 0,47
		Fêmea	4	0,12	2,07	1,11 ± 1,02
	Relação N:L após tratamento	Macho	6	0,38	1,76	0,83 ± 0,54
		Fêmea	5	0,61	1,64	1,22 ± 0,45
	Variação na relação N:L	Macho	4	-0,24	0,33	0,02 ± 0,24
		Fêmea	4	-0,52	1,08	0,20 ± 0,73
ACTH 30 minutos	Massa corpórea (g)	Macho	10	22,00	40,20	31,18 ± 5,94
		Fêmea	6	23,80	35,60	28,00 ± 5,19
	IMC	Macho	8	-2,96	6,14	*
		Fêmea	5	-2,35	5,45	*
	Concentração CORT após DXM (ng/mL)	Macho	9	5,59	24,82	12,83 ± 5,94
		Fêmea	6	16,19	68,77	27,32 ± 20,40
	Concentração CORT após tratamento (ng/mL)	Macho	10	452,40	1565,13	1116,31 ± 438,76
		Fêmea	6	324,47	2500,06	1338,75 ± 751,14
	Amplitude da resposta hormonal	Macho	9	42,15	279,83	107,39 ± 70,08
		Fêmea	6	20,04	133,52	58,16 ± 40,76
	Relação N:L após DXM	Macho	3	0,21	0,45	0,37 ± 0,14
		Fêmea	4	0,56	1,43	0,91 ± 0,38
	Relação N:L após tratamento	Macho	7	0,27	1,09	0,56 ± 0,31
		Fêmea	5	1,02	2,79	1,59 ± 0,70
	Variação na relação N:L	Macho	3	-0,11	0,38	0,17 ± 0,25
		Fêmea	4	0,57	1,36	0,82 ± 0,37

Tabela 2. Estatística descritiva dos parâmetros avaliados em indivíduos de *Akodon montensis* 60 minutos após aplicação de salina e ACTH.

Grupo experimental	Parâmetros	Sexo	N	Mínimo	Máximo	Média ± Desvio Padrão
Salina 60 minutos	Massa corpórea (g)	Macho	3	25,40	36,70	29,80 ± 6,05
		Fêmea	2	23,30	26,40	24,85 ± 2,19
	IMC	Macho	3	-2,52	3,96	*
		Fêmea	2	-4,71	-0,37	*
	Concentração CORT após DXM (ng/mL)	Macho	3	2,09	4,45	3,04 ± 1,24
		Fêmea	1	*	*	9,47
	Concentração CORT após tratamento (ng/mL)	Macho	3	361,90	602,40	467,02 ± 123,07
		Fêmea	2	324,80	685,45	505,13 ± 255,02
	Amplitude da resposta hormonal	Macho	3	81,41	232,61	174,50 ± 81,44
		Fêmea	1	*	*	34,3
	Relação N:L após DXM	Macho	0	*	*	*
		Fêmea	0	*	*	*
	Relação N:L após tratamento	Macho	3	0,55	2,20	1,42 ± 0,83
		Fêmea	2	1,28	1,39	1,33 ± 0,08
	Variação na relação N:L	Macho	0	*	*	*
		Fêmea	0	*	*	*
ACTH 60 minutos	Massa corpórea (g)	Macho	6	17,50	35,00	25,18 ± 6,87
		Fêmea	3	27,20	35,60	31,50 ± 4,20
	IMC	Macho	4	1,22	2,09	*
		Fêmea	1	0,91	*	*
	Concentração CORT após DXM (ng/mL)	Macho	6	2,32	101,85	22,84 ± 38,99
		Fêmea	3	11,69	85,13	52,50 ± 36,79
	Concentração CORT após tratamento (ng/mL)	Macho	6	317,50	669,11	459,93 ± 155,76
		Fêmea	3	357,50	1382,24	868,69 ± 512,37
	Amplitude da resposta hormonal	Macho	6	3,12	258,08	104,33 ± 101,74
		Fêmea	3	4,30	74,13	33,49 ± 36,29
	Relação N:L após DXM	Macho	1	*	*	0,46
		Fêmea	0	*	*	*
	Relação N:L após tratamento	Macho	3	0,42	1,14	0,72 ± 0,37
		Fêmea	1	*	*	0,85
	Variação na relação N:L	Macho	1	*	*	0,68
		Fêmea	0	*	*	*

Tabela 3. Média $\pm$ Desvio padrão da contagem diferencial de leucócitos (%) em *Akodon montensis*. Foram realizados esfregaços de sangue referentes aos momentos: 3 horas após aplicação de DXM e 30 e 60 minutos após aplicação de estressores (ACTH ou salina).

Grupo experimental	N	Tipos celulares	Mínimo	Máximo	Média $\pm$ Desvio padrão
DXM	16	Linfócito	30.00	86.00	55.94 $\pm$ 16.85
		Neutrófilo	10.00	62.00	36.19 $\pm$ 15.27
		Eosinófilo	2.00	10.00	4.75 $\pm$ 2.84
		Basófilo	0.00	8.00	1.69 $\pm$ 2.09
		Monócito	0.00	5.00	1.44 $\pm$ 1.21
Salina 30 minutos	12	Linfócito	33.00	66.00	46.50 $\pm$ 11.57
		Neutrófilo	25.00	60.00	42.92 $\pm$ 12.09
		Eosinófilo	3.00	14.00	7.00 $\pm$ 3.79
		Basófilo	0.00	5.00	2.17 $\pm$ 1.40
		Monócito	0.00	3.00	1.42 $\pm$ 1.16
ACTH 30 minutos	11	Linfócito	24.00	73.00	50.55 $\pm$ 15.43
		Neutrófilo	18.00	67.00	38.82 $\pm$ 15.75
		Eosinófilo	1.00	13.00	6.00 $\pm$ 3.49
		Basófilo	0.00	8.00	2.45 $\pm$ 2.54
		Monócito	0.00	5.00	2.18 $\pm$ 1.94
Salina 60 minutos	5	Linfócito	30.00	58.00	41.00 $\pm$ 10.30
		Neutrófilo	32.00	66.00	52.20 $\pm$ 12.72
		Eosinófilo	2.00	7.00	4.80 $\pm$ 2.28
		Basófilo	0.00	2.00	1.20 $\pm$ 0.84
		Monócito	0.00	2.00	0.80 $\pm$ 0.84
ACTH 60 minutos	5	Linfócito	43.00	66.00	54.20 $\pm$ 8.35
		Neutrófilo	28.00	49.00	38.60 $\pm$ 8.59
		Eosinófilo	1.00	12.00	4.20 $\pm$ 4.44
		Basófilo	0.00	1.00	0.60 $\pm$ 0.55
		Monócito	0.00	4.00	2.00 $\pm$ 1.58

Tabela 4. Média $\pm$ Desvio padrão da taxa metabólica (O_2 mL/g h) em indivíduos de *Akodon montensis*. Foram registrados os momentos: 1h após aplicação de DXM e 30 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas após aplicação de estressores (ACTH ou salina).

Grupo experimental	Sexo	DXM	30 minutos	1 hora	3horas	6horas
Salina	Macho	1,76 $\pm$ 0,91 (N=6)	1,66 $\pm$ 0,83 (N=4)	1,25 $\pm$ 0,61 (N=2)	1,25 $\pm$ 0,60 (N=6)	1,27 $\pm$ 0,42 (N=6)
	Fêmea	1,70 $\pm$ 0,38 (N=5)	1,75 $\pm$ 0,24 (N=5)	N=0	1,78 $\pm$ 0,83 (N=5)	1,52 $\pm$ 0,25 (N=5)
ACTH	Macho	1,77 $\pm$ 0,86 (N=11)	1,55 $\pm$ 0,53 (N=8)	1,43 $\pm$ 0,16 (N=3)	1,36 $\pm$ 0,47 (N=10)	1,46 $\pm$ 0,78 (N=10)
	Fêmea	1,98 $\pm$ 0,80 (N=5)	1,69 $\pm$ 0,81 (N=5)	N=0	1,67 $\pm$ 0,62 (N=5)	1,62 $\pm$ 0,57 (N=5)

Tabela 5. Estatística de Akaike para modelos de concentração plasmática de corticosterona, relação N:L e taxa metabólica após aplicação de DXM.

Os modelos selecionados encontram-se destacados em negrito.

Variável resposta	Modelos	AICc	gl	dAICc	WAICc
Corticosterona após DXM	~ Sexo	34,6	3	0,0	0,8182
	~ Modelo nulo	38,2	2	3,5	0,1410
	~ IMC	40,6	3	6,0	0,0409
Relação N:L após DXM	~ Modelo nulo	13,6	2	0,0	0,530
	~ Corticosterona após DXM	15,2	3	1,6	0,237
	~ Sexo	16,4	3	2,8	0,130
	~ IMC	16,9	3	3,3	0,103
Taxa metabólica após DXM	~ Modelo nulo	-6,6	2	0,0	0,407
	~ Corticosterona após DXM	-6,4	3	0,2	0,360
	~ IMC	-4,2	3	2,4	0,122
	~ Sexo	-4,0	3	2,6	0,110

AICc: Critério de Akaike para seleção de modelos com pequenas amostras; gl: graus de liberdade; dAICc: diferença de AICc entre qualquer modelo e o melhor modelo possível; WAICc: peso de cada modelo.

Tabela 6. Estatística de Akaike para modelos de concentração plasmática de corticosterona, amplitude da resposta hormonal e relação N:L 30 minutos após aplicação de ACTH.

Os modelos selecionados encontram-se destacados em negrito.

Variável resposta	Modelos	AIC	gl	dAICc	WAICc
Corticosterona 30 minutos após ACTH	~ Modelo nulo	4,2	2	0,0	0,598
	~ IMC	5,6	3	1,4	0,292
	~ Sexo	7,6	3	3,4	0,110
Amplitude da resposta hormonal	~ Modelo nulo	10,9	2	0,0	0,4716
	~ Sexo	11,0	3	0,1	0,4499
	~ IMC	14,5	3	3,6	0,0785
Relação N:L 30 minutos após ACTH	~ Corticosterona após DXM	0,0	3	0,0	0,84983
	~ Sexo	3,6	3	3,6	0,13871
	~ Amplitude da resposta hormonal	9,8	3	9,8	0,00649
	~ Modelo nulo	11,1	2	11,1	0,00338
	~ IMC	13,7	3	13,6	<0,001
	~ Corticosterona após ACTH	14,3	3	14,3	<0,001
Variação na relação N:L 30 minutos após ACTH	~ Corticosterona após DXM	-0,5	3	0,0	0,99337
	~ Amplitude da resposta hormonal	9,8	3	10,3	0,00584
	~ Modelo nulo	14,8	2	15,3	<0,001
	~ Sexo	15,9	3	16,4	<0,001
	~ IMC	21,5	3	21,9	<0,001
	~ Corticosterona após ACTH	21,5	3	21,9	<0,001

Tabela 7. Estatística de Akaike para modelos de taxa metabólica após aplicação de ACTH.

Os modelos selecionados encontram-se destacados em negrito.

Variável resposta	Modelos	AIC	gl	dAICc	WAICc
Taxa metabólica 30 minutos após aplicação de ACTH	~ Modelo nulo	-2,2	2	0,0	0,4145
	~ Corticoesterona após ACTH	-0,9	3	1,2	0,2232
	~ Amplitude da resposta hormonal	-0,2	3	2,0	0,1537
	~ Sexo	1,3	3	3,4	0,0739
	~ Corticoesterona após DXM	1,5	3	3,6	0,0674
	~ IMC	1,5	3	3,6	0,0673
Taxa metabólica 3h após aplicação de ACTH	~ Modelo nulo	- 0,7	2	0,0	0,3859
	~ Corticoesterona após ACTH	- 0,1	3	0,6	0,2889
	~ Amplitude da resposta hormonal	1,8	3	2,5	0,1114
	~ Sexo	2,2	3	2,9	0,0889
	~ Corticoesterona após DXM	2,9	3	3,6	0,0628
	~ IMC	2,9	3	3,7	0,0622
Taxa metabólica 6h após aplicação de ACTH	~ Modelo nulo	1,9	2	0,0	0,4129
	~ Corticoesterona após ACTH	2,7	3	0,8	0,2717
	~ Amplitude da resposta hormonal	4,8	3	2,9	0,0954
	~ Sexo	5,1	3	3,2	0,0819
	~ Corticoesterona após DXM	5,4	3	3,5	0,0711
	~ IMC	5,5	3	3,6	0,0671

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amirat, Z.; Brudieux, R. Cortisol response to ACTH in plasma and pituitary concentrations of ACTH in a desert rodent, the sand rat (*Psammomys obesus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 104 A, n° 1, p. 29-34, 1993.

Angelier, F.; Wingfield, J. C. Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: Theory, hypotheses and perspectives. **General and Comparative Endocrinology**, v. 190, p. 118-128, 2013.

Angelier, F.; Wingfield, J. C.; Parenteau, C.; Pellé, M.; Chastel, O. Does short-term fasting lead to stressed-out parents? A study of incubation commitment and the hormonal stress responses and recoveries in snow petrels. **Hormones and Behavior**, v. 67, p. 28-37, 2015.

Arlettaz, R.; Patthey, P.; Baltic, M.; Leu, T.; Schaub, M.; Palme, R.; Jenni-Eiermann, S. Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife. **Proceedings of the Royal Society B - Biological sciences**, v. 274, n° 1614, p. 1219-1224, 2007.

Astheimer, L.B.; Buttemer, W.A.; Wingfield, J. C. Interactions of corticosterone with feeding, activity, and metabolism in passerine birds. **Ornis Scandinavica**, v. 23, p. 355-365, 1992.

Astheimer, L. B.; Buttemer, W. A.; Wingfield, J. C. Gender and seasonal differences in the adrenocortical response to ACTH challenge in an arctic passerine *Zonotrichia leucophrys gambelii*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 94, p. 33-43, 1994.

Barnett, C. A.; Suzuki, T. N.; Sakaluk, S. K.; Thompson, C. F. Mass-based condition measures and their relationship with fitness: in what condition is condition? **Journal of Zoology**. (14 de janeiro de 2015). <DOI: 10.1111/jzo.12213>.

Bierregaard Jr., R. O.; Lovejoy, T. E.; Kapos, V.; Santos, A. A.; Hutchings, R. W. The Biological Dynamics of Tropical Rainforest Fragments. **American Institute of Biological Sciences BioScience**, v. 42, n° 11, p. 859-866, 1992.

Bilandzic, N.; Zuric, M.; Lojkic, M.; Simic, B.; Milic, D.; Barac, I. Cortisol and immune measures in boars exposed to 3-day administration of exogenous adrenocorticotrophic hormone. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 433-444, 2006.

Bishop, C. R.; Athens, J. W.; Boggs, D. R.; Warner, H. R.; Cartwrig, G.; Wintrobe, M. M., Leukokinetic Studies 13. A non-steady-state kinetic evaluation of mechanism of cortisone-induced granulocytosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 47, p. 249, 1968.

Bonvicino, C. R.; Oliveira, J. A.; D'andrea, P. S. **Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. 120p.

Boonstra, R.; Mccoll, C. J.; Karels, T. J. Reproduction at all costs: the adaptive stress response of male arctic ground squirrels. **Ecology**, v. 82, n° 7, p. 1930-1946, 2001.

Boonstra, R. Equipped for life: the adaptive role of the stress axis in male mammals. **Journal of Mammalogy**, v. 86, n° 2, p. 236-247, 2005.

Buttemer, W.A.; Astheimer, L. B.; Wingfield, J.C. The effect of corticosterone on standard metabolic rates of small passerines. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 161, p. 427-431, 1991.

Canale, C. I.; Henry, P. Y. Adaptive phenotypic plasticity and resilience of vertebrates to increasing climatic unpredictability. **Climate Research**, v. 43, p. 135-147, 2010.

Cockrem, J. F.; Silverin, B. Variation within and between birds in corticosterone responses of great tits (*Parus major*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, p. 197-206, 2002.

Cooke, S. J.; O'Connor, C. M. Making conservation physiology relevant to policy makers and conservation practitioners. **Conservation Letters**, v. 3, p. 59-166, 2010.

Cooke, S. J.; Sack, L.; Franklin, C. E.; Farrell, A. P.; Beardall, J.; Wikelski, M.; Chown, S. L. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. **Conservation Physiology**, v. 1, n° 1, p. 1-23, 2013.

Cox, J. H.; Ford, W. L. The migration of lymphocytes across specialized vascular endothelium 4: prednisolone acts at several points on the re-circulation pathways of lymphocytes. **Cellular Immunology**, v. 66, p. 407-422, 1982.

Dallman, M.F.; Bhatnagar, S. Chronic stress and energy balance: role of the hypothalamo-pituitary axis. Em: McEwen, B. S.; Goodman, H. M. (Eds.). **Handbook of Physiology Section 7: The Endocrine System, Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms**. Oxford University Press, New York, 2001. p. 179-210.

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

Delehanty, B.; Boonstra, R. Impact of live trapping on stress profiles of Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, p. 176-182, 2009.

Depke, M.; Fusch, G.; Domanska, G.; Geffers, R.; Volker, U.; Chuett, C.; Kiank, C. Hypermetabolic Syndrome as a Consequence of Repeated Psychological Stress in Mice. **Endocrinology**, v. 149, n^o 6, p. 2714-2723, 2008.

Dhabhar, F. S. A hassle a day may keep the doctor away: stress and the augmentation of immune function. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 556-564, 2002.

Dhabhar, F. S.; Miller, A. H.; Stein, M.; McEwen, B. S.; Spencer, R. L. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. **Brain Behavior and Immunity**, v. 8, p. 66-79, 1994.

Dhabhar, F. S.; Miller, A. H.; McEwen, B. S.; Spencer, R. L. Stress induced changes in blood leukocyte distribution – role of adrenal steroid hormones. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 1638-1644, 1996.

Durant, S. E.; Romero, L. M.; Talent, L. G.; Hopkins, W. A. Effect of exogenous corticosterone on respiration in a reptile. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, p. 126-133, 2008.

Ellis, R. D.; Mcwhorter, T. J.; Maron, M. Integrating landscape ecology and conservation physiology. **Landscape Ecology**, v. 27, p. 1-12, 2012.

Elith, J.; Leathwick, J. R. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 40, p. 677-697, 2009.

Evans, P. R. Winter fat deposition and overnight survival of yellow buntings (*Emberiza citronella* L.). **Journal of Animal Ecology**, v. 38, p. 415-423, 1969.

Fahrig, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 34, p. 487-515, 2003.

Fauci, A. S. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations 1. Redistribution of circulating T-lymphocytes and B lymphocytes to bone marrow. **Immunology**, v. 28, p. 669-680, 1975.

- Fischer, J.; Lindenmayer, D. B. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. **Global Ecology and Biogeography**, v. 16, p. 265-280, 2007.
- Fletcher, Q. E.; Boonstra, R. Impact of live trapping on the stress response of the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*). **Journal of Zoology**, v. 270, p. 473-478, 2006.
- Gascon, C.; Lovejoy, T. E.; Bierregaard, R. O.; Malcolm, J. R.; Stouffer, P. C.; Vasconcelos, H. L.; Laurance, W. F.; Zimmerman, B.; Tocher, M.; Borges, S. Matrix habitat and species richness in tropical forest remnants. **Biological Conservation**, v. 91, p. 223-229, 1999.
- Gessaman, J. A.; Nagy, K. A. Energy-metabolism: errors in gas exchange conversion factors. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 61, p. 507-513, 1988.
- Goymann, W.; Wingfield, J. C. Allostatic load, social status, and stress hormones — the costs of social status matter. **Animal Behaviour**, v. 67, p. 591-602, 2004.
- Hammond, T. T.; Palme, R.; Lacey, E. A. Contrasting stress responses of two co-occurring chipmunk species (*Tamias alpinus* and *T. speciosus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 211, p. 114-122, 2015.
- Hissa, R.; Palokangas, R. 1970. Thermoregulation in the titmouse (*Parus major L.*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 33, p. 941-953, 1970.
- Hissa, R.; George, J.C.; Saarela, S. Dose-related effects of noradrenaline and corticosterone on temperature regulation in the pigeon. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 65C, p. 25-32, 1980.
- Homberger, B.; Jenni-Eiermann, S.; Jenni, L. Distinct responses of baseline and stress-induced corticosterone levels to genetic and environmental factors. **General and Comparative Endocrinology**, v. 210, p. 46-54, 2015.
- Homyack, J. A. Evaluating habitat quality of vertebrates using conservation physiology tools. **Wildlife Research**, v. 37, p. 332-342, 2010.
- Hopkins, W. A.; Mendonça, M. T.; Congdon, J. D. Responsiveness of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in an amphibian (*Bufo terrestris*) exposed to coal combustion wastes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 122, p. 191-196, 1999.
- Jakob, E. M.; Marshall, S. D.; Uetz, G. W. Estimating fitness: a comparison of body condition indices. **Oikos**, v. 77, p. 61-67, 1996.

Janin, A.; Léna, J. P.; Joly, P. Beyond occurrence: Body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. **Biological Conservation**, v. 144, p. 1008-1016, 2011.

Johnstone, C. P.; Lill, A.; Reina, R. D. Does habitat fragmentation cause stress in the *Agile antechinus*? A haematological approach. **Journal of Comparative Physiology and Behaviour**, v. 182, p. 139-155, 2012a.

Johnstone, C. P.; Reina, R. D.; Lill, A. Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. **Journal of Comparative Physiology and Behaviour**, v. 182, p. 861-879, 2012b.

Khan, N.; Robert, K. Does sex matter? Differential responses to corticosterone administration in the zebra finch. **Zoology**, v. 116, n° 5, p. 293-299, 2013.

Kitaysky, A. S.; Wingfield, J. C.; Piatt, J. F. Dynamics of food availability, body condition and physiological stress response in breeding black-legged kittiwakes. **Functional Ecology**, v. 13, p. 577-584, 1999.

Kitaysky, A. S.; Kitaikaia, E. V.; Wingfield, J. C.; Piatt, J. F. Dietary restriction causes chronic elevation of corticosterone and enhances stress response in red-legged kittiwake chicks. **Journal of Comparative Physiology B – Biochemical, Systemic and Environmental Physiology**, v. 171, p. 701-709, 2001.

Kitaysky, A. S.; Piatt, J. F.; Hatch, S. A.; Kitaikaia, E. V.; Benowitz-Fredericks, Z. M.; Shultz, M. T.; Wingfield, J. C. Food availability and population processes: severity of nutritional stress during reproduction predicts survival of long-lived seabirds. **Functional Ecology**, v. 24, p. 625-637, 2010.

Koolhaas, J. M.; Korte, S. M.; De Boer, S. F.; Van Der Vegt, B. J.; Van Reenen, C. G.; Hopster, H.; De Jong, I. C.; Ruis, M. A. W.; Blokhuis, H. J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 925-935, 1999.

Köppen, W. **Climatologia**. Fondo de Cultural Económica, México. 1948.

Laurance, W. F.; Bierregaard, R. O. (Eds.). **Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities**. The University of Chicago Press, Chicago and London, 1997.

Landys, M. M.; Ramenofsky, M.; Wingfield, J. C. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 148, p. 132-149, 2006.

Littin, K. E.; Cockrem, J. F. Individual variation in corticosterone secretion in laying hens. **British Poultry Science**, v. 41, p. 536-546, 2001.

Lynn, S. E.; Hunt, K. E.; Wingfield, J. C. Ecological factors affecting the adrenocortical response to stress in chestnut-collared and McCown's longspurs (*Calcarius ornatus*, *Calcarius mccownii*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 76, p. 566-576, 2003a.

Lynn, S. E.; Breuner, C. W.; Wingfield, J. C. Short-term fasting affects locomotor activity, corticosterone and corticosterone binding globulin in a migratory songbird. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 150-157, 2003b.

Lynn, S. E.; Porter, A. J. Trapping initiates stress response in breeding and non-breeding house sparrows *Passer domesticus*: implications for using unmonitored traps in field studies. **Journal of Avian Biology**, v. 39, p. 87-94, 2008.

Lynn, S. E.; Stamps, T. B.; Barrington, W. T.; Weida, N.; Hudak, C.A. Food, stress and reproduction: Short-term fasting alters endocrine physiology and reproductive behavior in the zebra finch. **Hormones and Behavior**, v. 58, p. 214-222, 2010.

Malisch, J. L.; Saltzman, W.; Gomes, F. R.; Rezende, E. L.; Jeske, D. R.; Garland Jr., T. Baseline and Stress-Induced Plasma Corticosterone Concentrations of Mice Selectively Bred for High Voluntary Wheel Running. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 80, n° 1, p. 146-156, 2007.

Mazerolle, M. J. Improving data analysis in herpetology: using Akaike's Information Criterion (AIC) to assess the strength of biological hypotheses. **Amphibia-Reptilia**, v. 27, p. 169-180, 2006.

Mazerolle, D. F.; Villard, M. Patch characteristics and landscape context as predictors of species presence and abundance: a review. **Ecoscience**, v. 6, p. 117-124, 1999.

McEwen, B. S.; Wingfield, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 2-15, 2003.

McGarry, M. P.; Protheroe, C. A.; Lee, J. J. **Mouse Hematology: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2009.

McLaren, G. W.; Macdonald, D. W.; Georgiou, C.; Mathews, F.; Newman, C.; Mian, R. Leukocyte coping capacity: a novel technique for measuring the stress response in vertebrates. **Experimental Physiology**, v. 88, p. 541-546, 2003.

Mendonça, M. T.; Chernetsby, S. D.; Nester, K. E.; Gardner, G. L. Effects of sex steroids on sexual behavior in the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. **Hormones and Behavior**, v. 30, p. 153-161, 1996.

Metzger, J. P.; Alves, L. F.; Goulart, W.; Teixeira, A. M. G.; Simões, S. J. C.; Eduardo Luís Martins Catharino, E. L. M. Uma área de relevante interesse biológico, porém pouco conhecida: a Reserva Florestal do Morro Grande. **Biota Neotropica**, v. 6, nº 2, 2006. <<http://www.biotaneotropica.org.br/v6n2/pt/abstract?article+bn00206022006>>

Mullner, A.; Linsenmair, K. E.; Wikelski, M. Exposure to ecotourism reduces survival and affects stress response in hoatzin chicks (*Opisthocomus hoazin*). **Biological Conservation**, v. 118, p. 549-558. 2004.

Musser, G. G.; Carleton, M. D. Superfamily Muroidea. Em: Wilson D. E.; Reeder D. M. (Eds). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3^a ed. Baltimore (MD): The John Hopkins University Press, 2008. p. 894-1531.

Palokangas, R.; Hissa, R. Thermoregulation in young black-headed gull (*Larus ridibundus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 38A, p. 743-750, 1971.

Nilsson, P. B.; Hollmén, T. E.; Atkinson, S.; Mashburn, K. L.; Tuomi, P. A.; Esler, D.; Mulcahy, D. M.; Rizzolo, D. J. Effects of ACTH, capture, and short term confinement on glucocorticoid concentrations in harlequin ducks (*Histrionicus histrionicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 149, p. 275-283, 2008.

Ninnes, C.; Waas, J.; Ling, N.; Nakagawa, S.; Banks, J.; Bell, D.; Bright, A.; Carey, P.; Chandler, J.; Hudson, Q.; Ingram, J.; Lyall, K.; Morgan, D.; Stevens, M.; Wallace, J.; Möstl, E. Comparing plasma and faecal measures of steroid hormones in Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*). **Journal of Comparative Physiology B – Biochemical, Systemic and Environmental Physiology**, v. 180, p. 83-94, 2010.

Norris, D. O.; Donahue, S.; Does, R. M.; Lee, J. K.; Maldonado, T. A.; Ruth, T.; Woodling, J. D. Impaired Adrenocortical response to stress by brown trout, *Salmo trutta*, living in metal-contaminated waters of the Eagle River, Colorado. **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, nº 1, p. 1-8, 1999.

Olfe, J.; Domanska, G.; Schuett, C.; Kiank, C. Different stress-related phenotypes of BALB/c mice from in-house or vendor: alterations of the sympathetic and HPA axis responsiveness. **BMC Physiology**, v. 10, n° 2, p. 1-11, 2010.

Olifiers, N.; Gentile, R.; Fizon, J. T. Relation between small-mammal species composition and anthropic variables in the Brazilian atlantic forest. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n° 3, p. 495-501, 2005.

Paglia, A. P.; Fernandez, F. A. S.; Marco-Junior, P. Efeitos da fragmentação de habitats: quantas espécies, quantas populações, quantos indivíduos, e serão eles suficientes? Em: Da Rocha, C. F. D.; Bergallo, H. G.; Alves, M. A. S.; Sluys, M. V. (Orgs.). **Biologia da conservação: essências**. 1ª ed. São Carlos: Editora Rima, 2006. Cap. 12, p. 281-316.

Pardini, R. Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. **Biodiversity and Conservation**, v. 13, p. 2567-2586, 2004.

Pardini, R.; Souza, S. M.; Braga-Neto, R.; Metzger, J. P. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. **Biological Conservation**, v. 124, p. 253-266, 2005.

Pardini, R.; Umetsu, F. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande – distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, v. 6, n° 2, p. 1-22, 2006.

Pinotti, B. T. **Pequenos mamíferos terrestres e a regeneração da Mata Atlântica: influência da estrutura do habitat e da disponibilidade de alimento na recuperação da fauna**. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

Püttker, T.; Meyer-Lucht, Y.; Sommer, S. Fragmentation effects on population density of three rodent species in secondary Atlantic Rainforest, Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 43, n° 1, p. 11-18, 2008a.

Püttker, T.; Pardini, R.; Meyer-Lucht, Y.; Sommer, S. Responses of five small mammal species to micro-scale variations in vegetation structure in secondary Atlantic Forest remnants, Brazil. **BMC Ecology**, v. 8, n° 9, p. 1-10, 2008b.

Reeder, D. M.; Kramer, K. M. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology and natural history. **Journal of mammalogy**, v. 86, n° 2, p. 225-235, 2005.

Rich, E. L.; Romero, L. M. Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. **The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, p. 1628-1636, 2005.

Romero, L. M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, p. 249-255, 2004.

Romero, L. M. Using the reactive scope model to understand why stress physiology predicts survival during starvation in Galápagos marine iguanas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 176, p. 296-299, 2012.

Romero, L. M.; Romero, R. C. Corticosterone responses in wild birds: the importance of rapid initial sampling. **The Condor**, v. 104, n° 1, p. 129-135, 2002.

Romero, L. M.; Reed, J. M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 140, p. 73-79, 2005.

Romero, L. M.; Meister, C. J.; Cyr, N. E.; Kenagy, G. J.; Wingfield, J. C. Seasonal glucocorticoid responses to capture in wild free-living mammals. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, p. 614-622, 2008.

Romero, L. M.; Dickens, Cyr, N. E. The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. **Hormones and Behavior**, v. 55, p. 375-389, 2009.

Sapolsky, R. M.; Romero, L. M.; Muck, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrinology Review**, v. 21, p. 55-89, 2000.

Schulte-Hostedde, A. I.; Millar, J. S.; Hickling, G. J. Evaluating body condition in small mammals. **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, p. 1021-1029, 2001.

Schulte-Hostedde, A. I., Zinner, B.; Millar, J. S.; Graham J. H. Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. **Ecology**, v. 86, n° 1, p. 155-163, 2005.

Sheriff, M. J.; Dantzer, B.; Delehanty, B.; Palme, R.; Boonstra, R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. **Oecologia**, v. 166, p. 869-887, 2011.

Sultan, S. E.; Spencer, H. G. Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. **The American Naturalist**, v. 160, p. 271-283, 2002.

Suorsa, P.; Helle, H.; Koivunen, V.; Huhta, E.; Nikula, A.; Hakkarainen, H. Effects of forest patch size on physiological stress and immunocompetence in an area-sensitive passerine, the

Eurasian treecreeper (*Certhia familiaris*): an experiment. **Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences**, v. 271, n° 1537, p. 435-440, 2004.

Touma, C.; Palme, R.; Sachser, N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. **Hormones and Behavior**, v. 45, p. 10-22, 2004.

Touma, C.; Palme, R. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1046, p. 54-74, 2005.

Umetsu, F.; Pardini, R. Small mammals in a mosaic of forest remnants and anthropogenic habitats — evaluating matrix quality in an Atlantic forest landscape. **Landscape Ecology**, v. 22, n° 4, p. 517-530, 2007.

Vera, F.; Antenucci, C. D.; Zenuto, R. R. Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, p. 550-557, 2011.

Vieira, M. V.; Olifiers, N.; Delciellos, A. C.; Antunes, V. Z.; Bernardo, L. R.; Grelle, C. E. V.; Cerqueira, R. Land use vs. fragment size and isolation as determinants of small mammal composition and richness in Atlantic Forest remnants. **Biological Conservation**, v. 142, n° 6, p. 1191-1200, 2009.

Viveiros de Castro, E. B. V.; Fernandez, F. A. S. Determinants of differential extinction vulnerabilities of small mammals in Atlantic forest fragments in Brazil. **Biological Conservation**, v. 119, p. 73-80, 2004.

Vleck, C. M.; Vertalino, N.; Vleck, D.; Bucher, T. L. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adélie penguins. **Condor**, v. 102, p. 392-400, 2000.

Wack, C. L.; Durant, S. E.; Hopkins, W. A.; Lovern, M. B.; Feldhoff, R. C.; Woodley, S. K. Elevated plasma corticosterone increases metabolic rate in a terrestrial salamander. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 161, p. 153-158, 2012.

Wasser, S. K.; Bevis, K.; King, G.; Hanson, E. Noninvasive physiological measure of disturbance in the Northern spotted owl. **Conservation Biology**, v. 11, p. 1019-1022, 1997.

Wikelski, M.; Cooke, S. J. Conservation physiology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n° 2, p. 38-46, 2006.

Wingfield, J. C.; Hunt, K.; Breuner, C.; Dunlap, K.; Fowler, G. S.; Freed, L.; Lepson, J. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: Clemmons, J. R., Buchholz, R. (eds). **Behavioral approaches to conservation in the wild**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 95-131, 1997.

Wingfield, J. C.; Maney, D. L.; Breuner, C. W.; Jacobs, J. D.; Lynn, S.; Ramenofsky, M.; Richardson, R. D. Ecological Bases of Hormone-Behavior Interactions: The "Emergency Life History Stage". **American Zoology**, v. 38, p. 191-206, 1998.

Wingfield, J. C. Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. **Functional Ecology**, v. 27, p. 37-44, 2013.