The background of the cover is a faded, grayscale photograph of a Caatinga landscape. In the foreground, there are large, light-colored rocks and several tall, columnar cacti. In the middle ground, there is a body of water, possibly a pond or a small lake, surrounded by low-lying vegetation. The sky is a uniform light gray.

Carla Bonetti Madelaire

**Relação sazonal entre reprodução, imunidade
e ocorrência de endoparasitas em anfíbios
anuros da Caatinga**

**São Paulo
2012**

Carla Bonetti Madelaire

**Relação sazonal entre reprodução, imunidade e
ocorrência de endoparasitas em anfíbios anuros
da Caatinga**

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

Orientador(a): Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Madelaire, Carla Bonetti

Relação sazonal entre reprodução, imunidade e ocorrência de endoparasitas em anfíbios anuros da Caatinga. **89p.**

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

1. Parasitismo 2. Anuros 3. Fisiologia reprodutiva
4. Perfil leucocitário I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes

Orientador

Dedico este trabalho:

aos meus avós Amália e Elvio Madelaire

"I do not know what I may appear to the world, but to myself I seem to have been only like a boy playing on the sea-shore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me"

Issac Newton

Agradecimentos

ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes, por todo apoio, calma, paciência, incentivo, conselhos, compreensão e presença constante no meu processo de formação.

a todos integrantes da Fazenda São Miguel, em especial, "Seu" Assis e "Dona" Neci, pela calorosa recepção e apoio no trabalho de campo.

ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, em especial Prof. Reinaldo José da Silva, pelo apoio e disponibilização de infraestrutura.

ao Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, em especial Renato Honji e Aline Gomes, pela ajuda, apoio e disponibilização de infraestrutura.

a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio pesquisa e bolsa concedidos para este estudo (2010/52290-4 e 2011/03030-2).

a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no primeiro ano do meu mestrado.

a Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA) pela licença concedida para realização do projeto - Protocolo 140/2011.

ao Ministério do Meio Ambiente, ICMBio, SISBio e Prof. Dr. Carlos Arturo Navas pela licença de coleta concedida - Número 3747-1.

ao Instituto de Biociências, Depto de Fisiologia e Programa de pós-graduação em Ciências (Fisiologia) da Universidade de São Paulo, pela disponibilização da infraestrutura e por terem me recebido como aluna.

aos meus companheiros de laboratório: Zuza (Braz), Popetar (Eduardo), Letícia, Stefanny, Foguin (Vânia), Adriana, Maya, Jessyca, Clara e Eduardo (técnico) pela amizade, convivência, discussões científicas, ajuda e apoio.

a todos integrantes do Laboratório de Ecofisiologia e Fisiologia Evolutiva, em especial Agustín Camacho e Renata Brandt, pela amizade, convivência, discussões científicas e apoio.

a todos os integrantes do XX Curso de Campo - Ecologia da Floresta Amazônica, que contribuíram para minha formação pessoal e profissional de uma maneira marcante e inesquecível.

a todos os integrantes das comissões de curso de inverno (2011 e 2012) que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

aos meus colegas de departamento que em algum momento contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

as minhas companheiras de casa (ex e atuais): Letícia, Bia, Juciane e Paola, pela amizade, apoio e compreensão.

aos meus amigos: Camilla Pagotto, Vitor Menezes, Marcela Agudo (Pinóia), Alessandra Carneiro (Ale), Geiza Monteiro (Minhoca), Helena Schwartz (Orkute), Hélen Nomura (Voodoo), Tatiana Alvarez (Origami) e Raquel de Arruda (Babusk) que me deram todo apoio, carinho, atenção e compreensão que precisei para continuar e terminar esta jornada.

em especial agradeço a minha família: meus avós (Amália e Elvio), meu pai (Humberto), minha tias Carolina e Belinda, meus primos Yasmeen, Gabriel, Nicole e Raissa pelo amor e apoio incondicionais que me dedicaram.

Índice

Capítulo 1. Helmintofauna de três espécies de anuros em diferentes períodos do ciclo reprodutivo no semi-árido caatinga, Rio Grande do Norte, Brasil. _____ 1

Resumo _____ 2

Abstract _____ 3

Introdução _____ 4

Materiais e Métodos _____ 6

Espécies incluídas e sítio de estudo _____ 6

Método de campo _____ 6

Identificação e análise ecológica dos helmintos _____ 7

Análise ecológica _____ 8

Análise estatística _____ 8

Resultados _____ 10

Discussão _____ 12

Referências _____ 16

Tabelas e figuras _____ 19

Capítulo 2. Relações entre parasitismo e variáveis morfológicas e fisiológicas em diferentes fases do ciclo reprodutivo de anfíbios anuros da Caatinga. _____ 28

Resumo _____ 29

Abstract _____ 30

Introdução _____ 31

Materiais e Métodos _____ 35

Espécies incluídas e sítio de estudo _____ 35

<i>Método de campo</i>	35
<i>Análise em laboratório</i>	36
Contagem e classificação de leucócitos e volume globular	36
Histologia dos testículos	37
<i>Análise dos dados</i>	37
Resultados	40
Discussão	42
<i>Relações das variáveis morfológicas e imunológicas nas diferentes fases do ciclo reprodutivo</i>	42
<i>Relações das variáveis morfológicas e sanguíneas com a intensidade parasitária</i>	47
Referências	51
Tabelas	60
Figuras	66
Considerações finais	78

CAPÍTULO 1**HELMINTOFAUNA DE TRÊS ESPÉCIES DE ANUROS EM DIFERENTES
PERÍODOS DO CICLO REPRODUTIVO NO SEMI-ÁRIDO CAATINGA, RIO
GRANDE DO NORTE, BRASIL**

Resumo

O semi-árido Caatinga é caracterizado por altas temperaturas e chuvas sazonais que determinam o padrão reprodutivo de anfíbios anuros. Algumas espécies, como *Pleurodema diplolister*, estiveram durante o período da seca e outras, como *Rhinella jimi* e *R. granulosa*, mantêm atividade de forrageamento neste período. Os diferentes padrões de atividade exibidos por essas espécies no período da seca, e a agregação de indivíduos em corpos d'água durante a temporada reprodutiva poderiam ser fatores que influenciam a prevalência e intensidade de infecção de endoparasitas. A helmintofauna dessas três espécies de anuros foi descrita e comparada em diferentes períodos do ciclo reprodutivo (A) durante a seca, (B) durante as chuvas, quando os machos estão vocalizando e (C) no intervalo entre as chuvas durante o período reprodutivo. Não houve diferenças entre os períodos para prevalência e intensidade de infecção de parasitas totais nas espécies do gênero *Rhinella*. Possivelmente a pressão por parte dos parasitas seja constante ao longo do ano, ou os animais apresentem ajustes fisiológicos para lidar com a maior pressão por parte dos parasitas durante a temporada reprodutiva. Os indivíduos de *P. diplolister* apresentaram maior prevalência e abundância média de parasitas no período de estivação e apenas um indivíduo apresentou um helminto durante o período de chuvas, isso pode ser considerado uma possível evidência de que apenas indivíduos livres de parasitas apresentariam condições para se reproduzir no período pós-estivação. *Rhinella jimi* e *R. granulosa* apresentaram maiores prevalências e intensidade de infecção quando comparados com *P. diplolister*, essa diferença pode ser devido aos diferentes padrões de atividade, ou devido à distância filogenética entre as espécies. O presente estudo representa registros inéditos de helmintofauna para as espécies estudadas e contribui para o inventário da helmintofauna dos anuros brasileiros e distribuição geográfica dessas espécies de parasitas.

Abstract

The semi-arid Caatinga is an environment characterized by high temperatures and unpredictable seasonal rains that determine the breeding season of anurans. Caatinga anurans deal with the dry season in different ways, while *Pleurodema diplolister* aestivate borrowed, *Rhinella granulosa* and *R. jimi* remain foraging around permanent lakes and the three species stay aggregated in pounds and lakes during the breeding. These activity partners could affect the parasitological parameters. In this way, this is a very interesting model for comparative studies of the seasonal variation of prevalence, mean intensity and mean abundance of infection. We collected males from these three species during the periods: (A) dry season, (B) during the rainfall, when males are calling, and (C) in the interval between rainfalls, when males are foraging within the reproductive season. Parasitological parameters for total parasites did not differ between periods for *Rhinella* species. This result indicated that parasite pressure could be constant through the year or animals had physiological adjustments to deal with higher parasite pressure during breeding season. In the other hand, *P. diplolister* presented higher prevalence and mean abundance of total parasites during the aestivation, and during the rain period only an animal presented one parasite. These results could be considered as an evidence of negative effect caused by parasites during aestivating period. Possible indicated that only free parasite individuals could be able to emerge and reproduce. *Rhinella* species presented higher prevalence and mean intensity of infection than *P. diplolister*. This difference could be attributed to different activity patters during the dry period or due to phylogenetic distance between them. This study presented new records of endoparasites for these species and contributed to knowledge and geographic distribution of parasites anuran species.

Introdução

A caatinga é um domínio morfoclimático brasileiro que ocupa uma área de 800.000km² e é caracterizado por altas temperaturas e chuvas sazonais. Este ambiente apresenta uma herpetofauna abundante (Trefaut, 2003), no entanto a helmintofauna dessas espécies é pouco conhecida. Há apenas registros de helmintofauna de espécies de lagartos (Almeida *et al.* 2008a, Almeida *et al.* 2008b) e nenhum registro publicado sobre helmintofauna de anfíbios.

As limitadas chuvas que ocorrem sazonalmente na caatinga determinam o padrão reprodutivo dos anfíbios anuros (Abe, 1995). Durante a estação seca, os indivíduos apresentam ajustes fisiológicos e comportamentais às altas temperaturas e escassez de água superficial. Algumas espécies, como *Pleurodema diplolister* e *Proceratophrys cristiceps*, estavam enterrando-se em solos próximos a fontes de água subterrânea, conhecidas localmente como cacimbas (Pereira, 2009). Por outro lado, *Rhinella jimi* e *R. granulosa* permanecem em atividade, se alimentando e utilizando corpos de água permanentes para hidratação (C.B.M. - observação pessoal). Estas diferenças interespecíficas em manutenção de atividade durante o período de seca, na Caatinga, apresentam um interessante sistema para o estudo da variação anual em prevalência e intensidade de infecção parasitária. Espera-se que durante a época reprodutiva, os animais apresentem maiores prevalências e intensidade de infecção parasitária devido a maiores níveis de atividade e agregação em corpos d'água em que os indivíduos ficam mais expostos a contato e ingestão de larvas e ovos (Poulin e Morand, 2000). Entretanto, como as vias de infecção por parasitas continuam ativas

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

durante a seca para as espécies que permanecem em atividade de forrageamento, espera-se que estas espécies apresentem diferenças menos marcantes em prevalência, intensidade de infecção e número de espécies de parasitas entre as diferentes fases do ciclo reprodutivo, quando comparadas com as espécies estivadoras.

Os objetivos deste estudo são: (1) descrever a helmintofauna que ocorre nessas três espécies de anuros; (2) comparar os padrões de prevalência, intensidade média de infecção, e abundância média de infecção nas espécies estudadas e nos seguintes períodos: (A) durante a seca, fora do período reprodutivo; (B) durante as chuvas, quando os machos estão dentro do período reprodutivo e apresentando atividade vocal, e (C) no intervalo entre as chuvas durante o período reprodutivo, quando os machos interrompem a atividade vocal e permanecem em atividade de forrageamento.

Materiais e métodos

Espécies incluídas e sítio de estudo

Foram coletados machos de três espécies de anuros que ocorrem simpatricamente no Município de Angicos (RN), no bioma da Caatinga: 41 indivíduos de *Pleurodema diplolistris* (Leiuperidae/Anura) (Figura 1), que apresenta comportamento de estivação fora da temporada reprodutiva; e 47 indivíduos de *Rhinella jimi* (Figura 2) e 59 indivíduos de *R. granulosa* (Figura 3) (Bufonidae/Anura), que permanecem em atividade de forrageio fora da temporada reprodutiva, nesta localidade. As coletas ocorreram ao longo do ano de 2011, em três diferentes períodos: (A) durante a temporada reprodutiva, em um período entre dois surtos reprodutivos de 11 a 21 de janeiro (período entre chuvas); (B) durante um surto reprodutivo que acompanhou um evento de chuvas de 22 a 24 de janeiro (período de chuva), e (C) no período da seca, de 6 a 17 de outubro. Os indivíduos de *R. jimi* e *R. granulosa* foram coletados nos três períodos acima descritos, enquanto os indivíduos de *P. diplolistris* foram coletados apenas nos períodos de chuvas e de seca. Todas as coletas foram realizadas na Fazenda São Miguel, Angicos, RN (5°30'43"S. 36°36'18"W) (Figura 4).

Método de campo

Os animais capturados foram identificados e mantidos em recipientes plásticos individualizados. No dia seguinte, os animais foram pesados (0,01g), mortos com uma injeção intraperitonal (75mg/kg) de solução de tiopental sódico (25mg/mL) (Thiopentax®) e, em seguida, todos os órgãos internos e a cavidade celomática foram

CAPÍTULO 1 - MATERIAIS E MÉTODOS

avaliados quanto à presença de helmintos. Os helmintos encontrados foram fixados e armazenados.

Identificação e análise ecológica dos helmintos

Os helmintos foram coletados, cuidadosamente limpos, processados e armazenados seguindo-se metodologias clássicas (Amato *et al.* 1991). Os helmintos armazenados foram quantificados e identificados em nível de família, gênero e espécie, de acordo com a literatura (Jewell, 1916; Yamaguti, 1959; Yamaguti, 1961; Stumpf, 1981/1982a; Stumpf, 1981/1982b; Schmidt, 1986, Vicente *et al.* 1991; Smales *et al.* 2007).

Trematódeos.

Trematódeos foram coletados e submetidos à fixação após compressão entre lâmina e lamínula empregando-se o AFA como solução fixadora (Amato *et al.* 1991) e corados pela técnica do carmim clorídrico para análise morfológica e morfométrica de estruturas de valor sistemático. Para a identificação das espécies de trematódeos foram utilizados os estudos de Travassos *et al.* (1969) e Yamaguti (1971).

Nematódeos.

Nematódeos foram coletados e fixados em solução de AFA, a quente (Amato *et al.* 1991). Para a análise, esses nematódeos foram submetidos à clarificação pelo lactofenol de Aman (Andrade, 2000), sendo posteriormente analisados quanto à morfologia e morfometria de estruturas de valor sistemático. A identificação foi baseada nos estudos de Yamaguti (1961) e Vicente *et al.* (1991).

CAPÍTULO 1 - MATERIAIS E MÉTODOS

Cestódeos.

Os cestódeos foram coletados e submetidos à fixação após compressão entre lâmina e lamínula empregando-se o AFA como solução fixadora (Andrade, 2000; Rey, 2001) e corados pela técnica do carmim clorídrico para análise morfológica e morfométrica de estruturas de valor sistemático. A identificação foi baseada nos estudos de Jewell (1916), Yamaguti (1959), Stumpf (1981/1982), e Schmidt (1986).

Todas as espécies de helmintos tiveram seus dados morfométricos e fotomicrografias obtidas em sistema computadorizado para análise de imagens QWin Lite 3.1, adaptado em microscópio DMLB (Leica) no Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, com a colaboração do Prof. Dr. Reinaldo José da Silva.

Análise ecológica

As análises ecológicas parasitárias (prevalência, intensidade média de infecção e abundância média) foram realizadas segundo Bush *et al.* (1997). Amostras de todos os helmintos foram mantidas na coleção helmintológica do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu.

Análise estatística

Para testar diferenças em prevalência das diferentes espécies de parasitas entre os períodos (entre chuvas, de chuvas e de seca), utilizamos o Teste-Z, e para a intensidade média de infecção (IMI) e abundância média (AM) de infecção utilizamos o teste de Mann-Whitney. O Teste-Z foi realizado para prevalência total e prevalência de

CAPÍTULO 1 - MATERIAIS E MÉTODOS

cada espécie de parasita nos diferentes períodos; e o teste de Mann-Whitney foi realizado para IMI e AM total e IMI e AM de cada espécie de parasita, nos diferentes períodos. O nível estatístico de significância utilizado foi de $P \leq 0.05$. Essas análises estatísticas foram realizadas no programa Sigma Stat 3.10 (Systat Software, 72 Inc., Chicago, Illinois).

Resultados

Dos indivíduos analisados de *R. jimi*, 93,6 % estavam parasitados por alguma espécie de helminto, sendo que a intensidade de infecção variou de 1 a 362 parasitas. Os machos de *R. granulosa* apresentaram uma prevalência de 79,6%, tendo a intensidade de infecção variado de 1 a 146 parasitas. Da amostra coletada de *P. diplolister*, 22% apresentou endoparasitas, e a intensidade de infecção variou entre 1 a 4 parasitas.

Os 4139 parasitas coletados estão distribuídos entre as classes Nematoda, Trematoda, Cestoda, e Acantocephala (Figura 5). Estes parasitas foram identificados como seis espécies de helmintos distribuídos em seis diferentes famílias: *Rhabdias* sp. (Rhabdiasidae), *Aplectana* sp. (Figura 6 e 7) (Cosmocercidae), *Oswaldocruzia* sp. (Figura 8 e 9) (Molineidae), *Physaloptera* sp. (Figura 10) (Physalopteridae), *Plagiorchis rangeli* (Figura 11) (Plagiorchiidae), *Cylindrotaenia americana* (Figura 12-14) (Nematotaeniidae).

Não houve diferenças de intensidade média de infecção entre os diferentes períodos para o conjunto dos parasitas encontrados nas três espécies de anuros. Das três espécies estudadas, apenas *P. diplolister* apresentou maior prevalência ($z = 2,427$; $P = 0,015$) e abundância média ($t = 366,5$; $P = 0,004$) do total de parasitas no período de seca, quando comparada ao período de chuvas (Tabela 1).

Com relação aos parasitas de *R. jimi*, a espécie mais prevalente foi *Rhabdias* sp., seguido por *Oswaldocruzia* sp.¹, parasita de intestino delgado. *Cylindrotaenia americana* apresentou abundância média maior no período seco quando comparado com o período entre chuvas ($t = 146,500$; $P = 0,042$) e de chuvas ($t = 250,000$; $P = 0,021$). *Oswaldocruzia* sp.¹, parasita de intestino delgado, apresentou maior intensidade média

CAPÍTULO 1 - RESULTADOS

de infecção no período entre chuvas quando comparado com a período de seca ($t = 125,500$; $P = 0,007$). *Aplectana* sp.¹, parasita de intestino delgado, apresentou menor prevalência no período entre chuvas quando comparado com o período chuvoso ($z = 2,935$; $P = 0,003$), e com a período de seca ($z = 2,419$; $P = 0,016$) (Tabela 2).

Rhinella granulosa apresentou maiores prevalências para os helmintos *C. americana* e *Aplectana* sp.², parasita de intestino grosso. Apenas a espécie *Oswaldocruzia* sp. apresentou maior prevalência no período de chuvas quando comparado com o período de seca ($z = 2,252$; $P = 0,024$) (Tabela 3).

Pleurodema diplolister apresentou apenas duas espécies de helmintos identificados: *C. americana* e *Aplectana* sp. No período de chuvas foi encontrado apenas um helminto (*C. americana*) em um indivíduo; e no período de seca foram encontrados 16 helmintos em seis indivíduos (Tabela 4).

Discussão

De uma forma geral, os resultados não corroboram as hipóteses formuladas. Para as espécies do gênero *Rhinella* não houve diferenças entre períodos nos parâmetros parasitológicos totais. No entanto, algumas espécies de parasitas apresentaram diferenças de prevalência e intensidade de infecção entre períodos, possivelmente devido à ecologia dos meios de infecção. No caso de *P. diplolister*, embora houvesse uma diferença marcante dos parâmetros parasitológicos totais entre períodos, como esperado para uma espécie estivadora, houve maior prevalência e abundância média de infecção de parasitas no período da seca.

A ausência de diferenças entre períodos para os parâmetros parasitológicos nas espécies do gênero *Rhinella*, pode indicar que maiores níveis de atividade de agregação de indivíduos não afetam a prevalência e intensidade de infecção, pois a pressão por parte dos parasitas permanece constante ao longo do ano. Outra hipótese possível é a que os indivíduos apresentem ajustes fisiológicos para lidar com a maior pressão parasitária na estação chuvosa, mantendo os níveis de prevalência e intensidade de infecção constantes ao longo do ano.

As duas espécies de parasitas que apresentaram diferenças de parâmetros parasitológicos em *Rhinella* entre os períodos, tem ecologias de vias de infecção diferentes. *Aplectana* sp. apresenta ciclo direto, sendo a larva ingerida pelo hospedeiro (Anderson, 2000). Assim, maiores prevalências desse helminto no período entre chuvas para *R. jimi* podem ter ocorrido devido à grande ingestão de larvas infectantes juntamente com a maior quantidade de alimento ingerido neste período (Arneberg, 2002). No período reprodutivo, *R. jimi* e *R. granulosa* também apresentaram maior

intensidade de infecção por *Oswaldocruzia* sp., um parasita que apresenta ciclo direto, com penetração ativa da larva através da pele do hospedeiro (Anderson, 2000). É possível que no período do ano em que o solo está mais úmido, estas larvas tenham menores taxas de dessecação, maiores taxas de sobrevivência e maior facilidade de encontrar seus hospedeiros e infectá-los.

Em *P. diplolister*, os indivíduos apresentaram maior prevalência e abundância média de parasitas no período de estivação. A ausência de parasitas nos indivíduos coletados durante o período de chuvas também já havia sido encontrado para *S. couchii* (Tinsley, 1990), e tem sido interpretado como uma possível evidência de que os parasitas afetariam a condição corpórea do hospedeiro durante a estivação, de forma que apenas indivíduos livres de parasitas apresentariam condições para se reproduzir no período pós-estivação (Tocque, 1993). Dos quatro helmintos encontrados em *P. diplolister* durante o período de seca, dois se encontravam em estágio larval (nematódeo não identificado, *C. americana*). É possível que as larvas tenham se instalado durante o período reprodutivo ou de forrageamento, e não maturado até o estágio adulto, como também previamente observado em *Scaphiopus couchii* (Tocque, 1993). Para *C. americana*, a manutenção de estágio larval talvez seja induzida pela ausência de nutrientes disponíveis durante o período de seca (Tocque, 1993), pois este helminto habita o intestino delgado e absorve nutrientes provenientes do alimento ingerido pelo hospedeiro (Holmes & Zohar, 1990). Além disso, a privação alimentar do hospedeiro promove uma diminuição das vilosidades intestinais, dificultando a fixação dos helmintos adultos (Sukhdeo *et al.* 2002). Assim, a manutenção do estágio larval durante a estivação poderia aumentar o valor adaptativo destes parasitas.

CAPÍTULO 1 - DISCUSSÃO

Os helmintos endoparasitas podem infectar seus hospedeiros de duas formas, sendo ingeridos na forma de ovos ou larvas, ou penetrando ativamente pela pele (Sukhdeo *et al.* 2002). De acordo com a hipótese de trabalho, *R. jimi* e *R. granulosa* apresentaram maiores prevalências e intensidade de infecção quando comparados com *P. diplolister*. As espécies estudadas do gênero *Rhinella*, permanecem em atividade e alimentam-se ao longo de todo o ano, implicando na manutenção da atividade das vias de transmissão de parasitas nestes animais (Arneberg, 2002). Em contraposição, as baixas prevalências de parasitas de *P. diplolister* podem estar relacionadas ao curto período de atividade anual deste anuro (Pereira, 2009). Os indivíduos de *P. diplolister* ficam expostos a eventos de possível contato com larvas e ovos de parasitas apenas durante o curto período de chuvas, o que resulta numa fauna restrita de helmintos. Este padrão foi também observado para *Scaphiopus couchii*, outro anuro que habita regiões áridas (Tinsley, 1990). Entretanto, não podemos descartar também uma possível influência das relações filogenéticas entre os anuros estudados nos resultados de prevalência e intensidade de infecção observados. Espera-se que espécies mais próximas filogeneticamente apresentem padrões de infecção e espécies de parasitas similares, devido à semelhança de nichos, comportamento e morfologia (Wiens e Graham, 2005; Lima Jr *et al.* 2012). Assim, os diferentes padrões de prevalência e intensidade de infecção encontrados podem ser explicado pela maior distância filogenética de *P. diplolister* em relação às espécies do gênero *Rhinella*.

As seis espécies de helmintos encontrados nos três anuros estudados são de ampla distribuição geográfica e comum a diversas espécies de anfíbios brasileiros. Parasitas dos gêneros *Oswaldocruzia* e *Aplectana* já foram descritos para *R. ornata*, *R. icterica*,

R. marina; *Rhabdias* ssp. já foi descrito para *R. icterica*, *R. margaritifera*, *R. rubescens*; parasitas do grupo Acantocephala já foram descritos para *R. icterica* e *R. granulosa*; *R. schneideri* já foi relatado sendo hospedeiro de *Oswaldocruzia* ssp.; *R. granulosa* hospedeiro de *Aplectana* ssp. e *Physaloptera* sp.; e *R. fernandezae* como hospedeiro de *Aplectana* sp. (Vicente *et al.* 1991; Luque *et al.* 2005; Santos e Amato, 2010) .

O presente estudo representa registros inéditos de helmintofauna para *R. jimi* e *P. diplolister*; e registro inédito da helmintofauna de *R. granulosa* na região semi-árida brasileira. Além disso, esses resultados contribuem para o inventário da helmintofauna dos anuros brasileiros e distribuição geográfica dessas espécies de parasitas.

Referências

- Abe, A. B. (1995) Estivation in South American amphibians and reptiles. **Braz.J. Med. Biol. Res.** 28:1241-1247.
- Almeida, W.O., Freire, E.M.X., Lopes, S.G. (2008a) A new species of pentastomida infecting *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) from Caatinga in Northeastern Brazil. **Braz. J. Biol.**, 68(1): 199-203.
- Almeida, W.O., Santana, G.G., Vieira, W.L.S., Wanderley, I.C., Freire, E.M.X., Vasconcellos, A. (2008b) Pentastomid, *Raillietiella mottae* infecting lizards in an area of caatinga, northeast, Brazil. **Braz. J. Biol.**, 68(2): 427-431.
- Amato, F.R., Boeger, W.A., Amato, S.B. **Protocolos para laboratório – Coleta e processamento de parasitos de pescado.** Rio de janeiro: Imprensa Universitária – UFRRJ, 1991. 81p.
- Anderson, R.C. **Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission.** CABI publishing, New york, 2000. 245-347p.
- Andrade, C.M. **Meios e soluções comumente empregados em laboratórios.** Rio de Janeiro: Editora Rural, 2000. 353p.
- Arneberg, P. (2002) Host population density and body mass as determinants of species richness in parasite communities: comparative analyses of directly transmitted nematodes of mammals. **Ecograp.** 25: 88–94.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W. (1997) Parasitology meets ecology on its terms: Margolis *et al.* revisited. **J Parasitol.** 83:575-583.
- Holmes, J.C., Zohar, S. (1990) Pathology and host behavior. In: Barnard CJ, Behnke JM, eds. **Parasitism and host behaviour.** London, UK: University of Nottingham. p. 34-63
- Jewell, M.E. (1916) *Cylindrotaenia americana* nov. spec. from the cricket frog. **J Parasitol.** 2: 180-192.

CAPÍTULO 1 - REFERÊNCIAS

- Lima Jr, D.P., Giacomini, H.C., Takemoto, R.M., Agostinho, A.A., Bini, L.M. (2012) Patterns of interactions of a large fish–parasite network in a tropical floodplain. **J Anim Ecol.** 81:905–913.
- Luque, J. L., Martins, A. N., Tavares, L. E. R. (2005) Community structure of metazoan parasites of the yellow Cururu toad, *Bufo ictericus* (Anura, Bufonidae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Parasitol.** 50: 215–220.
- Pereira, I.C. (2009) Aspectos fisiológicos e ecológicos da estivação em *Pleurodema dipolistris* (Leiuperidae/Anura). Dissertação de mestrado do Depto de Fisiologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Poulin, R., Morand, S. 2000. The diversity of parasites. **The Quart Review of Biol.** 75(3): 277-293.
- Rey L. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856p.
- Santos, V. G. T., Amato, S. B. (2010) Helminth Fauna of *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) from the Rio Grande do Sul Coastland, Brazil: Analysis of the Parasite Community. **Parasitology.** 96(4): 823 - 826.
- Schmidt, G.D. CRC **Handbook of tapeworm identification**. Florida: CRC Press, 1986. 675p.
- Smales, L.R. (2007) Acanthocephala in amphibians (Anura) and reptiles (Squamata) from Brazil and Paraguay with description of a new species. **J. Parasitol.** 93(2): 392-398.
- Stumpf, I.V.K., (1981/1982a) Ciclo evolutivo da *Cylindrotaenia americana* JEWELL, 1916 (Cyclophyllidea: Nematotaeniidae) em *Bufo ictericus* SPIX, 1824. **A Biol Paran.** 10/11: 31-39.
- Stumpf, I.V.K., (1981/1982b) Aspectos biológicos da *Cylindrotaenia americana* JEWELL, 1916 (Cyclophyllidea: Nematotaeniidae) em *Bufo ictericus* SPIX, 1824. **A Biol Paran.** 10/11: 41-52.

CAPÍTULO 1 - REFERÊNCIAS

- Sukhdeo, M.V.K., Sukhdeo S.C., Bansemir, A.D. (2002) Interactions between Intestinal Nematodes and Vertebrate Hosts. In: **Behavior ecology of parasites**. Lewis, E., Campbell, J.F., Sukhdeo, M.V.K. (eds.). CABI Publishing, New york. 223-242 pp.
- Tinsley, R.C. (1990) The influence of parasite infestation on mating success in spadefoot toads, *Scaphiopus couchii*. **Am Zool.** 30:313-324.
- Tocque, K. (1993) The Relationship between parasite burden and host resources in the desert toad (*Scaphiopus couchii*), under natural environmental conditions. **J Anim Ecol.** 62(4): 683-693.
- Travassos, L., Freitas, T., Kohn, A. 1969. Trematódeos do Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 67: 1-886.
- Trefaut, M.R. (2003) Herpetofauna da Caatinga. In: **Ecologia e Consevação da Caatinga**. Leal, I.R., Tabarelli, M. & Silva, J.M.C. (eds.). Editora Universitária da UFPE, pp. 181-236.
- Vicente, J.J., Rodrigues, H.O., Gomes, D.C., Pinto, R.M. (1991) Nematódeos do Brasil. Parte II: Nematódeos de anfíbios. **Rev Brasil Zool.** 7(1): 549-626.
- Wiens, J.J., Graham, C.H. (2005) Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. **Ann Rev Ecol System.** 36: 519–539.
- Yamaguti, S. (1959) **Systema helminthum. Vol. II. Cestodes**. Interscience Publishers, London, U.K.
- Yamaguti, S. (1961) **Systema Helminthum. Vol. III. Nematodes**. Part I and II. Interscience Publishers, London, U.K.
- Yamaguti, S. (1971) **Systema Helminthum - Trematodes**. Vol. I. London: Interscience Publishers, 1074p.

CAPÍTULO 1 - TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Prevalência, intensidade média de infecção e abundância média dos parasitas de *Rhinella jimi*, *R. granulosa* e *Pleurodema diplolister* nos períodos entre chuvas, chuvas e seca.

	Prevalência			IMI			AM		
	EC	C	S	EC	C	S	EC	C	S
<i>Rhinella jimi</i>	100	100	83,3	75,2	82,1	42,4	75,2	82,1	35,3
<i>Rhinella granulosa</i>	81,2	85,1	76,1	47,2	25,8	29,8	38,6	47,2	22,7
<i>Pleurodema diplolister</i>	-	4,2 ^a	40 ^b	-	1	2,2	-	0,04 ^a	0,9 ^b

EC = Período entre chuvas; C = Período de chuvas; S = Período de seca; IMI = Intensidade média de infecção; AM = Abundância média. Letras diferentes representam $P < 0,05$.

Tabela 2. Prevalência, intensidade média de infecção e abundância média dos parasitas de *Rhinella jimi*, nos períodos entre chuvas, chuvas e seca.

Espécie	Prevalência			IMI			AM			Orgão
	EC	C	S	EC	C	S	EC	C	S	
<i>Rhabdias</i> sp.	91,6	82,4	72,2	18,3	22,6	17,2	16,8	18,6	12,4	Pulmão
<i>Plagiorchis rangeli</i>	75	52,9	38,8	16,4	12,4	15,7	12,3	6,6	6,1	ID
<i>Cylindrotaenia americana</i>	8,3	11,8	44,4	3	1	4,6	0,25 ^a	0,12 ^a	2,1 ^b	ID
<i>Oswaldocruzia</i> sp. ¹	66,7	52,9	72,2	15,5 ^a	9,9	6,9 ^b	10,3	5,2	5	ID
<i>Oswaldocruzia</i> sp. ²	-	-	16,7	-	-	2,7	-	-	0,44	IG
<i>Oswaldocruzia</i> sp. ³	-	11,8	11,1	-	1,5	2	-	0,18	0,22	EST
<i>Aplectana</i> sp. ¹	8,3 ^a	17,6 ^b	27,8 ^b	5	137,7	22,8	0,42	24,3	6,3	ID
<i>Aplectana</i> sp. ²	25	29,4	22,2	140,3	92	12	35,1	27,1	2,7	IG
Larva de nematódeo	-	-	5,5	-	-	1	-	-	0,06	IG

EC = Período entre chuvas; C = Período de chuvas; S = Período de seca; IMI = Intensidade média de infecção; AM = Abundância média; ID = Intestino delgado; IG = Intestino grosso; EST = Estômago. Números diferentes em parasitas do mesmo gênero tem correspondência com órgão parasitado, 1 para intestino delgado e 2 para intestino grosso. Letras diferentes em cada espécie de helminto representam $P < 0,05$;

CAPÍTULO 1 - TABELAS E FIGURAS

Tabela 3. Prevalência, intensidade média de infecção e abundância média dos parasitas de *Rhinella granulosa*, nos períodos entre chuvas, chuvas e seca.

Espécie	Prevalência			IMI			AM			Orgão
	E	C	S	EC	C	S	EC	C	S	
<i>Rhabdias</i> sp.	18,2	5	-	2	4,6	-	0,36	0,85	-	Pulmão
Larva de <i>Physaloptera</i> sp.	-	25,9	-	-	2,6	-	-	0,67	-	EST
Acantocephala	-	7,4	-	-	2,5	-	-	0,19	-	EST
<i>Plagiorchis rangeli</i>	-	-	9,5	-	-	9	-	-	0,86	ID
<i>Cylindrotaenia americana</i>	18,2	14,8	41	3	3	5,1	0,55	0,44	1,95	ID
<i>Oswaldocruzia</i> sp.	-	44,4 ^a	9,5 ^b	-	16,4	2,5	-	7,3	0,24	ID
Larva nematódeo	-	3,7	-	-	5	-	-	0,19	-	IG
<i>Aplectana</i> sp. ¹	45,5	-	28,6	7,6	-	8,3	3,5	-	2,38	ID
<i>Aplectana</i> sp. ²	81,8	-	66,7	43	-	26	35,2	-	17,3	IG
Larva de nematódeo	9	-	-	1	-	-	0,09	-	-	EST

EC = Período entre chuvas; C = Período de chuvas; S = Período de seca; IMI = Intensidade média de infecção; AM = Abundância média; ID = Intestino delgado; IG = Intestino grosso; EST = Estômago. Números diferentes em parasitas do mesmo gênero tem correspondência com órgão parasitado, 1 para intestino delgado e 2 para intestino grosso. Letras diferentes representam $P < 0,05$.

Tabela 4. Prevalência, intensidade média de infecção e abundância média dos parasitas de *Pleurodema diplolister*, nos períodos chuvas e seca.

Espécie	Prevalência		IMI		AM		Orgão
	C	S	C	S	C	S	
<i>Cylindrotaenia americana</i>	4,2	13,3	1	1	0,04	0,13	ID
Tetrathyridium <i>C. americana</i>	-	13,3	-	1,5	-	0,2	ID
Helmineto não identificado	-	13,3	-	1	-	0,13	EST
Larva de nematódeo	-	13,3	-	1,5	-	0,2	ID
<i>Aplectana</i> sp.	-	26,7	-	1,5	-	0,4	IG

C = Período de chuvas; S = Período de seca; IMI = Intensidade média de infecção; AM = Abundância média; ID = Intestino delgado; IG = Intestino grosso; EST = Estômago

Figura 1. Macho de *Pleurodema diplolister* vocalizando – **Foto: Isabel C. Pereira**

Figura 2. Macho de *Rhinella jimi* – **Foto: Braz Titon Jr.**

Figura 3. Macho de *Rhinella granulosa* – **Foto: Braz Titon Jr.**

Figura 4. Fazenda São Miguel, Angicos, Rio Grande do Norte, Brasil. **A)** Corpo de água permanente, também conhecido como açude. **B)** Leito seco do rio, onde *P. diplolister* é encontrado enterrado – **Foto: Carla B. Madelaire; Braz Titon Jr.**

Figura 5. Larva de *Acantocephala*, parasita de estômago de *Rhinella granulosa*, mostrando em detalhe probóscide (seta).

Figura 6. Região anterior de macho de *Aplectana* sp., parasita de intestino delgado de *Rhinella granulosa*, mostrando em detalhe bulbo (seta).

Figura 7. Região posterior de macho de *Aplectana* sp., parasita de intestino delgado de *Rhinella granulosa*, mostrando em detalhe par de espículos (setas).

Figura 8. Região anterior de macho de *Oswaldocruzia* sp., parasita de intestino grosso de *Rhinella jimi*, mostrando em detalhe dilatação cefálica (seta).

Figura 9. Região posterior de macho de *Oswaldocruzia* sp., parasita de intestino grosso de *Rhinella jimi*, mostrando em detalhe par de espículos (setas).

Figura 10. Larva de *Physaloptera* sp., parasita de estômago de *Rhinella granulosa*, mostrando em detalhe colarete cefálico (seta).

Figura 11. Região anterior de *Plagiorchis rangeli*, parasita de intestino delgado de *Rhinella jimi*.

Figura 12. Tetrathyridium *C. americana*, parasita de estômago de *Pleurodema diplolister*, mostrando em detalhe scólex (seta).

Figura 13. Escólex de *Cylindrotaenia americana*, parasita de intestino delgado de *Rhinella granulosa*, mostrando em detalhe ventosa (seta).

Figura 14. Proglotes maduras de *Cylindrotaenia americana*, parasita de estômago de *Pleurodema diplolister*, mostrando em detalhe testículos desenvolvidos (seta).

CAPÍTULO 2**RELAÇÕES ENTRE PARASITISMO E VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS E
FISIOLÓGICAS EM DIFERENTES FASES DO CICLO REPRODUTIVO DE
ANFÍBIOS ANUROS DA CAATINGA**

Resumo

A grande maioria das espécies de anfíbios anuros apresenta um padrão de reprodução sazonal, caracterizado nos machos por um pico de andrógenos que desencadeia maturação testicular, bem como manutenção do comportamento sexual. No entanto, os altos níveis de andrógenos podem apresentar um efeito imunossupressor, podendo também aumentar a probabilidade de infecções parasitárias. A Caatinga brasileira é caracterizada por altas temperaturas e chuvas sazonais e imprevisíveis que determinam o padrão reprodutivo e de atividade dos anuros dessa região, algumas espécies como *P. diplolister* apresentam comportamento de estivação durante a seca, já *Rhinella jimi* e *R. granulosa* permanecem ativos quanto ao forrageamento durante este período. As drásticas variações deste ambiente poderiam acentuar os ajustes fisiológicos apresentados por essas espécies, principalmente para a espécie estivadora. Foram estudadas as inter-relações entre caracteres morfológicos, fisiológicos e parasitológicos dessas três espécies de anuros, em três períodos distintos, (A) durante a temporada reprodutiva, em um período entre dois surtos reprodutivos (período entre chuvas); (B) durante um surto reprodutivo que acompanhou um evento de chuvas e (C) no período da seca. As duas espécies de *Rhinella* apresentaram evidências de modulações imunológicas de acordo com período, e correlações entre caracteres imunológicos, fisiológicos e número de parasitas. *Pleurodema diplolister* apresentou padrões imunológicos coerentes com o processo de economia energética durante a estivação, como redução do número de leucócitos totais, com concomitante aumento na contagem de eosinófilos e relação positiva entre intensidade parasitária e contagem total de leucócitos. As três espécies estudadas apresentaram depleção das reservas energéticas durante o período reprodutivo, possivelmente associada à alta demanda energética do comportamento vocal. Também apresentaram padrões similares de maturação testicular, evidenciando que as espécies estudadas possuem um padrão de reprodução oportunista, típico de espécies que ocupam ambientes áridos. As três espécies também apresentaram relação entre parâmetros imunológicos e carga parasitária, no entanto, para esclarecer as relações causais entre esses fatores, são necessários testes adicionais de desafio imunológico, bem como infecção experimental por parasitas.

Abstract

Most part of anurans show a seasonal pattern of reproduction, when males display high levels of androgens associated with testicular development and sexual behavior maintenance. However, high androgens levels also can shows an immunosuppressive effect resulting in increased parasitological disease. The semi-arid Caatinga is an environment characterized by high temperatures and unpredictable seasonal rains that determine the breeding season of anurans. During the dry season, *Pleurodema diplolister* aestivate borrowed, *Rhinella granulosa* and *R. jimi* remain foraging. Drastic variation in this environment could increase the physiological adjustments displayed by these species, mainly by *P. diplolister*. The inter-relation between morphological, physiological and parasitological characters was studied in these three anuran species, in three different periods: (A) dry season, (B) during the rainfall, when males are calling, and (C) in the interval between rainfalls, when males are foraging within the reproductive season. The *Rhinella* species presented evidences of immunological modulations according to the period and correlations between immunological, physiological parameters and number of parasites. *Pleurodema diplolister* presented immunological patters consistent with the process of energy economy during aestivation, including total leukocyte reduction, along with eosinophil increase and positive relation between total leukocyte and parasite intensity. The three species presented depletion in energy reserves during the breeding season, possibly associated with the high energy demand of vocal behavior. They also presented a similar pattern of testicular development, indicating that these species present opportunistic reproduction pattern, typical of species that occupy arid environments. The studied species also showed correlations between immunological parameters and parasite load, however, to clarify the causal relation between these parameters, additional immunological challenges and experimental parasite infection are necessary.

Introdução

A maioria das espécies de anfíbios anuros é caracterizada por reprodução sazonal (Wilczynski *et al.* 2005). Nos machos, os picos de andrógenos que ocorrem durante a fase de reprodução encontram-se associados ao aumento da massa testicular e à atividade espermatogênica (Cei *et al.* 1996), desenvolvimento das características morfológicas sexuais secundárias e manutenção do comportamento sexual (Moore, 2005). Embora a manutenção de altos níveis de testosterona durante a temporada reprodutiva promova a expressão dos caracteres sexuais secundários, estudos realizados com aves e mamíferos têm demonstrado seu efeito imunossupressor (Norton e Wira, 1977; Weinstein *et al.* 1984; Grossman, 1984; Hou e Zheng, 1988; Cézilly *et al.* 2002). Esta redução da imunocompetência durante a fase reprodutiva aumenta a probabilidade de infecções parasitárias (Nordling *et al.* 1998), e estudos de seleção artificial para uma alta imunocompetência resultaram em redução da ocorrência de infecções parasitárias, e evidenciaram correlação genética negativa da imunocompetência com níveis de testosterona e esforço reprodutivo em roedores (Mills *et al.* 2010), e com o nível de ornamentação sexual em aves (Verhulst *et al.* 1999). Desta forma, a variação sazonal de hormônios esteróides pode produzir efeitos fenotípicos correlacionados, com consequências potencialmente antagônicas para o valor adaptativo (Ketterson e Nolan, 1994).

A imunossupressão ocasionada pelos altos níveis de andrógenos durante a temporada reprodutiva tem sido interpretada por alguns autores como um compromisso de realocação energética nas diferentes fases da história de vida dos animais (Zuk e Stoehr, 2002; Martin *et al.* 2008). Devido ao alto custo energético de manutenção de um sistema imune de alto desempenho (Ilmonen *et al.* 2003), durante a época reprodutiva há um investimento maciço no esforço de deixar descendentes e concomitante

decréscimo da atividade imunitária (Martin *et al.* 2008). Por outro lado, o aumento da atividade imunitária fora do período reprodutivo promoveria um aumento da probabilidade de sobrevivência até o próximo evento reprodutivo (Goldman, 2001; Nelson, 2004; Martin *et al.* 2008). Diversos estudos em aves, mamíferos e répteis têm demonstrado que tecidos imunológicos como timo, baço, bursa de Fabricius e tecido linfóide associado ao intestino (GALT) mudam de tamanho ao longo do ano, assim como a densidade de células do sistema imune circulantes, que aumentam fora da temporada reprodutiva (Nelson *et al.* 2002; Bilbo *et al.* 2002; Nelson, 2004; Buehler, 2008).

A baixa ocorrência de pluviosidade anual e a imprevisibilidade da ocorrência dos eventos de chuvas caracterizam ambientes áridos e semi-áridos, acentuando a variação sazonal de diversos aspectos fisiológicos, morfológicos e comportamentais dos anuros que vivem nestes ambientes (Withers, 1993; Withers e Guppy, 1996; Pereira, 2009). Brown e colaboradores (2011a) estudaram a espécie de anuro invasora na Austrália, *Rhinella marina*, cuja frente de invasão tem se expandido para áreas semi-áridas com marcada sazonalidade pluviométrica. Esses autores demonstraram que *R. marina* realiza ajustes fisiológicos e comportamentais durante as diferentes fases do ano, apresentando maior tamanho corpóreo, taxa de crescimento, e taxa de movimentação durante a estação chuvosa, que coincide com a temporada reprodutiva. Durante a estação seca, estes animais apresentam menor porcentagem de corpos gordurosos (Brown *et al.* 2011^a), diferente do que ocorre com a maior parte de vertebrados ectotermos, que apresentam uma maior massa de corpos gordurosos fora da estação reprodutiva (Long, 1986; Loubourdis e Kyriakopoulou-Sklavounou, 1991; Díaz *et al.* 1994). Além disso, a eficiente exploração de microambientes favoráveis resulta na manutenção do nível de hidratação dos animais entre as estações (Brown *et al.* 2011a).

Similar ao ambiente semi-árido da Austrália, a Caatinga no Brasil também apresenta marcada sazonalidade pluviométrica, determinando o padrão de atividade reprodutiva dos anfíbios (Abe e Garcia, 1990; Rodrigues, 2003). Neste ambiente, os animais estão reprodutivamente ativos dois ou três meses por ano, no período de chuvas (Rodrigues, 2003), e estivam (Abe, 1995; Pereira, 2009) ou mantêm atividade de forrageamento durante os meses de seca (C.B.M., observação pessoal). Como o regime de chuvas é imprevisível, os animais devem estar preparados para iniciar a atividade reprodutiva com as primeiras chuvas, apresentando células gaméticas maduras e músculos de amplexo e de vocalização desenvolvidos. Desta forma, este representa um ambiente que tenha possivelmente selecionado um padrão de reprodução em anuros que se distancia, de alguma forma, do padrão de sincronização entre picos de hormônios esteróides gonadais, manifestação do comportamento reprodutivo e gametogênese comum em vertebrados (Crews, 1984; Harvey *et al.* 1997). Talvez, na Caatinga, a ativação da espermatogênese ocorra no período que antecede a estivação em anuros estivadores, e o período da seca para os anuros que mantêm a atividade durante este período, quando os níveis de testosterona plasmática ainda estão altos o bastante para permitir este processo.

Este estudo explora a covariação de características morfológicas, fisiológicas e parasitológicas em diferentes fases do ciclo reprodutivo de três espécies de anuros do semi-árido brasileiro, Caatinga. A hipótese de trabalho é que existe um padrão de variação do perfil leucocitário, órgão associado ao sistema imunitário, do índice corpóreo, volume globular, corpos gordurosos e maturação testicular que acompanha as diferentes fases da vida destes anuros ao longo de um ano. As previsões de trabalho são que, durante a temporada reprodutiva, (1) a contagem total de leucócitos estará mais baixa, refletindo uma menor investimento em imunidade em resposta ao compromisso

CAPÍTULO 2 - INTRODUÇÃO

de investimento maciço em reprodução (Nelson, 2004); (2) a relação neutrófilo/linfócito estará maior, refletindo maiores níveis de estresse devido a atividade reprodutiva (Davis *et al.* 2008); (3) em resposta a uma maior contato com larvas e ovos de parasitas, haverá uma maior proporção de eosinófilos, já que está é uma das principais células responsáveis pela resposta anti-parasitária (Cadman e Lawrence, 2010); (4) a massa do baço será menor, dado que este é o órgão responsável pela maturação e ativação de linfócitos (Janeway *et al.* 2004); (5) o índice corpóreo será menor, refletindo o investimento maciço em reprodução (Wells, 2007) e haverá uma correlação negativa entre esta variável e número de parasitas (Gobush *et al.* 2011); (6) haverá uma correlação negativa entre volume globular e intensidade parasitária, pois este parâmetro pode refletir a perda sanguínea ocasionada por danos teciduais causados pelos parasitas (Qadir *et al.* 2011). Durante a estação seca, (7) a massa de corpos gordurosos será maior, refletindo as reservas acumuladas para utilização no período pós-estivação/reprodutivo (Loumbourdis e Kyriakopoulou-Sklavounou, 1991) e (8) os testículos estarão maduros ou em estágio avançado de maturação, dado que a chuva na Caatinga é um evento imprevisível e os animais devem estar prontos para a reprodução no momento da formação dos corpos de água (Lofts, 1984). Por fim, (9) os parâmetros mensurados apresentarão uma variação anual mais pronunciada em espécies estivadoras quando comparada às espécies que mantém atividade de forrageamento durante o período de seca.

Materiais e métodos*Espécies incluídas e sítio de estudo*

Foram coletados machos de três espécies de anuros que ocorrem simpatricamente no Município de Angicos (RN), no bioma da Caatinga: 41 indivíduos de *Pleurodema diplolistris* (Anura/Leiuperidae), que apresenta comportamento de estivação fora da temporada reprodutiva; e 47 indivíduos de *Rhinella jimi* e 59 indivíduos de *R. granulosa* (Anura/Bufonidae), que permanecem em atividade de forrageio fora da temporada reprodutiva, nesta localidade. As coletas ocorreram ao longo do ano de 2011, em três diferentes períodos: (A) durante a temporada reprodutiva, em um período entre dois surtos reprodutivos de 11 a 21 de janeiro (período entre chuvas); (B) durante um surto reprodutivo que acompanhou um evento de chuvas de 22 a 24 de janeiro (período de chuva), e (C) no período da seca, de 6 a 17 de outubro. Os indivíduos de *R. jimi* e *R. granulosa* foram coletados nos três períodos acima descritos enquanto os indivíduos de *P. diplolister* foram coletados apenas nos períodos de chuvas e de seca. Todas as coletas foram realizadas na Fazenda São Miguel, Angicos, RN (5°30'43"S. 36°36'18"W).

Métodos de campo

Amostras de sangue foram coletadas em campo (cerca de 50-100µl), através de punção cardíaca (*R. granulosa* e *R. jimi*) com seringas previamente heparinizadas, ou por decapitação (*P. diplolister*), seguida de coleta de sangue com capilares heparinizados. As amostras de sangue foram identificadas e mantidas em gelo até serem processadas, na mesma noite. Com essas amostras, foram coletados dados de contagem total de leucócitos, contagem diferencial de leucocitário e volume globular. Os animais capturados foram identificados e mantidos em recipientes plásticos individualizados. No

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

dia seguinte, os animais foram pesados (0,01g) e medidos (0,00cm), sendo em seguida mortos com uma injeção intraperitoneal (75mg/kg) de solução de tiopental sódico (25mg/mL) (Thiopentax®). Em seguida, todos os órgãos internos e a cavidade celomática foram avaliados quanto à presença de helmintos. Os helmintos encontrados foram fixados, quantificados e identificados em família, gênero e espécie (ver capítulo 1 para mais detalhes). Os corpos gordurosos abdominais e o baço foram dissecados e pesados (0,0001g). O índice de condição corpórea dos indivíduos, em cada um dos períodos, foi obtido com o cálculo dos residuais da regressão linear da massa corpórea como variável dependente e comprimento rostro-cloacal como variável independente. Os testículos foram dissecados para análise histológica. Adicionalmente, o estômago foi observado quanto à presença de itens alimentares e o conteúdo foi pesado (0,001g).

Análises em laboratório

Contagem e classificação de leucócitos e volume globular

As amostras de sangue armazenadas em gelo foram transferidas para um refrigerador (-4°C) ao final de cada coleta. No dia seguinte, 20 µL de sangue foram diluídos em azul de toluidina a 0,01%, para a contagem total de leucócitos. O azul de toluidina cora as células, facilitando a diferenciação de leucócitos e hemácias. A diluição foi então colocada em um hemocítômetro, e a contagem total de leucócitos foi realizada em microscópio (aumento de 40x).

Cerca de 10-20 µL provenientes desta mesma amostra de sangue foram utilizados para a realização de esfregaços e, posteriormente, cada lâmina foi corada com guiença 10% para realizar a contagem diferencial. As lâminas foram então identificadas e armazenadas. Em cada esfregaço, cem leucócitos foram contados e classificados (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos) em microscópio óptico

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Nikon 104c (aumento 100x) (Chiesa *et al.* 2006; Fokidis *et al.* 2008). A razão entre neutrófilos e linfócitos foi calculada a partir da divisão entre os valores totais de neutrófilos e linfócitos encontrados em cada amostra.

O volume globular de uma amostra de sangue (5-10 μ L) foi medido em tubo de microhematócrito após centrifugação (60s, 12.000 rpm). O hematócrito foi determinado com paquímetro de precisão para registrar a porcentagem de hemácias em relação ao total (plasma juntamente com hemácias compactadas).

Histologia dos testículos

Os testículos incluídos em parafina foram seccionados (cortes de 5-10 μ m) em micrótomo (Leica RM 2255) e corados em hematoxilina e eosina para avaliação do diâmetro de 50 cistos germinativos por indivíduo, bem como do estágio de maturação das células gametogênicas segundo Oordt (1956) e Harvey (1997). As análises foram feitas em sistema computadorizado para análise de imagens QWin Lite 3.1, adaptado em microscópio DMLB (Leica) (aumento 100x). A média de diâmetro de cisto germinativo foi calculada para cada indivíduo.

Análise dos dados

A estatística descritiva completa foi realizada para todas as variáveis em cada espécie e período. Todos os dados foram transformados em $\log_{10}$ a fim de aumentar a normalidade para as análises estatísticas. Para observar se houve relação das variáveis morfológicas e sanguíneas com a intensidade de infecção dos parasitas totais, massa corpórea e período, foi realizado um teste de seleção de modelos. O modelo selecionado foi o que apresentou o menor valor de dAICc, juntamente com o maior valor de AIC weight (probabilidade do modelo ser o melhor entre os selecionados) (Mazerolle, 2006).

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos variáveis morfológicas e sanguíneas (conteúdo estomacal, corpos gordurosos, massa do baço, número total de leucócitos, tipos de leucócito, volume globular) como variáveis dependentes (ϕ), enquanto massa corpórea (M), período (E) e número de parasitas totais (P) foram inseridos como variáveis independentes. Construímos 10 modelos possíveis para explicar a relação entre os dados:

- 1) Nulo: $\phi \sim 1$
- 2) Massa: $\phi \sim M$
- 3) Período: $\phi \sim E$
- 4) Parasitas totais: $\phi \sim P$
- 5) Massa e período: $\phi \sim M + E$
- 6) Massa e parasitas totais: $\phi \sim M + P$
- 7) Interação entre massa e parasitas totais: $\phi \sim M * P$
- 8) Período e parasitas totais: $\phi \sim E + P$
- 9) Massa, período e parasitas totais: $\phi \sim M + E + P$
- 10) Interação entre massa e parasitas totais, e período: $\phi \sim E + M * P$

Dois modelos (modelos 7 e 10) apresentam interação entre massa corpórea e parasitas pois estudos prévios têm encontrado uma relação positiva entre biomassa de parasitas e massa corpórea do hospedeiro (Poulin e George-Nascimento, 2007). Como o índice corpóreo é calculado a partir da massa corpórea, realizamos os testes estatísticos para esta variável utilizando apenas os modelos 1, 3, 4 e 8.

Os testes de seleção de modelos foram realizados no programa RStudio versão 0.95.262 2009-2011 (Version 3 of the GNU, Affero General Public License). Para observar se houve diferenças no diâmetro dos cistos germinativo nos diferentes os períodos, foi realizado um teste ANOVA, seguido do teste post-hoc de Bonferroni para

CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

as duas espécies de *Rhinella*, e test t para *P. diplolister*, no programa SPSS 5.0 (SPSS, 1992).

Resultados

Relações das variáveis morfológicas e imunológicas nas diferentes fases do ciclo reprodutivo

A análise descritiva de todas as variáveis morfológicas e sanguíneas, por período, está representada nas tabelas 1 a 3. Os modelos selecionados para explicar as relações das variáveis morfológicas e sanguíneas de acordo com intensidade parasitária, massa corpórea e período encontram-se nas tabelas 4 a 6. Para *R. jimi*, o volume globular foi menor no período da seca, assim como a contagem de monócitos. A massa do baço e corpos gordurosos não variou de acordo com o período. Além disso, o índice corpóreo no período de chuvas foi menor que no período de entre chuvas (Figura 1). Para *R. granulosa*, a massa do baço e corpos gordurosos (Figura 2) foi menor durante o período de chuvas. A contagem de eosinófilos foi maior durante o período entre chuvas e a de basófilos maior durante o período de chuvas. O número de leucócitos e o volume globular foram menores durante o período de seca. O índice corpóreo dos animais no período de chuvas foi menor do que no período de entre chuvas (Figura 3). Para *P. diplolister*, durante o período de seca, o conteúdo estomacal, número de leucócitos totais, volume globular e monócitos apresentaram-se menores, e o número de eosinófilos e massa dos corpos gordurosos apresentou-se maior (Figura 4). O índice corpóreo não variou entre os períodos de chuva e seca.

No período de seca, os testículos das três espécies apresentaram ninhos de espermatogônias, espermátócitos e espermátides (Figuras 5-7). As espécies de *Rhinella* apresentaram, no período entre chuvas, uma predominância de espermátócitos e espermátides (Figura 8 e 9). Os testículos das três espécies estudadas apresentaram predominantemente espermatozoides livres no lúmen do cisto germinativo (Figuras 10-

CAPÍTULO 2 - RESULTADOS

12). O diâmetro dos cistos germinativos das três espécies estudadas diferiu entre períodos (*R. jimi* $F_{2,10} = 18,2 \pm 8,2$; $P = 0,002$; *R. granulosa* $F_{2,10} = 16,3 \pm 7,7$ $P = 0,001$; *P. diplolister* $t = 0,555$ $df = 3$; $P = 0,012$), sendo maior no período reprodutivo que durante a seca (*R. jimi* $P \leq 0,02$; *R. granulosa* $P \leq 0,005$) (Figura 13-15).

Relações das variáveis morfológicas e fisiológicas com a intensidade parasitária

Na espécie *R. jimi*, os animais que possuíam maior número de parasitas totais apresentavam menor conteúdo estomacal, bem como menor número total de leucócitos (Figura 16 e 17). Em *R. granulosa*, indivíduos com maior número de parasitas totais apresentaram baços maiores (Figura 18), maior número de eosinófilos, e menor número de leucócitos totais (Figura 19) e basófilos. Os indivíduos de *P. diplolister* que apresentaram maior número de parasitas totais tinham maior contagem de leucócitos e menor número de basófilos (Figura 20 e 21).

Discussão*Relações das variáveis morfológicas e imunológicas nas diferentes fases do ciclo reprodutivo*

De acordo com a previsão de imunossupressão durante a temporada reprodutiva, a massa esplênica de *R. granulosa* foi menor no período reprodutivo, indicando uma possível menor produção e armazenamento de linfócitos, e menor investimento em imunidade (Vicente *et al.* 2007). No entanto, este foi o único parâmetro que aponta para uma possível imunossupressão durante a temporada reprodutiva. Durante o período de seca, *R. granulosa* e *P. diplolister* apresentaram menor contagem de leucócitos totais enquanto *R. jimi* e *P. diplolister* apresentaram menor contagem de monócitos, possivelmente indicando um menor investimento em imunidade ou menor exposição a patógenos durante este período. A menor contagem de monócitos durante a seca estaria associada a uma menor ativação de fagocitose, um importante componente do sistema imune responsável pelo combate de patógenos bacterianos e apresentação de antígenos para a ativação da imunidade adquirida (Janeway *et al.* 2004). No entanto, este estudo não apresenta dados de microparasitas para confirmar esta hipótese. Também no período de seca, *P. diplolister* apresentou maior número de eosinófilos, que pode estar associado a uma maior intensidade de parasitismo por helmintos neste período (ver capítulo 1). Em *R. granulosa*, o maior número de basófilos e eosinófilos nos períodos entre chuvas e na chuva, respectivamente, pode indicar um recrutamento diferencial dessas células associadas ao combate de parasitas específicos em cada período.

A pressão por parte de patógenos (Altizer *et al.* 2006) e a disponibilidade energética (Schmid-Hempel 2003; Zuk e Stoehr, 2002) afetam substancialmente a regulação da alocação energética para a atividade imunológica ao longo do ano (Martin,

1987; French e Moore, 2008). Os resultados deste estudo sugerem que a pressão por parte dos parasitas permanece constante ao longo do ano para as espécies de *Rhinella* estudadas, pois as prevalências e intensidades de infecção não se alteraram entre os períodos (ver capítulo 1). Assim, é possível que no período de chuvas e entre chuvas, estes animais consigam manter alto investimento reprodutivo e imunitário devido à maior disponibilidade de alimento, e durante a estação seca, os indivíduos continuam se alimentando e diminuem seu gasto energético total, ao reduzirem sua taxa de movimentação e a expressão das características sexuais secundárias, podendo assim, investir num sistema imune de alto desempenho. Estudos já demonstraram que a imunossupressão durante a reprodução nem sempre é encontrada ou é dependente do contexto ecológico (French *et al.* 2007). Quanto ao contexto, a disponibilidade de recursos energéticos seria o principal fator responsável pela variação de intensidade de imunossupressão mediada por hormônios esteróides (French e Moore, 2008). Se os animais encontram-se em um contexto de abundância de recursos, é possível manter tanto reprodução quanto alto desempenho imunitário (French *et al.* 2007). Mesmo que a pressão por patógenos seja mais intensa durante a temporada reprodutiva, manifestada através de maiores taxa de infecção por larvas, com a abundância de recursos alimentares os animais conseguiriam investir concomitantemente em imunidade e reprodução, mantendo constantes as prevalências e intensidade de infecção parasitária ao longo do ano (ver capítulo 1).

As três espécies de anuros estudadas apresentaram evidências de redução das reservas energéticas associadas ao período reprodutivo. O índice corpóreo de *P. diplolister* não se alterou entre os períodos, no entanto os corpos gordurosos apresentaram-se em menor quantidade durante a temporada reprodutiva. A diminuição dos corpos gordurosos pode ser reflexo da utilização destas reservas para o despertar da

estivação, bem como para a manutenção da atividade vocal. Para a maior parte das espécies de anuros estudadas até então, a demanda energética da atividade de vocalização é sustentada principalmente através da oxidação de reservas de glicogênio e lipídeos intra-musculares, sendo alterações de substratos energéticos extra-musculares encontradas apenas em espécies que mantêm atividade reprodutiva bastante prolongada (Wells, 2007). O fato de *P. diplolister* ser, dentre as três espécies estudadas, a que apresenta atividade reprodutiva mais explosiva e de curta duração, talvez possa explicar porque esta foi a única espécie que manteve o índice corpóreo entre os períodos de reprodução e seca, apresentando apenas uma redução dos corpos gordurosos no período reprodutivo. *Rhinella granulosa* apresentou tanto diminuição do índice corpóreo quanto de corpos gordurosos durante o período de chuvas, refletindo uma alta demanda energética da atividade de vocalização (Wells, 2007). No caso de *R. jimi*, houve apenas diminuição do índice corpóreo, com manutenção de massa dos corpos gordurosos entre os períodos. É possível que as diferenças em alterações da quantidade de corpos gordurosos encontradas para estas duas espécies de *Rhinella* possa também estar associada a diferentes padrões temporais de demanda energética exigida pelo comportamento vocal. Isso porque *R. granulosa* apresenta um comportamento reprodutivo aparentemente mais explosivo e energeticamente mais dispendioso quando comparado com *R. jimi*, sendo esta última espécie caracterizada por taxas de vocalização mais baixas e atividade vocal mantida por períodos mais prolongados (C.B.M. - observação pessoal). Assim, o padrão de atividade de vocalização de *R. jimi* poderia não implicar em alterações drásticas na massa de corpos gordurosos nos diferentes períodos quando comparado a *R. granulosa*. No entanto, esta hipótese permanece para ser testada futuramente.

Pleurodema diplolister estiva durante o período da seca (Abe, 1995). Durante esse processo, os indivíduos desta espécie não se alimentam e entram em depressão metabólica (Pereira, 2009). A sobrevivência durante período tem sido atribuída à utilização de reservas energéticas adquiridas durante o período pré-estivação para várias espécies de tetrápodes ectotermos estivadores (Souza, 2004; Carvalho *et al.* 2009). O menor conteúdo estomacal acompanhado de maior quantidade de corpos gordurosos durante a seca são condizentes com o padrão de dinâmica de recursos energéticos previamente encontrado para outras espécies estivadoras (Naya *et al.* 2008, Carvalho *et al.* 2009). O menor número de leucócitos totais durante a seca, embora seja contrário à hipótese inicial de maior investimento imunológico fora da temporada reprodutiva, provavelmente integra o processo global de economia energética durante o período de estivação.

Durante o período de seca, as espécies estudadas apresentaram menor volume globular, o que poderia ser consequência tanto de deficiência ou carência nutricional pela menor ingestão de proteínas, vitamina B₁₂, niacina e ácido fólico, e de elementos como Ferro, Cobre e Selênio, que são necessários em constante abundância para uma eritropoiese adequada (Coppo *et al.* 2005) quanto também poderia ser reflexo de uma possível depressão metabólica durante este período.

Em várias espécies de anfíbios, as condições climáticas e o período do ano estão associados a mudanças nos níveis de testosterona, estrutura testicular e espermatogênese (Rastogi 1976; Lofts, 1984; 1987; Whittier e Crews 1987; Rastogi e Iela, 1992). As variações sazonais dos níveis plasmáticos de testosterona e seu papel na reprodução de machos tem sido investigado em várias espécies de anuros (Licht *et al.* 1983; Pierantoni *et al.* 1984; Delgado *et al.* 1989; Itoh *et al.* 1990; Guarino *et al.* 1993; Ko *et al.* 1998) e dois padrões reprodutivos foram reportados: aumento dos níveis de testosterona

associado a atividade espermatogênica durante a temporada reprodutiva (Rastogi *et al.* 1986) e diferenciação espermatogênica fora do período reprodutivo, quando os níveis de testosterona estão baixos (Delgado *et al.* 1989). Este último padrão tem sido atribuído aos anuros que habitam ambientes áridos e se reproduzem em resposta ao estímulo de chuva, que ocorre de forma imprevisível (Bragg, 1945; Lofts, 1984). Sendo assim, é possível que o desenvolvimento testicular nessas espécies de ambiente árido, possa ser desencadeado ainda no fim da temporada reprodutiva, quando os níveis de andrógenos ainda estão altos (Krohmer *et al.* 1987), ou ainda possa ser dependente apenas das altas concentrações de gonadotropinas que, independente da concentração de andrógenos, tem capacidade de estimular a multiplicação de espermatogônias primárias e espermatócitos, bem como diferenciação de espermatogônias em espermatócitos (Minucci *et al.* 1992) durante a seca. As três espécies analisadas neste estudo apresentaram testículos maduros para a reprodução durante o período de seca, apresentando espermátides prontas para o evento de espermição. Sendo assim, é possível afirmar que as espécies de anuros deste estudo apresentam um padrão de reprodução oportunista, típico de espécies que ocupam ambientes áridos e que se reproduzem apenas mediante estímulo de chuvas (Bragg, 1945; Lofts, 1984). Além disso, resultados preliminares de dosagens de concentração de testosterona para as três espécies estudadas demonstram que durante a temporada reprodutiva, os níveis de testosterona estão altos e durante o período de seca, os níveis deste hormônio estão baixos, assim como já encontrado para a espécie de deserto *Scaphiopus couchii* (Harvey *et al.* 1997). No entanto, o mecanismo que desencadeia a maturação testicular nas espécies de anuros da caatinga só pode ser desvendado por meio de dosagens de testosterona e gonadotropinas, além do acompanhamento da maturação testicular ao longo dos meses do ano.

No período entre chuvas, os testículos de *R. jimi* e *R. granulosa* apresentaram estágio avançado de maturação, com grande quantidade de espermatídes e poucos ninhos de espermatogônias quando comparado com o período de seca. O estágio de maturação mais avançado no período entre chuvas talvez seja uma consequência dos animais já terem apresentado um surto reprodutivo no mês anterior. Possivelmente, a alta concentração de testosterona neste evento reprodutivo pode ter desencadeado a maturação das espermatogônias. Além disso, somente no período de chuvas, as três espécies apresentaram grande número de espermatozoides livres no lúmen do cisto germinativo, que indica que provavelmente a espermição só aconteça neste período e talvez seja associado a picos plasmáticos de LH (hormônio luteinizante) (Tanaka *et al.* 2004). A grande quantidade de espermatídes e espermatozoides (Rastogi *et al.* 1976; Saidapur 1983; Kobayashi e Iwasawa 1986; Kao *et al.* 1993; Huang *et al.* 1996; Huang *et al.* 1997) e maior diâmetro do cisto germinativo durante o período reprodutivo (Shalan *et al.* 2004), estão associados a altas concentrações plasmáticas de andrógenos para várias espécies de anuros, e está de acordo com os resultados preliminares de altas concentrações de testosterona encontrados para essas espécies no período de chuvas.

Relações das variáveis morfológicas e fisiológicas com a intensidade parasitária

Indivíduos de *R. jimi* que apresentaram menor conteúdo estomacal estavam parasitados por maior número de helmintos. Esta associação pode estar relacionada à redução das taxas de consumo alimentar com o parasitismo, detectada experimentalmente para outras espécies de tetrápodes, incluindo outra espécie do gênero *Rhinella* (Damsgard *et al.* 1998; Neji e de la Noue 1998, Kelehear *et al.* 2009). Essa menor taxa de consumo alimentar, por sua vez, poderia afetar diretamente o valor adaptativo dos indivíduos parasitados ao promover redução das taxas de crescimento (Goater e Ward 1992; Goater *et al.* 1993; Kelehear *et al.* 2009) e do acúmulo de

reservas lipídicas necessárias para o investimento reprodutivo e a manutenção de outros processos fisiológicos.

Indivíduos de *R. jimi* e *R. granulosa* com maior intensidade parasitária apresentaram menor contagem de leucócitos totais, o que poderia estar associado à um alto recrutamento de leucócitos nos tecidos afetados para o combate da infecção parasitária (Tizard, 1996; Kirkova *et al.* 2005;) ou refletir uma baixa resistência a parasitas (Norris e Evans, 2000). No entanto, não temos elementos para discernir entre estas duas hipóteses. *Pleurodema diplolister* consiste em um caso bastante interessante, pois foi a única espécie que apresentou diferenças de prevalência e intensidade parasitária entre os períodos de chuva e seca, sendo que foi encontrado um único indivíduo parasitado por um único helminto durante o período reprodutivo (ver capítulo 1). Durante a seca, o número total de leucócitos está mais baixo que no período de atividade, o que poderia representar um reflexo da depressão metabólica que caracteriza o período de estivação desta espécie (Pereira, 2009). Apesar de apresentar uma redução da quantidade total de leucócitos durante o período de estivação, os indivíduos com maior número de parasitas apresentaram maior número de leucócitos, possivelmente associado a uma maior necessidade devido à infecção (Wedemeyer, 1999, Kirkova *et al.* 2005). Dado que indivíduos de *P. diplolister* parasitados foram encontrados apenas durante o período de seca, a comparação dos resultados obtidos para esta espécie não são diretamente comparáveis aos resultados obtidos para *Rhinella* quanto à relação entre leucócitos totais e intensidade parasitária. Experimentos envolvendo desafios imunológicos e infecção experimental por parasitas seriam necessários para um maior esclarecimento das relações causais entre intensidade parasitária e alterações da quantidade de leucócitos circulantes, bem como das diferenças interespecíficas observadas (Brown *et al.* 2011b). A massa esplênica de *R. granulosa* foi maior nos

animais com maior carga parasitária, o que pode estar associado ao envolvimento do baço na resposta anti-helmintica através do desenvolvimento de linfócitos T que atuam como mediadores de ativação de eosinófilos (Bradley e Jackson, 2004); e da produção de linfócitos B e imunoglobulinas que contribuem para a resposta imune à infecção por nematódeos (Vicente *et al.* 2007).

Um menor volume globular nos animais que apresentassem mais parasitas era esperado (Waweru *et al.* 1999; Qadir *et al.* 2011), visto que esses últimos podem se alimentar do sangue do hospedeiro (Qadir *et al.* 2011) e também podem causar injúrias devido a fixação no órgão (Dezfuli *et al.* 2007) causando, assim, uma hemorragia. No entanto, o volume globular não foi afetado pelo parasitismo em nenhuma das espécies estudadas. Este resultado pode estar associado a um possível mascaramento por variações de balanço hídrico, já que anfíbios toleram grandes variações deste parâmetro (Shoemaker *et al.* 1992) ou a um efeito pouco pronunciado de perda sanguínea associada à intensidade parasitária.

As duas espécies de *Rhinella* apresentaram evidências de modulações imunológicas de acordo com período, e possivelmente de acordo com as diferentes pressões de patógenos. *Pleurodema dipolister* apresentou padrões imunológicos coerentes com o processo de economia energética durante a estivação, apresentando redução na contagem total de leucócitos, com concomitante aumento na contagem de eosinófilos e relação positiva entre intensidade parasitária e contagem total de leucócitos. As três espécies estudadas apresentaram depleção das reservas energéticas durante o período reprodutivo, possivelmente associada à alta demanda energética do comportamento vocal. Também apresentaram padrões similares de maturação testicular, evidenciando que as espécies estudadas possuem um padrão de reprodução oportunista, típico de espécies que ocupam ambientes áridos e que se reproduzem apenas mediante

CAPÍTULO 2 - DISCUSSÃO

estímulo de chuvas. As três espécies também apresentaram relação entre parâmetros imunológicos e carga parasitária, no entanto para esclarecer as relações causais entre esses fatores são necessários testes adicionais de desafio imunológico, bem como infecção experimental por parasitas.

Referências

- Abe, A. B. (1995) Estivation in South American amphibians and reptiles. **Braz.J. Med. Biol. Res.** 28:1241-1247.
- Abe, A.S., Garcia, L.S. (1990) Changes in body fluids of the frog *Leptodactylus fuscus* during estivation (Anura, Leptodactylidae). **Rev Bras Biol.** 50(1):243-7.
- Altizer, S., Dobson, A., Hosseini, P., Hudson, P., Pascual, M., Rohani, P. (2006) Seasonality and the dynamics of infectious diseases. **Ecol Let.** 9: 467 - 484.
- Amato, F.R., Boeger, W.A., Amato, S.B. **Protocolos para laboratório – Coleta e processamento de parasitos de pescado.** Rio de janeiro: Imprensa Universitária – UFRRJ, 1991. 81p.
- Anderson, R.C. **Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission.** CABI publishing, New york, 2000. 245-347p.
- Arneberg, P. (2002) Host population density and body mass as determinants of species richness in parasite communities: comparative analyses of directly transmitted nematodes of mammals. **Ecograp.** 25: 88–94.
- Bilbo, S. D., Dhabhar, F. S., Viswanathan, K., Saul, A., Yellon, S. M., Nelson, R. J. (2002) Short day lengths augment stress-induced leukocyte trafficking and stress-induced enhancement of skin immune function. **P Natl Acad Sci USA.** 99:4067 – 4072.
- Buehler, D.M. (2008) Bottlenecks, budgets and immunity: the costs and benefits of immune function over the annual cycle of red knots (*Calidris canutus*). PhD Thesis. University of Groningen and the Faculty of Mathematics and Natural Sciences.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W. (1997) Parasitology meets ecology on its terms: Margolis *et al.* revisited. **J Parasitol.** 83:575-583.
- Bradley, J.E., Jackson, J.A. (2004) Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. **Parasite Immunol.** 26: 429 - 441.
- Bragg, A.N. (1945) The spadefoot toads in Oklahoma with a summary of our knowledge of the group II. **Am. Nat.** 79: 52–72.
- Brown, G.P., Kelehear, C., Shine, R. (2011a) Effects of seasonal aridity on the ecology and behaviour of invasive cane toads in the Australian wet–dry tropics. **Func Ecol.** 25: 1339 – 1347.

CAPÍTULO 2 - REFERÊNCIAS

- Brown, G.P., Shilton, C.M., Shine, R. (2011b) Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. **Met Ecol Evol.** 2(4): 341 – 348.
- Cadman, E. T., Lawrence R. A. (2010) Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? **Paras. Immunol.** 32(1): 1–19.
- Cartledge, V.A., Withers, P. C., Bradshaw S. D. (2008) Water Balance and Arginine Vasotocin in the Cocooning Frog *Cyclorana platycephala* (Hylidae) **Physiol Biochem Zool.** 81(1): 43-53.
- Carvalho, J.E., Navas, C.A., Pereira, I.C. (2009) Energy and water in aestivating amphibians. In: C.A. Navas, Carvalho, J.E., editors. **Aestivation: Molecular and Physiological Aspects**. Springer Heidelberg Dordrecht London, pp. 141-170.
- Cézilly, F., Gaillard, M., Théry, M., Salvadori, F., Préault, M., Faivre, B. (2002) Bill colour and immunocompetence in European blackbird. **Anim Behav.** 65:125-1131.
- Cei, J.M., Ibañez, N., Alvarez, B.B., Carnevali, O., Mosconi, G., Polzonetti-Magni, A.M. (1996) Divergent male androgen patterns in two sympatric species of *Leptodactylus* from subtropical South America. **Amphibia-Reptil.** 17:1-6.
- Chiesa, M.E., C.E. Rosenberg, N.E. Fink, A. Salibián. (2006) Serum protein profile and blood cell counts in adult toads *Bufo arenarum* (Amphibia: Anura: Bufonidae): Effects of sublethal lead acetate. **Arch Environm Contam Toxicol.** 50:384-391.
- Coppo, J.A., Mussart, N.B., Fioranelli, S.A., Zeinsteger, P.A. (2005) Blood and urine physiological values in captive bullfrog, *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). **Anal Vet.** 25 (1): 15 - 17.
- Crews, D. 1984. Gamete production, sex hormone secretion, and mating behavior uncoupled. **Horm Behav.** 18:22-28.
- Crews, D., Moore, M.C. (1987) Evolution of mechanisms controlling mating behavior. **Science** 231: 121–125.
- Damsgard, B., Mortensen, A., Sommer, A. (1998) Effects of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) on appetite and growth in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture** 163:185 – 193.

- Delgado, M.J., Gutierrez, P., Alonso Bedate, M. (1989) Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 73:1–11.
- A. K. Davis, D. L. Maney, J. C. Maerz (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Func Ecol.** 22: 760–772.
- Dezfuli, B. S., Giovinazzo, G., Lui, A., Giari, L. (2008) Inflammatory response to *Dentitruncus truttae* (Acanthocephala) in the intestine of brown trout. **Fish Shellfish Immunol.** 24: 726-733.
- Díaz, J.A., Alonso-gomez, A.L.; Delgado, M.J. (1994) Seasonal Variation of Gonadal Development, Sexual Steroids, and Lipid Reserves in a Population of the Lizard *Psammmodromus algirus*. **J Herpetol.** 28 (2): 199 - 205.
- Fokidis, H. B., Greiner, E. C., Deviche, P. (2008) Interspecific variation in avian blood parasites and haematology associated with urbanization in a desert habitat. **J Avian Biol.** 39: 300-310.
- French, S.S., DeNardo, D.F., Moore, M.C. (2007) Trade-Offs between the Reproductive and Immune Systems: Facultative Responses to Resources or Obligate Responses to Reproduction? **Am Natural.** 170(1):79-89.
- French, S.S., Moore, M.C. (2008) Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. **Gen Comp Endocrinol.** 155: 148 – 56.
- Goater, C. P., R.D. Semlitsch, and M.V. Bernasconi. (1993) Effects of body size and parasite infection on the locomotory performance of juvenile toads, *Bufo bufo*. **Oikos** 66:129-136.
- Goater, C.P., Ward, P.I. (1992) Negative effects of *Rhabdias bufonis* (Nematoda) on the growth and survival of toads (*Bufo bufo*). **Oecologia** 89:161 - 165.
- Gobush, K. S., Baker, J. D., Gulland, F. M. D. (2011) Effectiveness of an antihelminthic treatment in improving the body condition and survival of Hawaiian monk seals **Endang Species Res.** 15: 29–37.
- Goldman, B.D. (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanism of photoperiodic time measurement. **J Biol Rhythms.** 16: 283 - 301.
- Grossman, C.J. (1984) Regulation of the immune system by sex steroids. **Endocr Reviews.** 5:435-455.

- Harvey, L., Propper, C., Woodley, S., Moore, M. 1997. Reproductive endocrinology of the explosively breeding desert spadefoot toad, *Scaphiopus couchii*. **Gen Comp Endocrinol.** 105(1):102-13.
- Holmes, J.C., Zohar, S. (1990) Pathology and host behavior. In: Barnard CJ, Behnke JM, eds. **Parasitism and host behaviour**. London, UK: University of Nottingham. p. 34-63
- Hou, J., Zheng, W.F. (1988) Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice. **Intern J Immunopharmacol.** 10: 15-22.
- Huang, W. S., Lin, J.Y., Yu, J.Y.L. (1996) The male reproductive cycle of the toad, *Bufo bankorensis*, in Taiwan. **Zool. Stud.** 35:128–137.
- Huang, W. S., Lin, J.Y., Yu, J.Y.L. (1997) Male Reproductive Cycle of the Toad *Bufo melanostictus* in Taiwan Zoo. Sci. 14(3):497-503.
- Ilmonen, P., Hasselquist, D., Langefors, A., Wiehn, J. (2003) Stress, immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. **Oecologia.** 136: 148–154.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik. M. (2004) **Immunobiology: The immune system in health and disease**. New York, Garland Publishing. pp. 800.
- Kao, Y.H., Alexander, P.S., Yang, V.V.C., Yu, J.Y.L. (1993) Annual patterns of testicular development and activity in the Chinese bullfrog (*Rana rugulosa* Wiegmann). **Zool. Sci.** 10: 337–351.
- Kelehear, C. Webb, J.K. Shine, R. (2009) Rhabdias pseudosphaerocephala infection in Bufo marinus: lung nematodes reduce viability of metamorph cane toads. **Parasitology** 136: 919–927
- Ketterson, E.D., Nolan Jr., V. (1994) Hormones and life histories: an integrative approach. In: **Behavioral Mechanisms in Evolutionary Ecology**. Real, L. (ed.). University of Chicago Press, Chicago. 327-353 pp.
- Kirkova, Z., Petkov, P., Goundasheva, D. (2005) Clinical and haematological studies in dogs experimentally infected with *Trichuris vulpis*. **Bulg J Veter Med.** 8: 141 – 148.
- Kobayashi, T., Iwasawa, H. (1986) Effect of testosterone on spermatogenic process and sperm preservation in late autumn young *Rana nigromaculata*. **Zool Sci** 3:387–390.

- Krohmer, R.W., Grassman, M., Crews, D. (1987) Annual reproductive cycle in the male red-sided garter snake, *Thamnophis sirtalis parietalis*: field and laboratory studies. **Gen. Comp. Endocrinol.** 68, 64–75.
- Lofts, B. (1984) Amphibia. In: **Physiology of Reproduction. Reproductive cycles in Vertebrate**, vol. 1. Laming, G.E. (ed.) Churchill-Livingstone, Edinburgh, pp. 127–205.
- Lofts, B., (1987) Testicular function. In: **Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles**. Norris, D.O., Jones, R.E. (eds.), Plenum Press, New York, pp. 385–409.
- Long, D.R. (1997) A comparison of energy substrates and reproductive patterns of two anurans, *Acris crepitans* and *Bufo woodhousei* **Comp Biochem Physiol.** 87(1): 81 - 91.
- Loumbourdis, N.S.; Kyriakopoulou-Sklavounou, P. (1991) Reproductive and lipid cycles in the male frog *Rana ridibunda* in northern greece **Comp Biochem Physiol.** 99A(4): 577 - 593.
- Luque, J. L., Martins, A. N., Tavares, L. E. R. (2005) Community structure of metazoan parasites of the yellow Cururu toad, *Bufo ictericus* (Anura, Bufonidae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Parasitol.** 50: 215–220.
- Martin, T.E. (1987) Food as a Limit on Breeding Birds: A Life-History Perspective. **An Rev Ecol Syst.** 18: 453 - 487.
- Martin, L.B., Weil, Z.M., Nelson R.J. (2008). Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. **Phil Trans R Soc.** 363: 321 - 339.
- Mazerolle, M.J. (2006) Improving data analysis in herpetology: using Akaike's Information Criterion (AIC) to assess the strength of biological hypotheses. **Amphibia-Reptil.** 27: 169-180.
- Mills, S.C., Grapputo, A., Jokinen, I., Koskela, E., Mappes, T., Poikonen, T. (2010) Fitness trade-offs mediated by immunosuppression costs in a small mammal. **Evol.** 64 (1):166 – 179.
- Minucci, S., Di Matteo, L., Fasano, S., Baccari, G.C., Pierantoni, R. (1992) Intratesticular control of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta*. **J. Exp. Zool.** 264:113–118.
- Moore, F.L., Boydb, S.K., Kelleyc, D.B. (2005) Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. **Horm Behav.** 48:373 – 383.

- Naya, D.E., Veloso, C., Bozinovic, F. (2008) Physiological Xexibility in the Andean lizard *Liolaemus bellii*: seasonal changes in energy acquisition, storage and expenditure **J Comp Physiol B**. 178:1007–1015.
- Neji, H., De la Noue, J. (1998) Effect of animal and vegetal protein diets on feed intake and apparent digestibility of nutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*, with and without chronic hypoxia stress. **Can J Fish Aquat Sci**. 55:2019 – 2027.
- Nelson, R. J., Demas, G. E., Klien, S. L., Kriegsfeld, L. J. (2002) **Seasonal patterns of stress, immune function and disease**. Cambridge, Cambridge University Press. p.287.
- Nelson, R. J. (2004) Seasonal immune function and sickness responses. **Trends Immunol**. 25: 187 – 192.
- Norris K., Evans M.R. (2000) Ecological immunology: life-history trade-offs and immune defence in birds. **Behav Ecol**. 11:19–26
- Norton, J., Wira, C.R. (1977) Dose-related effects of the sex hormones and cortisol on the growth of the bursa of fabricius in chick embryos. **J Ster Biochem**. 8:985-987.
- Nordling, D., Andersson, M. Zohari, S., Gustafsson, L. (1998) Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. **Proc R Soc Lond B**. 265:1291–1298.
- van Oordt, P.G.W.J. 1956. Regulation of the spermatogenetic cycle in the common frog (*Rana temporaria*). **Van der wiel, Arnhem, the Netherlands**. 1-30.
- Pereira, I.C. (2009) Aspectos fisiológicos e ecológicos da estivação em *Pleurodema diplostris* (Leiuperidae/Anura). Dissertação de mestrado do Depto de Fisiologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Poulin, R., George-Nascimento, M. (2007) The scaling of total parasite biomass with host body mass. **Int J Parasitol**. 37: 359 – 364.
- Qadir, S., Dixit¹, A.K., Dixit, P., Sharma, R.L. (2011) Intestinal helminths induce haematological changes in dogs from Jabalpur, India. **J Helmint**. 85: 401–403.
- Rastogi, R.K., Iela, L., Saxena, P.K., Chieffi, G., (1976) The control of spermatogenesis in the green frog, *Rana esculenta*. **J. Exp. Zool**. 196: 151–166.
- Rastogi, R.K., Iela, L., Delrio, G., Bagnara, J.T., (1986) Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*, II. The male. **Gen. Comp. Endocrinol**. 62:23–35.

- Rastogi, R.K., Iela, L. (1992) Spermatogenesis in Amphibia: dynamics and regulation. In: **Sex: Origin and Evolution. Selected Symposia and Monographs U.Z.I., 6.** Dalli, R. (ed.), Mucchi, Modena, pp. 231–249.
- Rodrigues, M.T. (2003) Herpetofauna da Caatinga. In: **Ecologia e Conservação da Caatinga.** Leal, I.R., Tabarelli, M., Silva, J.M.C. (eds.). Editora Universitária da UFPE, pp. 181-236.
- Shoemaker, V.H., Hillman, S.S., Hillyard, S.D., Jackson, D.C., McClanahan, L.L., Withers, P.C., Wygoda, M.L. (1992) Exchange of water, ions, and respiratory gases in terrestrial amphibians. In: **Environmental Physiology of the Amphibians**, Feder, M.E., and W.W. Burggren (eds.), University of Chicago Press. pp 395-436.
- Tanaka, S., Sakai, M., Hattori, M., Kikuyama, S., Wakabayashi, K., Hanaokad, Y. (2004) Effect of bullfrog LH and FSH on newt testes under different temperatures **Gen. Comp. Endocrin.** 138: 1–7.
- Tinsley, R.C. (1990) The influence of parasite infestation on mating success in spadefoot toads, *Scaphiopus couchii*. **Am Zool.** 30:313-324.
- Tizard, I.R. (1996) **Veterinary immunology: an introduction.** Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 315–330.
- Tocque, K. (1993) The Relationship between parasite burden and host resources in the desert toad (*Scaphiopus couchii*), under natural environmental conditions. **J Anim Ecol.** 62(4): 683-693.
- Verhulst, S., Dieleman, S.J., Parmentier, H.K. (1999) A tradeoff between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl. **Proc Natl Acad Sci USA.** 96: 4478-4481.
- Vicente, J., Pérez-Rodríguez, L., Gortázar, C. (2007) Sex, age, spleen size, and kidney fat of red deer relative to infection intensities of the lungworm *Elaphostrongylus cervi*. **Naturwissenschaften.** 94: 581-587.
- Vicente, J.J., Rodrigues, H.O., Gomes, D.C., Pinto, R.M. (1990) Nematódeos do Brasil. Parte II: Nematódeos de anfíbios. **Rev Brasil Zool.** 7(1): 549-626.
- Saidapur, S. K. 1983. Patterns of testicular activity in Indian amphibians. **Indian Rew. Life. Sci.** 3:157–184.
- Santos, V. G. T., Amato, S. B. (2010) Helminth Fauna of *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) from the Rio Grande do Sul Coastland, Brazil: Analysis of the Parasite Community. **Parasitology.** 96(4): 823 - 826.

- Schmid-Hempel, P. (2003) Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. **Proc R Soc B: Biol Sci.** 270: 357 - 366.
- Shalan, A.G., Bradshaw, S.D., Withers, P.C., Thompson, G., Bayomy, M.F.F., Bradshaw, F.J., Stewart T. (2004) Spermatogenesis and plasma testosterone levels in Western Australian burrowing desert frogs, *Cyclorana platycephala*, *Cyclorana maini*, and *Neobatrachus sutor*, during aestivation **Gen. Comp. Endoc.** 136: 90–100.
- Souza, S.C.R., Carvalho, J.E., Abe, A.S., Bicudo, J.E.P.W. and Bianconcini, M.S.C. (2004) Seasonal metabolic depression, substrate utilization and changes in scaling patters during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). **J Exp Biol.** 207(2): 307 -318.
- Sukhdeo, M.V.K., Sukhdeo S.C., Bansemir, A.D. (2002) Interactions between Intestinal Nematodes and Vertebrate Hosts. In: **Behavior ecology of parasites.** Lewis, E., Campbell, J.F., Sukhdeo, M.V.K. (eds.). CABI Publishing, New york. 223-242 pp.
- Waweru, J.G., Kanyari, P.W.N., Mwangi1, D.M., Ngatia, T.A., Nansen P. (1999) Comparative parasitological and haematological changes in two breeds of sheep infected with *Fasciola gigantica*. **Trop Ani Heal Produc.** 31: 363-372.
- Wedemeyer, J., Tsai, M., Galli, S.J. (1999) Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. **Cur Opin Immun.** 11(1): 53 – 59.
- Weinstein, Y., Ran, S., Segal, S. (1984) Sex-associated differences in the regulation of immune response controlled by the MHC of the mouse. **J Immunol.** 132:656-661.
- Wells KD. 2001. The energetics of calling in frogs. In: Ryan MJ, editor. **Anuran communication.** Washington, DC: Smithsonian Institute Press, p. 45–60
- Wells K.D. 2007. Metabolism and Energetics. In: **The ecology and behavior of amphibians.** The university of Chicago Press, p. 184-229.
- Wilczynski W, Lynch KS, O'Bryant EL (2005) Current research in amphibians: Studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. **Horm Behav.** 48: 440 - 450.
- Whittier, J.M., Crews, D. (1987) Seasonal reproduction patterns and control. In: **Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles.** Norris, D.O., Jones, R.E. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 385–409.

CAPÍTULO 2 - REFERÊNCIAS

- Withers, P.C. (1993) Cocoon Formation and Structure in the Estivating Australian Desert Frogs, *Neobatrachus* and *Cyclorana*. **Aust J Zool.** 43(5): 429 – 441.
- Withers, P.C., Guppy, M. (1996) Do Australian desert frogs co-accumulate counteracting solutes with urea during aestivation? **J Exp Biol.** 199: 1809 - 1816.
- Zuk, M., Stoehr, A.M. (2002) Immune defense and host life history. **Amer. Natur.** 160: 9 - 22.

CAPÍTULO 2 - TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Análise descritiva de variáveis morfológicas, contagem total e diferencial de leucócitos e volume globular de *Rhinella jimi*.

Variáveis	Entre chuvas			Chuvas			Seca		
	N	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão
Massa (g)	16	335,47	98,39	8	262,04	54,54	18	121,16	43,05
CRC (mm)	17	154,75	78,07	12	144,72	12,27	16	106,71	10,92
Conteúdo estomacal (g)	17	3,0517	6,3440	12	0,3724	0,6687	18	1,0487	1,8658
Corpos gordurosos (g)	17	15,95	8,39	12	10,46	11,85	18	4,36	3,46
Baço (g)	16	0,1209	0,0913	11	0,1363	0,0731	17	0,0902	0,0842
Leucócitos/ μ l	13	53372	31245	11	26308	13274	16	21138	6599
Volume globular (%)	12	27,40	16,73	6	28,90	9,01	14	20,36	16,08
Neutrófilo	7	28,4	8,9	10	23,7	5,1	10	28,7	6,0
Linfócito	7	52,8	5,6	10	53,1	5,11	10	60,5	7,15
Relação N/L	7	0,56	0,24	10	0,45	0,13	10	0,49	0,15
Eosinófilo	7	13,7	6,45	10	14,9	4,9	10	6,8	4,2
Basófilo	7	1,71	1,38	10	5,0	3,3	10	2,3	1,8
Monócito	7	2,86	1,86	10	3,3	2,2	10	1,4	1,4
DCE	4	164,7	10,4	4	168,2	11,3	5	124,1	14,1

CRC = Comprimento rostro-cloacal, Relação N/L = relação neutrófilos/linfócitos, DCE = Diâmetro do cisto germinativo.

CAPÍTULO 2 - TABELAS E FIGURAS

Tabela 2. Análise descritiva de variáveis morfológicas, contagem total e diferencial de leucócitos e volume globular de *Rhinella granulosa*.

Variáveis	Entre chuvas			Chuvas			Seca		
	N	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão
Massa (g)	11	11,00	4,30	27	6,93	2,22	21	5,33	1,36
CRC (mm)	11	48,20	6,60	27	43,85	4,19	21	40,01	3,22
Conteúdo estomacal (g)	11	0,1200	0,1113	27	0,0978	0,1176	21	0,0815	0,0912
Corpos gordurosos (g)	11	0,4718	0,3680	27	0,1139	0,1504	21	0,2144	0,0828
Baço (g)	9	0,0032	0,0025	13	0,0009	0,0015	20	0,0028	0,0043
Leucócitos/ μ l	6	22629	10831	30	21222	13369	14	7315	4812
Volume globular (%)	3	30,87	9,87	30	21,46	8,76	6	18,48	6,26
Neutrófilo	7	28,8	8,82	10	30,4	4,4	9	31,1	5,7
Linfócito	7	54,0	6,90	10	51,9	11,8	9	57,8	7,05
Relação N/L	7	0,55	0,22	10	0,63	0,23	9	0,55	0,14
Eosinófilo	7	12,8	9,5	10	4,5	5,38	9	4,25	4,09
Basófilo	7	2,0	1,41	10	8,4	4,17	9	4,5	2,13
Monócito	7	2,29	1,98	10	4,8	3,49	9	2,5	1,41
DCE	5	108,8	6,2	3	106,4	15,8	5	68,0	14,4

CRC = Comprimento rostro-cloacal, Relação N/L = relação neutrófilos/linfócitos, DCE = Diâmetro do cisto germinativo.

Tabela 3. Análise descritiva de variáveis morfológicas, contagem total e diferencial de leucócitos e volume globular de *Pleurodema dipolister*.

Variáveis	Chuvas			Seca		
	N	Média	Desvio Padrão	N	Média	Desvio Padrão
Massa (g)	26	4,07	0,77	14	2,40	0,72
CRC (mm)	26	31,02	2,49	12	26,22	3,64
Conteúdo estomacal (g)	22	0,1010	0,1030	14	0,0057	0,0051
Corpos gordurosos (g)	24	0,0478	0,0456	15	0,1051	0,0619
Baço (g)	-	-	-	14	0,00044	0,00036
Leucócitos/ μ l	13	19138	11924	15	5767	2682
Volume globular (%)	10	23,22	9,53	11	15,18	5,22
Neutrófilo	11	33,4	5,68	10	29,4	5,8
Linfócito	11	59,6	6,7	10	65,3	6,53
Relação N/L	11	0,58	0,15	10	0,46	0,13
Eosinófilo	11	0,72	1,27	10	2,5	2,27
Basófilo	11	2,72	1,61	10	1,9	1,19
Monócito	11	3,54	1,43	10	0,9	1,28
DCE	2	109,6	15,6	3	52,1	8,4

CRC = Comprimento rostro-cloacal, Relação N/L = relação neutrófilos/linfócitos, DCE = Diâmetro do cisto germinativo.

CAPÍTULO 2 - TABELAS E FIGURAS

Tabela 4. Modelos selecionados para variáveis morfológicas, contagem total e diferencial de leucócitos e volume globular de *Rhinella jimi*.

Modelos selecionados	AICc	gl	dAICc	AICweight
Conteúdo estomacal ~ M + P	30.0	4	0.0	0.33469
Conteúdo estomacal ~ M * P	31.1	5	1.0	0.19880
Conteúdo estomacal ~ P + E	31.5	5	1.5	0.15823
Conteúdo estomacal ~ M + P + E	31.9	6	1.9	0.13177
Corpos gordurosos ~ M + E	50.3	5	0.0	0.73706
Baço ~ M	4.2	3	0.0	0.65472
Índice corpóreo ~ E	371.0	4	0.0	0.7424
Leucócitos total ~ M * P	0.6	5	0.0	0.77549
Volume globular ~ M + E	1.1	5	0.0	0.44582
Neutrófilo ~ 1	-35.7	2	0.0	0.47574
Linfócito ~ M	-71.5	3	0.0	0.47120
Relação N/L ~ 1	-21.0	2	0.0	0.53463
Eosinófilo ~ M	9.4	3	0.0	0.64185
Basófilo ~ 1	12.9	2	0.0	0.38530
Basófilo ~ E	14.3	4	1.4	0.19055
Monócito ~ E	5.0	4	0.0	0.33734
Monócito ~ M	5.5	3	0.5	0.26325
Monócito ~ 1	7.0	2	2.0	0.12111

gl = graus de liberdade; P totais = parasitas totais; M = massa; E = período; Relação N/L = Relação neutrófilo/linfócito.

CAPÍTULO 2 - TABELAS E FIGURAS

Tabela 5. Modelos selecionados para variáveis morfológicas, contagem total e diferencial de leucócitos e volume globular de *Rhinella granulosa*.

Modelos selecionados	AICc	Gl	dAICc	AICweight
Conteúdo estomacal ~ M + E	99.1	5	0.0	0.65432
Corpos gordurosos ~ M + E	52.4	5	0.0	0.623
Corpos gordurosos ~ E + M * P	53.9	6	1.5	0.292
Baço ~ M + P + E	57.7	6	0.0	0.4792
Baço ~ M * P + E	58.4	5	0.7	0.3332
Índice corpóreo ~ E	225.4	4	0.0	0.7658
Leucócitos total ~ E	13.8	4	0.0	0.30150
Leucócitos total ~ M + E	14.2	5	0.4	0.25265
Leucócitos total ~ E + M * P	14.3	7	0.4	0.24278
Leucócitos total ~ P + E	15.8	5	1.9	0.11418
Volume globular ~ 1	-11.1	2	0.0	0.33312
Volume globular ~ M	-9.9	3	1.1	0.19076
Volume globular ~ P	-9.4	3	1.7	0.14596
Volume globular ~ E	-9.3	4	1.7	0.14078
Neutrófilo ~ 1	-47.9	2	0.0	0.54649
Linfócito ~ 1	-55.3	2	0.0	0.38174
Linfócito ~ P	-54.0	3	1.3	0.20102
Linfócito ~ M	-53.3	3	1.8	0.15264
Relação N/L ~ 1	-23.3	2	0.0	0.49219
Relação N/L ~ P	-21.3	3	2.0	0.18415
Eosinófilo ~ P + E	26.0	5	0.0	0.35473
Eosinófilo ~ E	26.5	4	0.5	0.28195
Eosinófilo ~ M + P + E	27.7	6	1.7	0.13930
Basófilo ~ E	-3.2	4	0.0	0.4446
Basófilo ~ M + E	-2.1	5	1.0	0.2373
Basófilo E + M * P	-1.7	7	1.5	0.1882
Monócito ~ 1	10.2	2	0.0	0.35089
Monócito ~ E	11.3	4	1.1	0.20154

gl = graus de liberdade; gl = graus de liberdade; Ptotais = parasitas totais;
M = massa; E = período; Relação N/L = Relação neutrófilo/linfócito.

CAPÍTULO 2 - TABELAS E FIGURAS

Tabela 6. Modelos selecionados para variáveis morfológicas, contagem total e diferencial de leucócitos e volume globular de *Pleurodema diplolister*.

Modelos selecionados	AICc	gl	dAICc	AICweight
Conteúdo estomacal ~ E	67.8	3	0.0	0.3826
Conteúdo estomacal ~ P + E	68.2	4	0.4	0.3140
Corpos gordurosos ~ E	47.4	3	0.0	0.41022
Corpos gordurosos ~ M + E	48.0	4	0.5	0.31174
Baço ~ 1	19.8	2	0.0	0.5052
Baço ~ P	21.4	3	1.7	0.2177
Índice corpóreo ~ 1	73.1	2	0.0	0.5804
Leucócitos ~ E	7.8	3	0.0	0.48097
Leucócitos ~ P + E	9.5	4	1.6	0.21140
Leucócitos ~ M + E	9.9	4	2.0	0.17417
Volume globular ~ E	-2.4	3	0.0	0.33356
Volume globular ~ 1	-1.6	2	0.7	0.23021
Volume globular ~ M	-0.7	3	1.6	0.14824
Neutrófilo ~ M	-39.7	3	0.0	0.34357
Neutrófilo ~ 1	-38.5	2	1.3	0.18230
Neutrófilo ~ E	-38.4	3	1.3	0.17558
Linfócito ~ E	-60.2	3	0.0	0.25477
Linfócito ~ P	-59.7	3	0.5	0.19808
Linfócito ~ 1	-59.6	2	0.6	0.19251
Linfócito ~ M	-59.3	3	0.9	0.16260
Relação N/L ~ M	-20.7	3	0.0	0.27919
Relação N/L ~ E	-20.2	3	0.5	0.21672
Relação N/L ~ 1	-19.9	2	0.8	0.18626
Relação N/L ~ P	-19.0	3	1.7	0.12086
Eosinófilo ~ M	7.9	3	0.0	0.36553
Eosinófilo ~ E	8.5	3	0.6	0.26816
Basófilo ~ M * P	-6.8	5	0.0	0.70033
Monócito ~ E	-3.3	3	0.0	0.58994

gl = graus de liberdade; gl = graus de liberdade; P totais = parasitas totais; M = massa; E = período; Relação N/L = Relação neutrófilo/linfócito.

Figura 1. Índice corpóreo de *Rhinella jimi*, nos períodos entre chuvas, chuvas e seca.

Figura 2. Massa de corpos gordurosos de *Rhinella granulosa*, nos períodos entre chuvas, chuvas e seca.

Figura 3. Índice corpóreo de *Rhinella granulosa*, nos períodos entre chuvas, chuvas e seca.

Figura 4. Massa de corpos gordurosos de *Pleurodema diplolister*, nos períodos chuvas e seca.

Figura 5. Espermatogênese no período de seca em machos de *Rhinella granulosa*. **A)** Visão geral do lobo testicular, cistos germinativos (CG) **B)** Cistos germinativos com predominância de espermatogonia (SG) e espermátides (SD).

Figura 6. Espermatogênese no período de seca em machos de *Rhinella jimi*. Cistos germinativos com predominância de espermatogonia (SG) e espermátides (SD).

Figura 7. Espermatogênese no período de seca em machos de *Pleurodema diplolister*. Cistos germinativos com predominância de espermatogonia (SG) e espermátides (SD).

Figura 8. Espermatogênese no período entre chuvas em machos de *Rhinella granulosa*. **A)** Visão geral do lobo testicular em espermatogênese ativa, cistos germinativos (CG) **B)** Cistos germinativos com predominância de espermatócitos (SC) e espermatídes (SD).

Figura 9. Espermatogênese no período entre chuvas em machos de *Rhinella jimi*. **A)** Visão geral do lobo testicular em espermatogênese ativa, cistos germinativos (CG) **B)** Cistos germinativos com predominância de espermatócitos (SC) e espermatídes (SD).

Figura 10. Espermatogênese no período de chuvas em machos de *Rhinella granulosa*. A) Visão geral do lobo testicular após o evento de espermição, cistos germinativos (CG) B) Cistos germinativos com predominância de espermatozoides (SZ).

Figura 11. Espermatogênese no período de chuvas em machos de *Rhinella jimi*. Cistos germinativos com predominância de espermatozoides (SZ).

Figura 12. Espermatogênese no período de chuvas em machos de *Pleurodema diplolister*. Cistos germinativos com predominância de espermatozoides (SZ).

Figura 13. Diâmetro do cisto germinativo de *Rhinella jimi*, nos períodos entre chuvas, chuvas e seca. Barras representam desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P \geq 0,05$).

Figura 14. Diâmetro do cisto germinativo de *Rhinella granulosa*, nos períodos entre chuvas, chuvas e seca. Barras representam desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas. $P \geq 0,05$).

Figura 15. Diâmetro do cisto germinativo de *Pleurodema diplolister*, nos períodos de chuva e seca. Barras representam desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas $P \geq 0,05$).

Figura 16. Relação entre conteúdo estomacal e parasitas totais de *Rhinella jimi*. A linha de tendência é ilustrativa.

Figura 17. Relação entre leucócitos totais e parasitas totais de *Rhinella jimi*. A linha de tendência é ilustrativa.

Figura 18. Relação entre massa do baço e parasitas totais de *Rhinella granulosa*. A linha de tendência é ilustrativa.

Figura 19. Relação entre leucócitos totais e parasitas totais de *Rhinella granulosa*. A linha de tendência é ilustrativa.

Figura 20. Relação entre leucócitos totais e parasitas totais de *Pleurodema dipolister*. A linha de tendência é ilustrativa.

Figura 21. Relação entre número de basófilos e parasitas totais de *Pleurodema diplolister*. A linha de tendência é ilustrativa.

Considerações finais

Este estudo apresenta registros inéditos de helmintofauna para *R. jimi* e *P. diplolister*; e registro inédito da helmintofauna de *R. granulosa* na região semi-árida brasileira, contribuindo para o inventário da helmintofauna dos anuros brasileiros e distribuição geográfica dessas espécies de parasitas.

Não houve diferenças dos parâmetros parasitológicos entre os períodos para as duas espécies de *Rhinella*, sugerindo que os animais apresentam ajustes fisiológicos e imunológicos em resposta à pressão por parasitas, para que as prevalências e intensidade de infecção permaneçam constantes ao longo do ano. No entanto, para duas espécies de parasitas houve diferenças entre os períodos, sugerindo que a ecologia de infecção é um fator que resulta em diferenças de prevalência e intensidade de infecção. Além disso, durante a temporada reprodutiva, apenas um indivíduo de *P. diplolister* apresentou um helminto e durante a seca houve maior prevalência de infecção, sugerindo que os parasitas adquiridos durante o período de atividade podem afetar os hospedeiros durante a estivação, de forma que somente os indivíduos livres de parasitas consigam emergir para temporada reprodutiva. No entanto, esta hipótese permanece para ser testada. De acordo com a hipótese de trabalho, *R. jimi* e *R. granulosa* apresentaram maiores prevalências e intensidade de infecção quando comparados com *P. diplolister*. No entanto, essas diferenças interespecíficas pode ser devido aos padrões de atividade das espécies, bem como devido a distância filogenéticas entre elas.

Este estudo demonstrou que as espécies de anuros da caatinga estudadas apresentam variações fisiológicas e imunológicas ao longo dos diferentes períodos do ciclo reprodutivo e associadas a infecção parasitária. Durante a seca, *R. granulosa*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

apresentou menor contagem de leucócitos totais e *R. jimi* apresentou menor número de monócitos, possivelmente indicando um menor investimento em imunidade ou menor exposição a patógenos nesse período. *Pleurodema diplolister* apresentou menor número de leucócitos, resultado que integra a economia energética durante a estivação, e maior número de eosinófilos, possivelmente associado a maior intensidade parasitária nesse período.

As três espécies de anuros apresentaram evidências de redução das reservas energéticas associadas ao elevado custo durante o período reprodutivo, sendo expressa através de redução da quantidade de corpos gordurosos e/ou do índice corpóreo durante a atividade vocal no período chuvoso. Diferenças interespecíficas de variação das reversas energéticas ao longo do ciclo reprodutivo podem estar associadas a diferentes padrões de atividade vocal, mas estas possíveis associações permanecem como hipóteses a serem testadas.

Os testículos das três espécies apresentaram padrões similares de maturação nos períodos analisados. Durante o período de seca os testículos apresentaram-se maduros para a reprodução, evidenciando um padrão de reprodução oportunista, típico de espécies que ocupam ambiente árido e que se reproduzem mediante o estímulo de chuvas. Além disso, somente durante o período de chuva foram encontrados espermatozóides no lúmen do cisto germinativo, evidenciando que o processo de espermição deve ocorrer em resposta ao estímulo da chuva. No entanto, os mecanismos que desencadeiam a maturação testicular nas espécies de anuros da caatinga durante a seca só podem ser desvendados por meio de acompanhamento da

CONSIDERAÇÕES FINAIS

covariação entre dosagens de testosterona e gonadotropinas e da maturação testicular ao longo dos meses do ano, além de experimentação hormonal.

As três espécies apresentaram correlações entre parâmetros fisiológicos, imunitários e número de parasitas, possivelmente em resposta a infecção causada pelos helmintos. *Rhinella jimi* apresentou menor conteúdo estomacal; *R. granulosa* apresentou maior massa esplênica, as duas espécies de *Rhinella* apresentaram menor número de leucócitos totais e *P. diplolister* maior número de leucócitos totais, quanto maior a intensidade parasitária total. No entanto, experimentos envolvendo desafios imunológicos e infecção experimental por parasitas seriam necessários para um maior esclarecimento das relações causais entre intensidade parasitária e alterações da quantidade de leucócitos circulantes, bem como das diferenças interespecíficas observadas.