Bruna de Oliveira Cassettari

**Relações entre comportamento vocal, imunidade
e níveis plasmáticos de corticosterona e
testosterona em sapos (*Rhinella granulosa*)**

**São Paulo
2016**

Bruna de Oliveira Cassettari

Relações entre comportamento vocal, imunidade e níveis
plasmáticos de corticosterona e testosterona em sapos
(*Rhinella granulosa*)

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes

São Paulo
2016

Cassettari, Bruna de Oliveira.

Relações entre comportamento vocal,
imunidade e níveis plasmáticos de
corticosterona e testosterona em sapos
(*Rhinella granulosa*)

69 páginas

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

1. Vocalização de anúncio 2.
Imunocompetência 3. Hormônios esteroides
4. Anfíbios I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

DEDICATÓRIA

À minha família e meu porto seguro,
Sônia, João e Fernanda

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Fernando, pelo incentivo, apoio, paciência e compreensão constantes e pelo exemplo profissional.
- À Carla Madelaire (Skol), pela ajuda e contribuições essenciais em todas as etapas dessa trajetória do mestrado e para minha formação profissional.
- Ao técnico Eduardo Braga, pelo auxílio fundamental no laboratório e por todas as conversas.
- Ao Sr Assis e à Dona Neci, e a todos da fazenda São Miguel, por sempre me receberem com tanto carinho e cuidado nas atividades de campo.
- À Ana Paula, pela ajuda em coleta, e à Melina e à Vivian, pela ajuda com as análises estatísticas.
- À Roseli e aos funcionários da secretaria de pós-graduação (Gilmar, Érika e Lilian), pelo apoio e prontidão.
- Aos amigos e colegas de laboratório (Skol, Mary, Dri, Jessy, Popetar, Fari, Zuza, Vânia e Stefanny), pela convivência, conversas e pelo apoio em diferentes momentos dessa trajetória.
- Aos amigos e colegas da "Fisio" (Elisa, Renata, Leopoldo, Marcelo, Camila, Chucho, Juan, Débora, Priscilla, Jaque, Toninho, Gabi...) pelas ricas discussões em reuniões, cafés ou churrascos, que colaboraram muito para meu amadurecimento profissional e pessoal.
- À Lu, pela amizade e companheirismo - sem um lar como construímos, tudo seria bem mais difícil.
- Ao Silvio, por me mostrar os primeiros passos da vida de "sapóloga" e me incentivar nesse caminho.

A cada uma das pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para meu desenvolvimento intelectual e pessoal ao longo desse processo: gratidão!

EPÍGRAFE

"Le savant n'étudie pas la nature parce que cela est utile; il l'étudie parce qu'il y prend plaisir et il y prend plaisir parce qu'elle est belle. Si la nature n'était pas belle, elle ne vaudrait pas la peine d'être connue, la vie ne vaudrait pas la peine d'être vécue."

(Henri Poincaré, 1908)

*(O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque tem prazer e ele tem prazer porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena conhecê-la, a vida não valeria a pena ser vivida.
– Tradução livre)*

O presente trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de bolsa de mestrado concedida à aluna Bruna de Oliveira Cassettari (processo 2013/10360-4) e do Auxílio regular à pesquisa (processo 2013/00900-1).

Os procedimentos realizados obtiveram autorização prévia do Comitê de Ética no Uso de Animais (IB/011/2014) e as coletas foram realizadas sob a licença de captura e transporte do IBAMA (Nº29896-1).

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	18
<i>Sítio de estudo e espécie incluída</i>	<i>18</i>
<i>Métodos de campo e condições de cativeiro</i>	<i>18</i>
<i>Desafio imunológico com fitohemaglutinina (PHA)</i>	<i>19</i>
<i>Contagem de parasitas e análise morfológica</i>	<i>20</i>
<i>Processamento das amostras de sangue</i>	<i>20</i>
<i>Dosagem hormonal</i>	<i>20</i>
<i>Capacidade bactericida plasmática (CBP)</i>	<i>21</i>
<i>Soluções hormonais</i>	<i>22</i>
<i>Aplicação hormonal transdérmica</i>	<i>22</i>
ANÁLISE DOS DADOS	24
1. <i>Desafio imunológico com fitohemaglutinina</i>	<i>24</i>
2. <i>Relações entre variáveis comportamentais, fisiológicas, morfológicas e ambientais</i>	<i>24</i>
3. <i>Relações entre variáveis comportamentais, hormonais e imunológicas</i>	<i>26</i>
4. <i>Análises dos dados experimentais</i>	<i>27</i>
RESULTADOS	28
1. <i>Desafio imunológico com fitohemaglutinina (PHA) em diferentes horários</i>	<i>28</i>
2. <i>Relações entre comportamento vocal, níveis plasmáticos de hormônios esteroides e imunocompetência</i>	<i>28</i>
2.a. <i>Relações entre variáveis fisiológicas, ambientais e morfológicas</i>	<i>28</i>
2.b. <i>Relações entre comportamento vocal, hormônios esteroides e imunocompetência</i>	<i>29</i>
3. <i>Manipulação hormonal</i>	<i>30</i>
DISCUSSÃO	32
<i>Resposta ao desafio imunológico com PHA em diferentes horários</i>	<i>32</i>
<i>Parâmetros ambientais, hormônios esteroides e atividade reprodutiva</i>	<i>33</i>
<i>Comportamento vocal, hormônios esteroides e imunidade</i>	<i>34</i>
CONCLUSÕES	41
FIGURAS E TABELAS	42
ANEXO A– Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	65

ANEXO B – <i>scripts</i> utilizados para análises estatísticas no programa R.....	66
ANEXO C – resultado completo da seleção de modelos para variáveis comportamentais, fisiológicas e ambientais em machos de <i>Rhinella</i> <i>granulosa</i> durante atividade reprodutiva.	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELOS ESTRUTURAIS CONSIDERANDO ESFORÇO VOCAL (EV), NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA (COR) E TESTOSTERONA (TES) E CAPACIDADE BACTERICIDA PLASMÁTICA (CBP) TESTADOS PARA MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	42
FIGURA 2 EDEMA APÓS INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE FITOHEMAGLUTININA (PHA) E SALINA. A) PROGRESSO DE EDEMA NAS 24 HORAS APÓS INJEÇÃO REALIZADA PELA MANHÃ; B) PROGRESSO DE EDEMA NAS 24 HORAS APÓS INJEÇÃO REALIZADA À NOITE; C) ALTERAÇÃO DE EDEMA APÓS INJEÇÃO DE PHA E SALINA CONSIDERANDO TODOS OS INDIVÍDUOS EXPERIMENTAIS.	43
FIGURA 3. FIGURA 3. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TESTOSTERONA E DIA DE COLETA EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	46
FIGURA 4. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TESTOSTERONA E UMIDADE RELATIVA DO AR EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	46
FIGURA 5. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA E DIA DE COLETA EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	46
FIGURA 6. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA E HORÁRIO DE COLETA EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA..	46
FIGURA 7. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA E TEMPERATURA DO AR EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	47
FIGURA 8. RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA E UMIDADE RELATIVA DO AR EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA	47
FIGURA 9. RELAÇÃO ENTRE DENSIDADE DO CORO E TEMPERATURA DA ÁGUA EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	47
FIGURA 10. RELAÇÃO ENTRE ESFORÇO VOCAL E TEMPERATURA DE AR EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	47
FIGURA 11. RELAÇÃO ENTRE ESFORÇO VOCAL E DIA DE COLETA EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	48
FIGURA 12. RELAÇÃO ENTRE ESFORÇO VOCAL E ÍNDICE CORPÓREO EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	48
FIGURA 13. MODELO 6, SELECIONADO PARA MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA, CONSIDERANDO EDEMA EM RESPOSTA À INJEÇÃO DE FITOHEMAGLUTININA COMO VARIÁVEL IMUNOLÓGICA.	51
FIGURA 14. MODELO 6, SELECIONADO PARA MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA, CONSIDERANDO NÚMERO DE NEMATÓDEOS COMO VARIÁVEL IMUNOLÓGICA.	51
FIGURA 15. MODELO 6, SELECIONADO PARA MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA, CONSIDERANDO CBP COMO VARIÁVEL IMUNOLÓGICA.	52
FIGURA 16. MODELO 2, SELECIONADO PARA MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA, CONSIDERANDO CBP COMO VARIÁVEL IMUNOLÓGICA.	52

FIGURA 17. RELAÇÃO ENTRE ESFORÇO VOCAL E CAPACIDADE BACTERICIDA PLASMÁTICA (CBP) CONSIDERANDO A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA EM MACHOS DE <i>R. GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.....	53
FIGURA 18. RELAÇÃO ENTRE TAXA E DURAÇÃO MÉDIA DE VOCALIZAÇÃO EM MACHOS DE <i>R. GRANULOSA</i> DURANTE A ATIVIDADE REPRODUTIVA.	53
FIGURA 19. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA 1H APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA DE ÓLEO DE GERGELIM (PLACEBO), E APÓS 3UG (TESTO-BAIXA) OU 12UG (TESTO-ALTA) DE TESTOSTERONA, EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i>	56
FIGURA 20. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA 10H APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA DE ÓLEO DE GERGELIM (PLACEBO), E APÓS 12UG (TESTO-ALTA) OU 3UG (TESTO-BAIXA) DE TESTOSTERONA, EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i>	56
FIGURA 21. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA DE 4,2µG DE CORTICOSTERONA, EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i>	56
FIGURA 22. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA DE 7µG DE CORTICOSTERONA, EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i>	56
FIGURA 23. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA 1H APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA DE ÓLEO DE GERGELIM (PLACEBO), E APÓS 4,2µG (CORT-BAIXA) OU 7µG (CORT-ALTA) DE CORTICOSTERONA, EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i>	56
FIGURA 24. CAPACIDADE BACTERICIDA PLASMÁTICA (CBP) DE MACHOS DE <i>R. GRANULOSA</i> EM CAMPO E APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA DE 4,2µG DE CORTICOSTERONA.....	57
FIGURA 25. CAPACIDADE BACTERICIDA PLASMÁTICA (CBP) DE MACHOS DE <i>R. GRANULOSA</i> EM CAMPO E APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA DE 7µG DE CORTICOSTERONA.....	57
FIGURA 26. CAPACIDADE BACTERICIDA PLASMÁTICA (CBP) DE MACHOS DE <i>R. GRANULOSA</i> EM CAMPO E APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA DE 5µG DE ÓLEO DE GERGELIM.....	57
FIGURA 27. CAPACIDADE BACTERICIDA PLASMÁTICA (CBP) DE MACHOS DE <i>R. GRANULOSA</i> EM CAMPO E APÓS APLICAÇÃO TRANSDÉRMICA 12µG DE TESTOSTERONA.	57
FIGURA 28 RESPOSTA AO DESAFIO IMUNOLÓGICO COM FITOHEMAGLUTININA EM MACHOS DE <i>R. GRANULOSA</i> APÓS MANIPULAÇÃO HORMONAL..	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ESTATÍSTICA DESCRITIVA DE VARIÁVEIS AMBIENTAIS, COMPORTAMENTAIS, MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> EM ATIVIDADE REPRODUTIVA	44
TABELA 2. MODELOS SELECIONADOS, DENTRE OS PROPOSTOS NA SELEÇÃO DE MODELOS PARA VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS, FISIOLÓGICAS E AMBIENTAIS EM MACHOS DE <i>RHINELLA GRANULOSA</i> DURANTE ATIVIDADE REPRODUTIVA.....	45
TABELA 3. RESULTADOS DAS ANÁLISES DE SEM PARA CADA UMA DAS VARIÁVEIS IMUNOLÓGICAS..	49
TABELA 4. ESTATÍSTICA DESCRITIVA PARA VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS DE MACHOS DE <i>R. GRANULOSA</i> SUBMETIDOS A EXPERIMENTO DE MANIPULAÇÃO HORMONAL.	54

RESUMO

A exibição do comportamento vocal em muitas espécies de anfíbios anuros é relacionada aos níveis de hormônios esteroides gonadais e interrenais. Esses hormônios poderiam mediar a relação entre intensidade de sinais e imunidade, pois estão envolvidos no desenvolvimento das características sexuais secundárias, comportamento de corte e mobilização de reservas energéticas durante a atividade reprodutiva, enquanto apresentam também efeitos imunomoduladores. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi explorar as relações entre comportamento reprodutivo, imunidade e níveis plasmáticos de testosterona e corticosterona em machos do sapo do semiárido brasileiro, *Rhinella granulosa*, em atividade reprodutiva e após manipulação hormonal. A precipitação foi o principal determinante ambiental para o aumento dos níveis de testosterona e corticosterona circulantes em machos de *R. granulosa*, estimulando o comportamento de vocalização. As relações fisiológicas encontradas indicam que os altos níveis plasmáticos de testosterona nos primeiros dias após a chuva devem promover o início do turno vocal, porém a corticosterona deve modular o esforço de vocalização. De forma geral, a exacerbação do comportamento vocal de *R. granulosa* tem efeitos negativos sobre a imunocompetência, porém alguns indivíduos que apresentam maiores concentrações plasmáticas de corticosterona apresentam concomitantemente alto esforço vocal e alta imunidade. De acordo, a aplicação transdérmica de corticosterona promoveu elevação aguda dos níveis plasmáticos deste glicocorticoide, bem como um aumento da função imune. Assim, apesar de a atenção principal ser comumente colocada no papel da testosterona na mediação de sinais honestos, nossos resultados corroboram a importância da corticosterona na mediação da expressão do comportamento de corte e imunocompetência em machos *R. granulosa*.

Palavras-chave: Vocalização de anúncio; imunocompetência; hormônios esteroides; anfíbios

ABSTRACT

In most anuran species, vocal behavior is usually related to plasmatic levels of gonadal and interrenal steroid hormones. These hormones could mediate the relationship between signal intensity and immunocompetence, since they are involved in the development of sexual traits, courtship behavior and energetic mobilization during reproductive activity and also exert immunomodulatory effects. The aim of this study was to explore relations among vocal behavior, immunity and plasmatic levels of testosterone and corticosterone in males of a toad species from Brazilian semi-arid, *Rhinella granulosa*, during reproductive activity and after hormonal manipulation. Precipitation was the main environmental determinant to increase circulating levels of testosterone and corticosterone in *R. granulosa* males, stimulating vocal behavior. Physiological relations indicate that high circulating testosterone levels in the days right after rain may promote the initiation of vocal behavior, while corticosterone may modulate vocal effort. In general, exacerbation of vocal behavior in *R. granulosa* has negative effects on immunocompetence, however, some individuals with higher plasmatic levels of corticosterone can present both high vocal effort and good immunocompetence. Corroborating this interpretation, acute increase in glucocorticoid plasmatic levels after hormonal manipulation was accompanied by raised immune function. Despite the emphasis on androgens influence on sexual selected male traits, our results corroborate greater influence of corticosterone in the mediation of expression of courtship behavior and immunocompetence in *R. granulosa*.

Key-word: Announcement vocalization; immunocompetence; steroid hormones; amphibian

INTRODUÇÃO

Interações sociais intra e interespecíficas entre organismos são mediadas por sinais que informam características individuais. Tais sinais devem ser informativos da condição do seu emissor no contexto social e ambiental no qual ele está inserido (Folstad & Karter, 1992; Vitousek, Zonana & Safran, 2014). Fêmeas pertencentes a grupos filogeneticamente muito diversos acasalam-se preferencialmente com machos que apresentam caracteres sexuais secundários estruturais e/ou comportamentais exacerbados (Zahavi, 1975; Andersson, 1994). Uma possível explicação para essa seleção, especialmente quando os machos não provêm benefícios diretos às fêmeas e sua descendência, é que as características exacerbadas selecionadas sinalizariam a qualidade genética de seus portadores (Zahavi, 1975). Segundo a hipótese de seleção sexual mediada por parasitas (Hamilton & Zuk, 1982), variações nas características sexuais secundárias, como o comportamento de corte, refletem a qualidade genética relacionada à resistência a parasitas, subsidiando a seleção intersexual.

A exibição desses fenótipos sujeitos à seleção poderia ser intrinsecamente relacionada à condição fisiológica do indivíduo. Nesse sentido, os andrógenos, especialmente a testosterona, são atualmente propostos como importantes mediadores da evolução por seleção sexual (Folstad & Karter, 1992). A hipótese proposta por Folstad e Karter (1992) assume que há um compromisso (*trade-off*) associado aos níveis plasmáticos desses esteroides, uma vez que a testosterona promove o desenvolvimento de características sexuais secundárias e o comportamento de corte, ao mesmo tempo em que apresenta diversos efeitos imunossupressores (Muehlenbein & Bribiescas, 2005). A testosterona promove a involução do timo e redução de outros tecidos linfoides em mamíferos e da bursa de Fabricius em aves, além de reduzir a imunidade humoral e a mediada por células (Norton & Wira, 1977; Weinstein, Ran & Segal, 1984; Ahmed, Dauphinee & Talal, 1985; Hou & Zheng, 1988; Muehlenbein & Bribiescas, 2005). Assim, a seleção de características morfológicas e comportamentais mediadas por andrógenos no macho envolveria a identificação de sinais honestos quanto à sua qualidade genética pela fêmea (Zahavi, 1975; Hamilton & Zuk, 1982; Folstad & Karter, 1992).

Além dos andrógenos, os níveis plasmáticos de glicocorticoides também apresentam papel relevante na mediação de sinais de corte quando estes demandam custo

energético apreciável e, recentemente, tem seus efeitos também considerados nas hipóteses de seleção sexual (Wingfield & Sapolsky, 2003; Angelier & Wingfield, 2013; Leary & Knapp, 2014). Esses esteroides se apresentam em níveis plasmáticos elevados durante a temporada reprodutiva em machos de muitos vertebrados, possivelmente, devido ao alto custo energético da manutenção do comportamento reprodutivo (Romero, 2002; Moore & Jessop, 2003). Os glicocorticoides atuam na mobilização de reservas energéticas, principalmente lipídios e proteínas, e estimulam a gliconeogênese, principalmente em mamíferos (Norris, 2007). Paralelamente, os glicocorticoides apresentam uma relação complexa com a função imune, dependente de fatores como a concentração destes esteroides na corrente sanguínea, se a elevação dos níveis circulantes ocorre de forma aguda ou crônica, e dos parâmetros imunitários sobre os quais seus efeitos são considerados (Romero & Munck, 2000; Roberts et al., 2007; Sapolsky, McCormick & Langkilde, 2014; McCormick, Shea & Langkilde, 2015). Historicamente, os glicocorticoides são considerados imunossupressores, promovendo inibição de síntese, liberação e eficiência de citocinas, atrofia de tecidos linfáticos e inibição da maturação, diferenciação e proliferação de células imunes (Dhabhar & McEwen, 1999; Sapolsky et al., 2000; Sternberg, 2006; Assis et al., 2015). Entretanto, esses efeitos são observados principalmente quando há ativação persistente ou prolongada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ou hipotálamo-hipófise-interrenais (HHI). Ao contrário, o aumento dos níveis plasmáticos desses esteroides de forma aguda é considerado adaptativo, pois estimula a mobilização de energia e o aumento da imunocompetência (Sapolsky et al., 2000; Dhabhar, 2002; Martin, 2009). A estimulação da função imune pelos glicocorticoides se dá, por exemplo, através de aumento da expressão de receptores para citocinas, proliferação, maturação e redistribuição de células imunes pelo organismo (Wiegers et al., 1995; Dhabhar & McEwen, 1999; Sapolsky et al., 2000; Dhabhar, 2002; Martin, 2009). Em vertebrados em condições naturais, entretanto, pouco se compreende sobre as relações desses esteroides com comportamento reprodutivo e função imune (Martin, 2009).

Para a maioria das espécies de anuros, a vocalização de anúncio emitida pelos machos é a principal característica sexual secundária selecionada pelas fêmeas e, consequentemente, uma das mais importantes para o sucesso reprodutivo (Ryan, 1953; Gerhardt, 1991; Lea & Ryan, 2015). A exacerbação de parâmetros do comportamento vocal pode ser importante para a seleção sexual e, em ambientes naturais, vocalizações mais intensas, de maior complexidade, emitidas por mais tempo e em maiores taxas

atrairão fêmeas mais facilmente e poderiam indicar melhores condições genéticas do macho. Entretanto, o significado biológico, bem como os mecanismos fisiológicos envolvidos nessas escolhas, permanecem pouco compreendidos (Gerhardt, 1991; Greenfield, 1994; Emerson, 2001; Lea & Ryan, 2015).

Assim como em outros vertebrados, os hormônios esteroides estão envolvidos em diversos aspectos da fisiologia e do comportamento reprodutivo de anfíbios anuros (Moore, Boyd & Kelley, 2005; Wilczynski, Lynch & O'Bryant, 2005; Woodley, 2011). A testosterona está envolvida na espermatogênese (Rastogi et al., 1986; Shalan et al., 2004; Madelaire, 2012) e é responsável pelo desenvolvimento de características sexuais secundárias, como a musculatura do tronco e da laringe responsável pela vocalização, além de ser apontada como o principal hormônio relacionado ao início do comportamento vocal (Solís & Penna, 1997; Emerson, 2001; Emerson & Hess, 2001; Wilczynski et al., 2005; Woodley, 2011). Os glicocorticoides, principalmente a corticosterona, também apresentam relação positiva com o comportamento reprodutivo de anfíbios anuros (Burmeister, Somes & Wilczynski, 2001; Emerson & Hess, 2001; Moore & Jessop, 2003; Leary & Knapp, 2014). Para esses animais, a vocalização é uma das atividades energeticamente mais custosas (Bevier, 1997), e a corticosterona deve atender esta demanda energética, possibilitando a atividade vocal e facilitando a manutenção do comportamento reprodutivo (Emerson, 2001; Moore & Jessop, 2003; Leary & Knapp, 2014). Assim, níveis plasmáticos de corticosterona são geralmente correlacionados positivamente com esforço vocal em nível intra e interespecíficos (Emerson & Hess, 2001; Assis et al., 2012).

As relações entre níveis plasmáticos de corticosterona e testosterona durante a atividade reprodutiva são complexas e não totalmente elucidadas na literatura. Enquanto o aumento dos níveis plasmáticos de testosterona durante o período reprodutivo é geralmente acompanhado de aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, altos níveis de glicocorticoides circulantes estão associados à inibição do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas (HHG), suprimindo a produção de andrógenos e o comportamento reprodutivo (Orchinik, Licht & Crews, 1988; Emerson, 2001; Moore & Rose, 2002; Wilczynski et al., 2005; Moore, Boyd & Kelley, 2005). Embora as relações funcionais entre a ativação dos eixos HHI e HHG permaneçam em debate na literatura, sabe-se ainda menos sobre os efeitos dos altos níveis plasmáticos de hormônios esteroides durante a temporada reprodutiva na imunocompetência de anfíbios anuros. Dados recentes indicam que machos de *Hypsiboas prasinus* com maiores taxas de vocalização apresentam também menor intensidade parasitária por helmintos (Madelaire et al., 2013). Esses resultados encontram-

se em consonância com a hipótese de Hamilton & Zuk (1982), pois a variação nas taxas de vocalização poderiam refletir a resistência do indivíduo à infecção por parasitas. Ainda, machos de *H. albopunctatus* com maiores taxas de vocalização apresentam melhor resposta imunológica celular, avaliada pela resposta ao desafio imunológico com fitohemaglutinina (Titon e colaboradores, dados não publicados). Paralelamente, Assis e colaboradores (2015) observaram aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, aumento da relação neutrófilo/linfócito e redução de capacidade bactericida plasmática (CBP) após desafio de contenção com restrição de movimentos em *R. icterica*. As relações conjuntas entre hormônios esteroides, comportamento vocal e imunidade, bem como os efeitos dos diferentes padrões de aumento de níveis plasmáticos de hormônios esteroides sobre o comportamento e imunocompetência de anfíbios anuros, são pouco compreendidos.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi explorar as relações entre comportamento reprodutivo (esforço vocal), imunidade (capacidade bactericida plasmática, resposta inflamatória subcutânea ao desafio com fitohemaglutinina e intensidade de parasitas) e níveis plasmáticos de testosterona e corticosterona em sapos (*Rhinella granulosa*) em atividade reprodutiva, bem como as relações entre imunidade (capacidade bactericida plasmática, resposta inflamatória subcutânea ao desafio com fitohemaglutinina) e níveis plasmáticos de testosterona e corticosterona após manipulação hormonal. Dadas as implicações funcionais entre esforço vocal e níveis plasmáticos de esteroides gonadais e interrenais, bem como os possíveis efeitos imunomoduladores destes esteroides, as hipóteses a serem testadas são:

1. Durante a atividade reprodutiva, os machos de *R. granulosa* devem apresentar correlação positiva entre esforço vocal e níveis plasmáticos de testosterona e corticosterona, além de uma correlação negativa entre os níveis de esteroides e as variáveis associadas à imunocompetência;

2. A manipulação experimental de hormônios esteroides (testosterona e corticosterona) deve reduzir os parâmetros de imunocompetência (capacidade bactericida plasmática e resposta inflamatória subcutânea ao desafio com fitohemaglutinina) em machos de *R. granulosa*;

MATERIAL E MÉTODOS

Sítio de estudo e espécie incluída

Para o estudo das relações entre comportamento vocal, níveis plasmáticos de hormônios esteroides e resposta imune, foram coletados 31 machos adultos de *Rhinella granulosa* em atividade reprodutiva na Fazenda São Miguel, em Angicos - RN (5°30'43''S. 36°36'18''W), entre os dias 17 e 24 de fevereiro de 2014. No mesmo local, de 01 e 24 de abril de 2015, foram coletados 50 indivíduos machos adultos de *R. granulosa* em período reprodutivo, porém sem apresentar atividade reprodutiva, para os experimentos de manipulação hormonal. Os animais foram coletados sob a licença de captura e transporte do IBAMA (N°29896-1) e os procedimentos realizados com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (IB/011/2014).

Métodos de campo e condições de cativeiro

Durante a atividade reprodutiva, os indivíduos foram localizados por busca visual ativa, com luz branca. Uma vez localizados os indivíduos, foram realizadas observações focais de 20 minutos de duração. Para minimizar a interferência do observador sobre o comportamento vocal, foi utilizada lanterna com filtro vermelho, e os registros foram iniciados 5 minutos após a aproximação do observador. Também foram registrados o horário de observação e a estimativa do número total de animais no coro. Para cada macho observado, o número de vocalizações e a duração de cada vocalização foram registrados para posterior cálculo do esforço vocal (número de vocalizações no período de observação multiplicado pela sua duração). Após esse período, os animais observados foram capturados e tiveram uma amostra de sangue coletada (50µl) dentro de 3 minutos da captura, através de punção cardíaca com seringas (1mL, agulha 26Gx1/2'') previamente heparinizadas. Dados ambientais de temperatura e umidade relativa foram coletados através do uso de carregadores de dados (HOBO), colocados nos micro-habitats utilizados pelos animais e programados para registrarem dados a cada cinco minutos.

durante as coletas; a média de temperaturas e umidade relativa registradas no período de observação de cada indivíduo foi utilizada para as análises.

Os machos de *R. granulosa* que foram coletados para serem submetidos à manipulação hormonal foram localizados por busca visual ativa com luz branca, capturados e tiveram uma amostra de sangue coletada segundo o mesmo procedimento descrito acima.

Todos os indivíduos coletados foram pesados (precisão 0,01g) e mantidos individualmente em recipientes plásticos (4,3L – 27,5 x 17,8 x 15 cm), em jejum e com livre acesso à água, por 24 horas. Após este período, os indivíduos coletados em 2014 foram submetidos ao procedimento de medida da resposta inflamatória subcutânea à PHA (Brown et al. 2011), enquanto os indivíduos coletados em 2015 foram submetidos ao protocolo de aplicação hormonal transdérmica e posterior coleta de sangue e desafio imunológico com PHA. Ao final dos procedimentos experimentais, todos os animais foram mortos com injeção intraperitoneal (0,1mL/g) de cloridrato de lidocaína 2% (Xylestesin[®]) e tiveram o comprimento rostro-cloacal medido (precisão 0,01mm).

Desafio imunológico com fitohemaglutinina (PHA)

Alterações ao longo do ciclo circadiano dos níveis plasmáticos de diversos hormônios, tais como a melatonina e corticosterona, podem resultar em diferenças de padrão e intensidade de resposta imune dependentes da hora em que as medidas são realizadas (Sapolsky et al., 2000; Pohanka, 2013). Para avaliar esta possível influência do horário de realização dos testes, bem como padronizar este horário, os indivíduos foram divididos em dois grupos. Um grupo foi submetido ao desafio com PHA pela manhã (entre 6h e 7h), enquanto o outro recebeu a injeção à noite (entre 00h e 01h). Para os animais submetidos à manipulação hormonal, foi padronizada a injeção de PHA à noite (entre 00h e 01h).

A espessura das patas traseiras foi medida com um medidor de espessura digital (Digimess[®], precisão: 0,001mm) e, na planta da pata direita, foi realizada a injeção de 10 µL de uma solução de PHA (20mg de PHA / mL de solução salina). Como controle, a pata esquerda recebeu uma injeção de 10 µL de solução salina. A espessura das patas foi medida novamente 6, 12 e 24 horas após a injeção. Em cada momento, cada pata foi

medida três vezes e a média desses valores foi utilizada para os cálculos. O edema em resposta à solução salina e PHA foi calculado a partir do aumento proporcional da espessura da pata após a injeção, no intervalo de 6, 12 e 24h.

Contagem de parasitas e análise morfológica

Ao final do experimento de desafio imunológico com PHA, os animais coletados em atividade reprodutiva foram mortos, dissecados e os órgãos internos (trato gastrointestinal; pulmões; fígado e vesícula biliar; rins) foram avaliados quanto à presença de helmintos. Os nematódeos encontrados foram fixados em álcool 70° e quantificados sob lupa estereoscópica. Os corpos gordurosos abdominais foram dissecados e pesados (0,0001g), e o índice de condição corpórea (IC) dos indivíduos foi obtido a partir do cálculo dos residuais da regressão linear da massa corpórea como variável dependente e comprimento rostro-cloacal como variável independente.

Processamento das amostras de sangue

Todas as amostras de sangue foram identificadas imediatamente após a coleta e mantidas em gelo até serem, na mesma noite, transferidas para microtubos e centrifugadas (5 minutos a 218 g) para a separação do plasma. As amostras de plasma foram mantidas em nitrogênio líquido até que pudessem ser transferidas para freezer a -80°C, onde permaneceram para posterior dosagem hormonal e realização dos testes de capacidade bactericida.

Dosagem hormonal

As amostras de plasma foram inicialmente extraídas com éter, segundo Mendonça e colaboradores (1996) e Assis e colaboradores (2015). A cada amostra de

plasma foram adicionados 3 mL de éter, e a mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (4°C, 9 min, 218 g) e permaneceram em freezer -80°C por 7 minutos para decantação. A fase líquida foi então transferida para outro tubo de ensaio, que foi deixado em fluxo laminar à temperatura ambiente até que todo éter evaporasse (cerca de 24h). As amostras foram ressuspensas em EIA buffer e as concentrações de corticosterona e testosterona foram dosadas através de kits de ELISA, conforme protocolo do fabricante (Cayman Chemical® - Corticosterona: item 500655; Testosterona: item 582701).

A variação intraensaio foi estimada, a partir das duplicatas das amostras medidas em cada placa, em 8,75% para corticosterona e 6,21% para testosterona. A variação interensaio foi estimada a partir da média dos 4 valores intermediários da curva padrão, como recomendado pelo fabricante dos kits, e foi de 12,8% para corticosterona e 12,45% para testosterona. A sensibilidade dos kits utilizados é de 30pg/mL para CORT e 6pg/mL para T.

Capacidade bactericida plasmática (CBP)

Amostras de plasma de cada indivíduo foram submetidas a um teste de capacidade bactericida com solução de *Escherichia coli*, segundo metodologia padronizada (Assis et al., 2013). As amostras de plasma foram diluídas em solução Ringer (1:20) e em seguida foram adicionados 10 µL de solução de *E. coli* (~10⁴ microorganismos). Após incubação a 37°C por 60 minutos, 500 µL de TSB foram adicionados a cada uma das amostras, que foram posteriormente transferidas para placa de cultura de 96 poços, em duplicata (300µL). Após duas horas de incubação a 37°C as amostras foram lidas de hora em hora quanto à densidade óptica em um espectrofotômetro, totalizando 4 leituras. Posteriormente, foi calculada a atividade antimicrobiana do plasma de cada indivíduo, a partir do valor médio de leitura de densidade óptica das duplicatas: $[1 - (densidade\ óptica\ da\ amostra / densidade\ óptica\ do\ controle\ positivo)]$ (modificado a partir de Assis et al., 2013; Liebl & Martin, 2009)

Soluções hormonais

As soluções de corticosterona e de testosterona foram preparadas conforme protocolo previamente estabelecido (Assis et al., 2015). Para a preparação da solução de corticosterona, 2,1 mg de corticosterona cristalina (Sigma - 27840) foram diluídos em 210 μL de etanol absoluto. À corticosterona dissolvida, foram adicionados 1500 μL de óleo de gergelim, obtendo-se uma solução de trabalho de 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de corticosterona. A mistura foi agitada em vórtex para homogeneização e permaneceu em frasco aberto *overnight* para evaporação do etanol. O mesmo procedimento foi realizado para a preparação da solução de testosterona, adicionando-se 2 mg de propionato de testosterona (Sigma - T1875) em 200 μL de etanol e, posteriormente, 500 μL de óleo de gergelim, obtendo-se uma solução de trabalho de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de testosterona. Essa solução foi novamente diluída de modo a obter-se uma segunda solução de trabalho de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de testosterona.

Aplicação hormonal transdérmica

Os machos de *R. granulosa* foram aleatoriamente divididos em 5 grupos experimentais: Placebo; Cort-baixa; Cort-alta; Testo-baixa e Testo-alta. A aplicação hormonal transdérmica foi realizada sempre no dia seguinte ao da coleta, às 20h30min. De modo a garantir a absorção do hormônio, a água foi retirada uma hora antes do tratamento e devolvida após 1h, depois da coleta de uma amostra de sangue.

Os animais do grupo Placebo receberam 5 μL de óleo de gergelim, aplicados com o auxílio de uma micropipeta sobre o dorso dos indivíduos. Da mesma forma, o grupo experimental Cort-baixa recebeu aplicação de 3 μL da solução de trabalho de corticosterona a 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de corticosterona (4,2 μg de corticosterona), enquanto aos indivíduos do grupo experimental Cort-alta foram administrados 5 μL da mesma solução (7 μg de corticosterona). O grupo experimental Testo-baixa recebeu 3 μL da solução de testosterona a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (3 μg de testosterona), e o grupo experimental Testo-alta, 3 μL da solução de testosterona a 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (12 μg de testosterona). Uma hora após a aplicação hormonal, foi coletada uma amostra de sangue por punção cardíaca. Após processamento

para separação do plasma, este foi armazenado e utilizado posteriormente para dosagem hormonal e teste de capacidade bactericida plasmática, conforme protocolo já descrito.

Na mesma noite, entre meia-noite e 1h, esses animais foram submetidos ao teste de resposta inflamatória à PHA, segundo os procedimentos descritos anteriormente, e o edema das patas foi medido 6h, 12h e 24h após a injeção. No momento 6h após a injeção de PHA (cerca de 10h após a aplicação hormonal), foi retirada outra amostra de sangue para posterior avaliação de CBP e níveis de corticosterona e testosterona no plasma.

ANÁLISE DOS DADOS

A estatística descritiva completa foi realizada para todas as variáveis analisadas.

1. Desafio imunológico com fitohemaglutinina

ANOVAs de medidas repetidas foram usadas para avaliar os edemas em resposta às injeções de solução salina e de PHA 0h, 6h, 12h e 24h. Um teste-t para amostras independentes foi utilizado para avaliar as diferenças entre o edema máximo em resposta à PHA e em resposta à solução salina, bem como para avaliar se houve diferença de edema máximo entre os indivíduos cuja injeção ocorreu de manhã e à noite. Essas análises foram realizadas com auxílio do programa IBM SPSS Statistics, Version 20.0 (IBM Corp., 2011)

2. Relações entre variáveis comportamentais, fisiológicas, morfológicas e ambientais

Para verificar as relações entre as variáveis fisiológicas e ambientais, bem como entre variáveis fisiológicas e morfológicas, foram realizados testes de seleção de modelos. Os modelos com menor valor de dAICc ($dAICc < 2,0$), juntamente com maior valor de AIC weight (probabilidade de o modelo ser o melhor entre os propostos) foram selecionados (Mazerolle, 2006).

As variáveis comportamentais (densidade do coro e esforço vocal) e fisiológicas (testosterona, corticosterona, CBP, PHA, Nematódeos) foram utilizadas como variáveis dependentes na construção de modelos, enquanto as variáveis ambientais (temperatura do ar, temperatura da água, umidade, dia e horário) e morfológicas (índice corpóreo e corpos gordurosos) foram inseridas como variáveis independentes. Os modelos

foram construídos conforme o exemplo a seguir, que examina a relação entre uma variável dependente e condições do ambiente. Foram construídos, neste caso, 12 modelos possíveis:

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

r2) $\phi \sim \text{Temp. ar}$ (variável dependente é explicada pela temperatura do ar)

r3) $\phi \sim \text{Temp. água}$ (variável dependente é explicada pela temperatura da água)

r4) $\phi \sim \text{Umidade}$ (variável dependente é explicada pela umidade relativa do ar)

r5) $\phi \sim \text{Temp. ar} + \text{Temp. água}$ (variável dependente é explicada pela temperatura do ar mais a temperatura da água)

r6) $\phi \sim \text{Temp. ar} + \text{Umidade}$ (variável dependente é explicada pela temperatura do ar mais a umidade relativa)

r7) $\phi \sim \text{Temp. Água} + \text{Umidade}$ (variável dependente é explicada pela temperatura da água, mais a umidade relativa)

r8) $\phi \sim \text{Temp. ar} + \text{Temp. Água} + \text{Umidade}$ (variável dependente é explicada pela temperatura do ar, mais temperatura da água mais a umidade relativa)

r9) $\phi \sim \text{Temp. ar} * \text{Temp. água}$ (variável dependente é explicada pela interação entre temperatura do ar e temperatura da água)

r10) $\phi \sim \text{Temp. ar} * \text{Umidade}$ (variável dependente é explicada pela interação entre temperatura do ar e umidade relativa)

r11) $\phi \sim \text{Temp. Água} * \text{Umidade}$ (variável dependente é explicada pela interação entre temperatura da água e umidade relativa)

r12) $\phi \sim \text{Temp. ar} * \text{Temp. Água} * \text{Umidade}$ (variável dependente é explicada pela interação entre temperatura do ar, temperatura da água e umidade relativa)

Conforme esta estruturação, foram construídos modelos para explicar as relações entre as seguintes variáveis:

1. Testosterona $\sim$ Dia, Horário
2. Testosterona $\sim$ Temperatura do ar, Temperatura da água, Umidade
3. Testosterona $\sim$ Índice corpóreo e Corpos Gordurosos
4. Corticosterona $\sim$ Dia, Horário
5. Corticosterona $\sim$ Temperatura do ar, Temperatura da água, Umidade
6. Corticosterona $\sim$ Índice corpóreo e Corpos Gordurosos
7. Densidade do coro $\sim$ Temperatura do ar, Temperatura da água, Umidade
8. Esforço Vocal $\sim$ Temperatura do ar, Temperatura da água, Umidade

9. Esforço Vocal ~ Dia, Horário
10. Esforço Vocal ~ Índice corpóreo e Corpos Gordurosos
11. CBP ~ Índice corpóreo e Corpos Gordurosos
12. PHA ~ Índice corpóreo e Corpos Gordurosos
13. Nematódeos ~ Índice corpóreo e Corpos Gordurosos

3. Relações entre variáveis comportamentais, hormonais e imunológicas

Para melhor compreensão das relações entre as duas variáveis que compõem o esforço vocal, um teste de correlação de Pearson foi realizado entre a taxa e duração média de vocalização dos indivíduos no período observado.

Para avaliar as relações entre as variáveis comportamentais, hormonais e imunológicas, foram realizadas modelagens de equações estruturais (*structural equation modeling* - SEM). A SEM é uma técnica utilizada para estimar, analisar e testar modelos que especificam as relações entre variáveis. Essa técnica vem sendo cada vez mais utilizada em estudos em ecologia, pois permite explorar hipóteses de relações causais tanto de forma exploratórias quanto confirmatória (Mitchell, 1992; Pugesek, Tomer, & Eye, 2003; Shipley, 2004). Os modelos são propostos *a priori* pelo pesquisador e são avaliados quanto à qualidade de ajuste ("*goodness of fit*"). A significância do modelo é acessada através da estatística de χ^2 , calculada considerando as matrizes de covariância dos dados observados e a esperada. A hipótese nula desse teste é a de que os dados suportam o modelo proposto, enquanto um valor de $p < 0,05$ indica que o modelo não é suportado pelos dados (Shipley, 2004).

De modo a cumprir as premissas para a SEM, que incluem distribuição normal multivariada e baixa curtose, os dados foram transformados segundo Box & Cox (1964), após serem padronizados para evitar valores negativos e grande diferença de variâncias [função: $(x - \min) / (\max - \min)$] (Shipley, 2004).

Para cada uma das variáveis imunológicas (CBP, PHA e Nematódeos), foram criados seis modelos para explorar as possíveis relações causais entre as variáveis. Na Figura 1, estão apresentados os modelos testados para CBP, que foram replicados para os outros dois parâmetros de imunocompetência (PHA e intensidade parasitária). Dentre os

modelos propostos, foram aceitos como plausíveis aqueles que apresentaram conjuntamente valor de $p > 0,05$, menor valor de AIC e $\Delta AIC < 2,0$ na seleção de modelos.

4. Análises dos dados experimentais

Para verificar se houve alteração nas dosagens de testosterona e corticosterona plasmáticas e na CBP nos diferentes grupos após manipulação hormonal, foram realizadas ANOVAs de medidas repetidas seguidas de Bonferroni. ANOVAs de medidas repetidas também foram utilizadas para análise da proporção de edema em resposta à PHA e à salina, conforme descrito em (1). Testes-t para amostras independentes foram realizados para verificar se houve diferença quanto aos parâmetros analisados (testosterona, corticosterona, CBP, edema em resposta a injeção de PHA) entre os grupos que receberam aplicação hormonal e o placebo em cada horário. Anteriormente às análises, os dados de dosagem hormonal foram logaritmizados e os dados de CBP foram transformados em arco seno da raiz, de modo a se aproximar do pressuposto de distribuição normal dos dados.

Os Testes-t, Correlação de Pearson e ANOVAs foram realizados com auxílio do programa IBM SPSS Statistics, Version 20.0 (IBM Corp., 2011), enquanto as análises envolvidas na seleção de modelos e SEM foram realizadas no R (RStudio versão 0.98.945 2009-2013), com auxílio dos pacotes *bbmle* (Bolker, 2014), *lavaan* (Yves et al., 2015), *semPlot* (Epskamp, 2015), *MVN* (Korkmaz, Goksuluk & Zararsiz, 2015), e *car* (Fox et al., 2015).

RESULTADOS

1. Desafio imunológico com fitohemaglutinina (PHA) em diferentes horários

Tanto os indivíduos que receberam injeção de PHA pela manhã, quanto aqueles injetados à noite, apresentaram edema em resposta ao tratamento (Manhã: $gl=3$, $F=11,153$, $p<0,001$; Noite: $gl=3$, $F=17,821$, $p<0,001$) e não apresentaram edema em resposta à injeção de salina (Manhã: $gl=3$, $F=2,206$, $p=0,12$; Noite: $gl=3$, $F=1,144$, $p=0,34$). Entretanto, o teste *post-hoc* indicou que o grupo que recebeu injeção durante o dia apresentou edema após 6h ($p=0,001$), enquanto os indivíduos injetados à noite apresentaram edema após 6h ($p<0,001$) que foi mantido até 12h após a injeção ($p<0,001$) (Figura 2a e b). Entretanto, a proporção de edema máxima não apresentou diferença significativa entre os dois horários de injeção (PHA: $t=-0,186$; $gl=25$; $p=0,854$; Salina: $t=0,862$; $gl=25$; $p=0,397$). Desta forma, os dados referentes aos dois horários foram agrupados para as análises posteriores (Figura 2c).

2. Relações entre comportamento vocal, níveis plasmáticos de hormônios esteroides e imunocompetência

A estatística descritiva completa para variáveis ambientais, comportamentais, morfológicas e fisiológicas está apresentada na Tabela 1.

2.a. Relações entre variáveis fisiológicas, ambientais e morfológicas

Os modelos selecionados para explicar a relação entre variáveis comportamentais, ambientais e fisiológicas estão apresentados na Tabela 2. Os indivíduos de *R. granulosa* apresentaram maiores níveis plasmáticos de testosterona e de

corticosterona nos primeiros dias de coleta (Figuras 3 e 5), e a concentração plasmática de corticosterona também apresentou tendência de relação negativa com o horário de coleta (Figura 6). Ainda, os níveis plasmáticos de testosterona foram maiores quanto maior a umidade do ar (Figura 4), enquanto os níveis plasmáticos de corticosterona apresentaram relação positiva com a interação entre temperatura do ar e umidade (Figuras 7 e 8). Adicionalmente, a densidade do coro foi maior quanto maior a temperatura da água (Figura 9).

Para todas as análises de relação entre esforço vocal e variáveis ambientais e morfológicas, o modelo nulo foi selecionado e apresentou maior peso (Tabela 2). As tendências encontradas foram de menor esforço vocal quanto maior a temperatura do ar (Figura 9), e nos primeiros dias de coleta (Figura 10). Ainda, houve tendência de maior esforço vocal quanto maior o índice corpóreo dos indivíduos (Figura 11).

Para as relações entre as variáveis imunológicas (CBP, PHA e Nematódeos) e morfológicas (índice corpóreo e corpos gordurosos), nenhum dos modelos propostos foi selecionado ($dAICc > 2,0$).

2.b. Relações entre comportamento vocal, hormônios esteroides e imunocompetência

Dentre os modelos testados, o Modelo 6 apresentou melhor ajuste para os 3 parâmetros de imunocompetência (Figuras 13, 14 e 15), considerando a significância do χ^2 e o AIC (Tabela 3). Este modelo indica uma ação direta de corticosterona e testosterona sobre o esforço vocal e indireta destes esteroides sobre os parâmetros de imunocompetência, através do esforço vocal. O Modelo 2, que considera ação direta da testosterona sobre a corticosterona, desta última sobre o esforço vocal e imunocompetência, e uma inter-relação entre estas duas variáveis, também foi selecionado nos modelos que incluíram CBP (Figura 16, Figura 17). Em todos os modelos selecionados, a relação positiva entre corticosterona e esforço vocal foi significativa ($p < 0.05$) e a mais forte. Ainda, os modelos apresentaram relação positiva entre esforço vocal e intensidade de nematódeos, e relações negativas do esforço vocal com CBP e PHA, além de correlações positivas entre corticosterona e testosterona. Os resultados da SEM para cada variável imunológica, bem como os valores de $dAIC$ e $AIC\ weight$ dos modelos,

estão apresentados na Tabela 3. A taxa e duração média de vocalização apresentaram correlação negativa (Pearson: $r=-0,761$; $p<0,001$; Figura 18).

3. Manipulação hormonal

A estatística descritiva para as variáveis morfológicas e fisiológicas da manipulação hormonal está apresentada na Tabela 4.

Os indivíduos do grupo Testo-alta apresentaram níveis plasmáticos de testosterona cerca de 35 vezes maiores que o grupo placebo 1h após aplicação hormonal ($p<0,01$) (Figura 19), e esses níveis permaneceram em média 10,7 vezes maiores 10h após aplicação ($p=0,03$) (Figura 20), quando comparados ao grupo placebo.

O grupo que recebeu a menor dose de corticosterona apresentou diferenças entre as medidas de níveis plasmáticos de corticosterona nos três momentos ($F= 9,428$; $p=0,031$), porém o teste *post-hoc* não apontou em qual momento a diferença é significativa ($p>0,05$) (Figura 21). Quando comparado ao placebo, os indivíduos deste grupo apresentaram níveis de corticosterona em média 6,7 vezes maiores 1h após a aplicação ($p=0,04$), enquanto o grupo que recebeu maior dose de corticosterona apresentou tendência à diferença em cerca de 20 vezes quando comparado ao placebo ($p=0,057$) (Figura 23). O grupo Cort-alta apresentou níveis plasmáticos de corticosterona, em média, 94 vezes maiores em relação aos níveis de campo uma hora após aplicação hormonal ($p<0,01$) (Figura 22).

Os dois grupos que receberam aplicação de corticosterona apresentaram aumento da CBP em relação aos valores de campo, diferentemente do grupo placebo (grupo Placebo: $F=1,23$; $p=0,32$; grupo Cort-baixa: $F= 5,06$, $p=0,02$; grupo Cort-alta: $F=8,19$; $p=0,01$) (Figuras 24, 25 e 26). Porém, os testes *post-hoc* não apontaram em qual momento a diferença ocorre ($p>0,05$). O grupo Testo-alta apresentou tendência ao aumento de CBP ($F=3,91$; $p=0,056$) (Figura 27). Em média, o grupo Cort-baixa apresentou CBP 7 vezes maior após 1h da aplicação e esse valor foi mantido após 10h. Já para o grupo Cort-alta, o aumento foi de 2,3 vezes, retornando ao valor inicial após 10h.

A injeção de fitohemaglutinina causou edema na pata dos indivíduos de todos os grupos experimentais, quando comparada à pata controle (Grupo Placebo: $p<0,001$; Grupo Cort-baixa: $p=0,03$; Grupo Cort-alta: $p=0,002$; Grupo Testo-alta: $p=0,01$) (Figura

28). Não houve diferença de resposta de edema entre os grupos que receberam aplicação hormonal e o placebo ($p>0,3$). Entretanto, o grupo Cort-baixa apresentou edema estatisticamente significativo também na pata que recebeu injeção de salina ($p=0,02$).

DISCUSSÃO

Resposta ao desafio imunológico com PHA em diferentes horários

O padrão de resposta inflamatória foi diferente dependendo do horário em que os machos de *R. granulosa* foram submetidos ao desafio com fitohemaglutinina (PHA). Quando a injeção foi realizada pela manhã, o edema máximo foi registrado 6h após a injeção, e a espessura da pata já havia voltado ao estado inicial após 12h. Quando a aplicação foi feita à noite, o edema máximo também ocorreu após 6h para a maioria dos animais, porém foi mantido por tempo prolongado, retornando ao estado inicial apenas após 24h. Essa diferença de padrão de resposta pode ocorrer devido às oscilações circadianas dos sistemas endócrino e imune (Cermakian, Westfall & Kiessling, 2014; Geiger, Fagundes & Siegel, 2015). Em mamíferos saudáveis, maiores níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF, bem como maiores quantidades de monócitos, linfócitos e células T circulantes, são encontradas durante a fase de repouso. Ao contrário, durante o período de atividade ocorrem maiores níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, e de células NK (Geiger et al., 2015). As respostas observadas ao desafio imunológico em diferentes horários em *R. granulosa* parecem condizentes com esse padrão. Quando a injeção de PHA foi realizada de manhã, ou seja, durante o período de "repouso" para animais noturnos, os indivíduos apresentaram pico rápido de resposta inflamatória, voltando mais rapidamente à condição inicial. Possivelmente, os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias de resposta aguda nesse período favoreceram a rapidez e eficiência da resposta imunológica. Por outro lado, o edema permaneceu por maior tempo nos indivíduos submetidos no período de atividade desses animais, quando os níveis de citocinas pró-inflamatórias seriam menores.

Os níveis circulantes de determinados hormônios, especialmente de glicocorticoides e melatonina, também apresentam relações complexas com os ritmos circadianos e imunidade (Pohanka, 2013; Carrillo-Vico et al., 2013; Bellavance & Rivest, 2014). A variação circadiana desses hormônios é altamente preservada, sendo que os níveis de glicocorticoides no plasma apresentam pico no início da fase ativa, enquanto os níveis plasmáticos de melatonina são elevados à noite (Jessop et al., 2014; Cermakian et al.,

2015). A alta concentração de melatonina no período noturno inibe a rolagem e adesão de neutrófilos ao endotélio. Assim, é possível que os baixos níveis plasmáticos de melatonina também tenham favorecido a resposta inflamatória rápida quando a injeção foi aplicada pela manhã em machos de *R. granulosa*, enquanto os níveis altos de melatonina, quando o desafio foi realizado à noite, tenham colaborado para a resposta mais prolongada, dificultando a chegada de células imunocompetentes ao local da inflamação.

A relação entre a resposta inflamatória, níveis de citocinas e caracterização celular da resposta inflamatória nos diferentes horários, bem como a ritmicidade da secreção de melatonina e corticosterona, e as interações com o sistema imunológico propostas, permanecem para serem exploradas nessa espécie.

Parâmetros ambientais, hormônios esteroides e atividade reprodutiva

Devido ao papel da testosterona no desenvolvimento de características sexuais secundárias e no início do comportamento reprodutivo, os níveis plasmáticos deste esteroide em machos de muitos vertebrados de reprodução sazonal são geralmente baixos antes do período reprodutivo, aumentando próximo e durante a atividade reprodutiva, e diminuindo conforme o fim da temporada reprodutiva se aproxima (Rastogi et al., 1986; Wingfield et al., 1990; Emerson, 2001; Shalan et al., 2004; Assis et al., 2012; Madelaire, 2012; Leary & Knapp, 2014). Adicionalmente, ocorre uma elevação dos níveis de glicocorticoides circulantes durante a atividade reprodutiva de vertebrados, possivelmente associada à mobilização de reservas energéticas (Emerson, 2001; Romero, 2002; Wingfield & Sapolsky, 2003; Assis et al., 2012; Leary et al., 2015). Madelaire (2012) observou que espécies de anuros do semi-árido apresentam níveis elevados desses esteroides durante a temporada reprodutiva, sendo maiores quando os animais estão em atividade de vocalização. De acordo, os machos de *R. granulosa* em atividade reprodutiva apresentaram relação negativa entre a concentração plasmática de testosterona e os dias de coleta e positiva entre a concentração plasmática deste esteroide e umidade relativa, além de maiores níveis plasmáticos de corticosterona nos primeiros dias de coleta, indicando o aumento da concentração plasmática de testosterona e corticosterona com o estímulo ambiental da chuva, o que desencadeou a atividade de vocalização. Entretanto, no decorrer dos dias de observação, com redução do volume de chuva, e posterior interrupção, houve

diminuição nos níveis plasmáticos desses esteroides e cessamento da atividade de vocalização. Adicionalmente, a concentração plasmática de corticosterona apresentou tendência a ser maior nos indivíduos coletados mais cedo, sendo que a soma de dia e horário de coleta foi o modelo selecionado para explicar os níveis plasmáticos deste hormônio, juntamente com apenas o dia e também o modelo nulo. A tendência de relação entre corticosterona e horário corrobora a relevância dos parâmetros ambientais para a atividade desses animais, pois em ambientes de clima semi-árido, a temperatura do ar cai abruptamente durante a noite, possivelmente ficando abaixo da temperatura ótima para atividade vocal (Duellman & Trueb, 1994; Navas, Gomes & Carvalho, 2008). De acordo, outro modelo selecionado para explicar os níveis plasmáticos de corticosterona foi o de interação entre umidade relativa e temperatura do ar, sendo as relações positivas entre esses parâmetros e os níveis de glicocorticoides. Assim, durante os primeiros dias, com alta umidade relativa do ar decorrente da precipitação, e no início da noite, com temperaturas mais elevadas, há maiores níveis de testosterona e corticosterona, estimulando a atividade de vocalização.

Apesar da relevância da temperatura do ar e umidade para o aumento dos níveis hormonais e estímulo ao comportamento reprodutivo, o parâmetro ambiental selecionado para explicar a densidade do coro de *R. granulosa* foi a temperatura da água. A relevância desse parâmetro é possivelmente relacionada à posição adotada pelos machos desta espécie para a atividade vocal, com parte do corpo na água, na beira do açude. Ainda, a menor variação de temperatura da água, quando comparada à grande variação de temperatura do ar durante a noite, deve favorecer o uso deste microhabitat para vocalização de anuros (Duellman & Trueb, 1994; Wells, 2007)

Para os três conjuntos de modelos testados para esforço vocal, o modelo nulo foi selecionado juntamente com dia, temperatura e índice corpóreo, e as relações com essas variáveis são fracas. Assim, esses resultados sugerem que para esta espécie de reprodução explosiva da caatinga, a chuva influencia principalmente os parâmetros hormonais, enquanto a intensidade de atividade de vocalização é pouco influenciada por outros parâmetros ambientais ou condição corpórea.

Comportamento vocal, hormônios esteroides e imunidade

O modelo estrutural igualmente selecionado para as três variáveis imunológicas (PHA, CBP e Nematódeos), indica relação causal da corticosterona e da testosterona sobre o esforço vocal e deste sobre a imunidade, além de correlação entre esses hormônios esteroides. A relação positiva dos níveis plasmáticos de corticosterona sobre esforço vocal foi a mais forte nesses modelos e também está presente no segundo modelo selecionado quando a CBP é incluída como variável imunológica. A vocalização de anúncio de *R. granulosa* consiste num canto trinado rápido e longo, existindo, portanto, relação negativa entre a taxa e média de duração de vocalização na determinação do esforço vocal. O início deste tipo de vocalização envolve a mobilização de diferentes músculos da laringe e tronco, sendo mais custoso energeticamente que sua manutenção (Wells & Taigen, 1989; Prestwich, 1994; McLister, 2001). Assim, a testosterona deve promover o início do turno vocal, enquanto a forte relação entre corticosterona e esforço vocal deve estar associada ao papel dos glicocorticoides na mobilização energética. Os níveis plasmáticos de corticosterona devem modular o esforço vocal estimulando o aumento de taxa de vocalização, ou ainda sendo aumentados em decorrência do alto custo energético em machos propensos a vocalizar em altas taxas (Emerson, 2001; Leary & Knapp, 2014). De acordo, os níveis plasmáticos de ambos os hormônios esteroides analisados foram altos nos primeiros dias de atividade reprodutiva, diminuindo com o cessamento da chuva, sendo a relação entre testosterona e dia a mais evidente. Adicionalmente, a maior influência da corticosterona sobre o comportamento vocal em condições naturais e maior investimento em reprodução após estresse agudo foram registrada para outros anfíbios de reprodução explosiva (Leary et al., 2008; Woodley & Porter, 2015).

De acordo com os modelos selecionados, a exacerbação do comportamento vocal parece ter efeitos negativos sobre a imunocompetência, representados pela relação positiva entre esforço vocal e infecção por parasitas, e negativa entre esforço vocal e CBP e entre esforço vocal e a resposta de edema ao desafio com PHA (apesar de esta última ser fraca). A relação direcional de esforço vocal e infecção por nematódeos pode sugerir que a maior atividade acarretaria maior exposição dos indivíduos a parasitas (Brønseth & Folstad, 1997; Folstad & Karter, 1992). Esta relação positiva encontrada foi contrária ao encontrado por Madelaire e colaboradores (2013), que relataram relação negativa entre taxa de vocalização e infecção por parasitas em *H. prasinus*. Uma das possíveis causas dessas diferenças entre as duas espécies envolve a diferença de habitat e padrões de reprodução: *H. prasinus* ocupa Floresta Atlântica e se reproduz ao longo do ano todo,

enquanto *R. granulosa* apresenta atividade reprodutiva explosiva, fortemente associada a eventos esporádicos de precipitação no semi-árido. Assim, as diferenças de padrões de elevação hormonal decorrentes do padrão reprodutivo (Emerson & Hess, 1996) poderiam influenciar os efeitos destes hormônios sobre diferentes aspectos da imunidade. Vale destacar que, neste estudo, analisamos apenas nematódeos nos órgãos internos, e que a relação entre comportamento vocal e níveis de esteroides circulantes com outros parasitas pode ser diferente (Weatherhead et al., 1993). As relações encontradas entre comportamento vocal e as diferentes medidas de resposta imune, entretanto, corroboram o padrão geral de relação entre esses aspectos e, associadas às relações com hormônios esteroides, evidenciam a complexidade das relações fisiológicas do organismo.

Dentre os dois modelos selecionados quando a CBP é incluída como variável imunológica, o modelo que considera ação direta da corticosterona sobre esforço vocal e sobre CBP, além de correlação negativa entre esforço vocal e CBP, teve maior peso de AIC e maior força das relações consideradas. O conjunto das relações positivas entre corticosterona e esforço vocal e entre corticosterona e CBP, com correlação negativa entre esforço vocal e CBP neste modelo, pode parecer inicialmente contraditória. Entretanto, ao analisar essas relações em conjunto, é possível perceber que, embora exista uma relação negativa geral entre esforço vocal e CBP, salientada também pelo modelo alternativamente selecionado, um alto esforço vocal e uma alta CBP estão presentes principalmente nos indivíduos com maiores concentrações plasmáticas de corticosterona (ver Figura 17). De acordo, a manipulação experimental de corticosterona elevou a CBP, apesar de os níveis plasmáticos registrados terem sido muito maiores do que os apresentados em campo por esses animais com alta CBP e alto desempenho de vocalização (cerca de 2,5 vezes maior para o grupo Cort-baixa e cerca de 8 vezes maior para o grupo Cort-alta).

Fêmeas de anuros tendem a selecionar machos que apresentam maior esforço vocal (Ryan, 1953; Wells, 1988; Gerhardt, 1991; Sullivan & Kwiatkowski, 2007; Castellano et al., 2009) e, de acordo com a hipótese de Hamilton e Zuk (1982), essa característica poderia indicar a melhor qualidade genética dos machos. Se os machos que apresentam maior esforço vocal apresentam altos níveis de glicocorticoides e andrógenos e, concomitantemente, melhores condições de saúde, poderia tratar-se de uma escolha de sinais honestos do *fitness* do macho pela fêmea (Folstad & Karter, 1992; Mills et al., 2010). Essa relação de honestidade de sinal em machos de *R. granulosa* é possivelmente mediada pela corticosterona, e os experimentos de manipulação hormonal confirmam o envolvimento da elevação aguda deste esteroide no aumento da CBP. Tipicamente, doses

moderadas de glicocorticoides estão associadas à manifestação do comportamento sexual, enquanto doses muito elevadas podem afetar negativamente a reprodução (Emerson, 2001; Wilczynski et al., 2005; Leary & Knapp, 2014). Dessa forma, nossos dados indicam que aqueles machos de *R. granulosa* que apresentaram alta CBP e alto esforço vocal devem conseguir manter níveis de corticosterona elevados o bastante de forma que apresentem maior desempenho possível quanto à mobilização energética para vocalização, sem bloqueio do eixo HHG, favorecendo concomitantemente a resposta a desafios imunológicos do ambiente (Husak & Moore, 2008). Por outro lado, a maior parte dos indivíduos, caracterizados por menores níveis plasmáticos de corticosterona durante a atividade vocal, poderiam estar restritos a investir preferencialmente em reprodução ou imunocompetência (Mills et al. 2010). Ainda, considerando a tendência de relação positiva encontrada entre esforço vocal e índice corpóreo, é possível que indivíduos em pior condição corpórea não sejam capazes de investir em alto esforço vocal e, conseqüentemente, apresentar altos níveis de corticosterona e seus benefícios de imunoestimulação. De acordo, para que um sinal revele informação acurada da qualidade do indivíduo, ele deve impor custos diferenciais, de forma que indivíduos em melhores condições sejam capazes de assimilar o custo imposto sem alterar elementos críticos de seu estado fisiológico, ou ainda sofrer menor influência desses custos (Hamilton & Zuk, 1982; Bortolotti et al., 2009; Vitousek et al., 2014)

A elevação experimental de corticosterona em *R. granulosa* levou a aumento de CBP de formas diferentes, dependendo da dose administrada. Em geral, a corticosterona apresenta efeito bimodal sobre a imunocompetência, sendo que aumentos moderados e agudos dos níveis de corticosterona circulante estimulam a resposta imune, enquanto aumentos grandes e prolongados promovem imunossupressão (Sapolsky, 2000; Martin, 2009). Entretanto, em *R. granulosa*, a aplicação de 4,2µg de corticosterona levou a aumento da CBP em 7 vezes, constante por até 10h após a aplicação, enquanto animais que receberam aplicação de maior dose tiveram aumento da CBP menor e mais breve. Esses resultados indicam que dose, duração e frequência do aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides são relevantes não só na modulação da resposta imune, mas devem exercer também efeito no ajuste mais fino de padrão de intensidade e duração de resposta observada (Crossin et al. 2015; McCornick & Langkilde, 2015).

A elevação experimental de corticosterona levou a aumento de CBP, que avalia a atividade do sistema complemento (Liebl & Martin, 2009), e também deve resultar em exacerbação de resposta imune mediada por células, medido através da resposta

inflamatória ao desafio com PHA (Brown, Shilton & Shine, 2011). Além do edema em resposta a PHA, os indivíduos do grupo Cort-baixa apresentaram discreto edema em resposta à injeção de salina, ao contrário dos outros grupos. De acordo, Madelaire (dados não publicados) encontrou relação positiva entre níveis plasmáticos de corticosterona e número de leucócitos circulantes, monócitos e maior razão neutrófilo/linfócito em *R. granulosa* em campo. Adicionalmente, dados recentes também demonstram aumento da atividade fagocítica do sangue em resposta à aplicação transdérmica de corticosterona em *R. icterica* (Assis e colaboradores, dados não publicados), reforçando a ação da corticosterona no aumento da função imune celular.

O aumento de parâmetros de imunidade após elevação aguda dos níveis de glicocorticoides circulantes é conhecido para diferentes grupos (Martin, 2009; Dhabhar, 2014; McCormick et al., 2015). Entretanto, os mecanismos de ação envolvidos no efeito rápido desses esteroides sobre a função imune, como observado neste estudo, são pouco conhecidos. Devido às diferenças de afinidade dos receptores, alguns autores propõem que os efeitos de estimulação da função imune após aumento agudo, ou em baixas doses de glicocorticoides, devem ser mediados por receptores de mineralocorticoides (MR), enquanto os efeitos imunossupressores, observados especialmente em situações de exposição a estressores, são mediados pela ligação desses esteroides a receptores glicocorticoides (GR) (Lim et al. 2007; Wingfield, 2013; Bellavance & Rivest, 2014). Ainda, há evidências de ações não genômicas dos glicocorticoides, mediadas por interações com receptores citosólicos, interações não específicas com a membrana celular e interações específicas com receptores glicocorticoides de membrana, que poderiam mediar respostas rápidas do sistema imune, como a observado neste estudo (Buttgereit & Scheffold, 2002; Löwenberg et al., 2007; Bellavance & Rivest, 2014; Uchoa et al., 2014).

Convencionalmente, andrógenos são conhecidos por apresentar efeitos imunossupressores, como involução de tecidos linfáticos e redução da atividade de linfócitos (Ahmed et al., 1985; Hou & Zheng, 1988; Muehlenbein & Bribiescas, 2005). Entretanto, ao contrário do esperado, após aplicação de 12µg de testosterona em *R. granulosa*, foi observada tendência de aumento da CBP ($p=0,056$), em cerca de 16 vezes após 1h da aplicação, perdurando uma tendência ao aumento de cerca de 10 vezes até 10h após). Madelaire (dados não publicados) também encontrou que indivíduos de *R. granulosa* com maior contagem de leucócitos totais, monócitos e maior razão neutrófilo/linfócito apresentavam maiores níveis de testosterona em campo. Apesar de a elevação de parâmetros imunológicos por testosterona ser raramente reportada em animais

de laboratório e humanos, a imunossupressão não é uma condição obrigatória. Maior imunocompetência associada a níveis elevados de testosterona em condições naturais (Ezenwa et al., 2012; Madelaire, dados não publicados) e após aplicação experimental (Roberts & Peters, 2009; Ruiz et al., 2010; Desprat et al., 2015) foram encontrados em alguns vertebrados, associado a fatores como condição corpórea, alimentação, dominância no grupo, estágio de vida e parâmetro imunológico considerado. Um estudo realizado com hamsters, entretanto, reportou aumento de imunidade mediada por célula também *in vitro* (Bilbo & Nelson, 2001), sugerindo que a testosterona pode ter efeitos diretos no aumento da imunocompetência em determinadas situações.

Os mecanismos de ação da testosterona sobre a imunidade são complexos e relatos de aumento de imunocompetência são raros e frequentemente pouco explorados (Braude, Tang-Martinez & Taylor, 1999; Bilbo & Nelson 2001). A concentração e duração da manipulação hormonal, da mesma forma como discutido para os glicocorticoides. Neste estudo, apenas o tratamento com a maior dose de testosterona (12ug) foi efetivo, apresentando níveis plasmáticos 35 vezes maiores após 1h, permanecendo 10,7 vezes maiores após 10h, quando comparado ao grupo placebo. Apesar de os níveis plasmáticos de testosterona alcançados serem bastante elevados, em comparação aos animais do grupo placebo nas mesmas condições de cativeiro, ainda foram mais baixos do que os observados em campo, durante atividade reprodutiva. Dessa forma, o aumento de testosterona não deve ter causado ativação de *feedback* negativo para o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG), e os níveis de testosterona se mantiveram elevados durante todo período de experimento. É importante salientar que, em condições de cativeiro, os níveis plasmáticos de testosterona tendem a cair abruptamente (Zerani et al., 1991; Mosconi et al., 2006). De acordo, indivíduos do grupo placebo, apresentaram níveis de testosterona 5,3 vezes menores 1h após aplicação de óleo de gergelim.

Ambos os esteroides analisados devem estar envolvidos na intermediação do comportamento reprodutivo e imunocompetência, favorecendo a exibição de sinais honestos para seleção sexual. Apesar de a atenção principal ser comumente colocada no papel da testosterona na mediação de sinais honestos (Folstad e Karter, 1992), evidências do seu envolvimento direto tem obtido suporte misto (Evans et al., 2000; Roberts et al. 2007; Leary & Knapp, 2014). A falta de resultados consistentes nessa relação sugere que o impacto da testosterona na função imune pode envolver vias indiretas, em que outros compostos poderiam interagir ou mesmo exercer um papel mais direto (Folstad & Karter, 1992; Husak & Moore, 2008; Bortolotti et al., 2009). Nesse sentido, nossos resultados

corroboram a maior influência da corticosterona na mediação da expressão do comportamento de corte e imunocompetência em machos *R. granulosa*, e podem contribuir para melhor compreensão da complexidade das relações entre os sistemas imune e endócrino, bem como suas consequências para o *fitness* e sobrevivência dos indivíduos.

CONCLUSÕES

Machos de *Rhinella granulosa* submetidos ao desafio imunológico com fitohemaglutinina (PHA) em diferentes horários apresentaram diferenças no padrão de resposta inflamatória. Embora não tenha ocorrido diferença no edema máximo alcançado, a resposta inflamatória foi mais rápida quando a injeção foi realizada pela manhã e perdurou por mais tempo quando a injeção foi realizada à noite.

No semi-árido, a precipitação é o principal determinante ambiental para o aumento dos níveis de testosterona e corticosterona circulantes em machos de *R. granulosa* e, de acordo com o esperado, o aumento dos níveis plasmáticos de testosterona e corticosterona estimulam o comportamento de vocalização. Com a redução e interrupção das chuvas, houve diminuição nos níveis plasmáticos desses esteroides e cessamento da atividade de vocalização.

De forma geral, há uma relação negativa entre esforço vocal e imunocompetência em machos de *R. granulosa*. Entretanto, alguns indivíduos que apresentam níveis plasmáticos particularmente altos de corticosterona apresentam concomitantemente alto esforço vocal e alta imunidade. De acordo, a manipulação hormonal experimental evidencia o envolvimento da elevação aguda deste esteroide no aumento da função imune, representada pelo rápido aumento da capacidade bactericida plasmática. Esses resultados sugerem a maior influência da corticosterona na mediação da expressão do comportamento de corte e imunocompetência em machos *R. granulosa*.

FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Modelos estruturais considerando esforço vocal (EV), níveis plasmáticos de corticosterona (COR) e testosterona (TES) e capacidade bactericida plasmática (CBP) testados para machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva.

a)

Figura 2 Edema após injeção subcutânea de fitohemaglutinina (PHA) e salina. a) progresso de edema nas 24 horas após injeção realizada pela manhã; b) progresso de edema nas 24 horas após injeção realizada à noite; c) alteração de edema após injeção de PHA e salina considerando todos os indivíduos experimentais.

b)

c)

Tabela 1. Estatística descritiva de variáveis ambientais, comportamentais, morfológicas e fisiológicas de *Rhinella granulosa* em atividade reprodutiva

	N	Média	Desvio Padrão	Máximo	Mínimo
Temperatura (°C)	24	24,09	1,27	27,12	22,53
Umidade (%)	24	31,88	20,00	93,31	23,50
Temperatura da água (°C)	23	26,01	1,06	27,91	24,51
Esforço vocal (s)	31	467,00	133,25	656,00	144,00
Densidade do coro (un)	28	8,71	7,78	30,00	1,00
Massa (g)	31	7,91	1,83	11,66	3,70
CRC (mm)	30	44,53	3,54	53,27	36,75
Corpos Gordurosos (g)	31	0,10	0,12	0,45	0,00
Testosterona (ng/ml)	30	33,65	23,99	99,97	8,17
Corticosterona (ng/ml)	26	16,09	12,72	47,66	4,93
CBP (%)	20	47,76	38,87	93,51	0,00
Edema máximo (%)	28	13,54	9,32	35,49	0,00
Nematódeos (un)	31	59,42	66,50	284,00	0,00

CRC: comprimento rostro-cloacal; CBP: capacidade bactericida plasmática (porcentagem de bactéria morta em comparação ao controle positivo); Edema máximo (aumento da espessura da pata após injeção de fitohemaglutinina)

Tabela 2. Modelos selecionados, dentre os propostos na seleção de modelos para variáveis comportamentais, fisiológicas e ambientais em machos de *Rhinella granulosa* durante atividade reprodutiva.

Variável dependente	Modelo	AICc	dAICc	gl	Weight
Testosterona	Dia	263.8	0.0	3	0.757
Testosterona	Umidade	205,0	0,0	3	0,51
Corticosterona	Hora+Dia	206.3	0.0	4	0.473
	Dia	207.2	1.0	3	0.294
Corticosterona	Temperatura*UR	143.0	0.0	5	0.7044
Densidade do coro	Temp. Água	135,5	0,0	3	0,57
Esforço vocal	Nulo	359.0	0.0	2	0.475
	Dia	360.2	1.2	3	0.262
Esforço vocal	Nulo	292,1	0,0	2	0,40
	Temperatura	293,4	1,4	3	0,20
Esforço vocal	Nulo	381,3	0,0	2	0,49
	Índice corpóreo	382,4	1,0	3	0,29

Figura 3. Relação entre concentração plasmática de testosterona e dia de coleta em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,321$

Figura 4. Relação entre concentração plasmática de testosterona e umidade relativa do ar em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,205$

Figura 5. Relação entre concentração plasmática de corticosterona e dia de coleta em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,084$

Figura 6. Relação entre concentração plasmática de corticosterona e horário de coleta em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. (Horário apresentado em minutos a partir das 20h26min). $R^2=0,008$

Figura 7. Relação entre concentração plasmática de corticosterona e temperatura do ar em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,342$

Figura 8. Relação entre concentração plasmática de corticosterona e umidade relativa do ar em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva

Figura 9. Relação entre densidade do coro (un) e temperatura da água em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,460$

Figura 10. Relação entre esforço vocal e temperatura de ar em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,111$

Figura 11. Relação entre esforço vocal e dia de coleta em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,044$

Figura 12. Relação entre Esforço vocal e índice corpóreo em machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,047$

Tabela 3. Resultados das análises de SEM para cada uma das variáveis imunológicas.

Modelos considerando CBP							
	n	χ^2			AIC	dAIC	weight
		χ^2	df	P			
Modelo 1	17	5,874	3	0,118	-15,261	3,3	0,1
Modelo2 *	17	0,575	2	0,750	-18,560	0	0,522
Modelo 3	17	9,544	2	0,008	-13,591	5	0,044
Modelo 4	17	6,240	2	0,044	-13,357	5,2	0,039
Modelo 5	17	9,806	3	0,020	-11,330	7,2	0,014
Modelo 6 *	17	5,815	2	0,055	-17,320	1,2	0,281
Modelos considerando PHA							
	n	χ^2			AIC	dAIC	weight
		χ^2	df	P			
Modelo 1	26	4,625	3	0,201	-80,343	6,2	0,033
Modelo2	26	2,264	2	0,322	-80,704	5,8	0,039
Modelo 3	26	4,917	2	0,086	-82,050	4,5	0,077
Modelo 4	26	4,251	2	0,119	-82,717	3,8	0,108
Modelo 5	26	4,947	3	0,176	-80,021	6,5	0,028
Modelo 6 *	26	0,464	2	0,793	-86,504	0	0,715

Modelos considerando nematódeos							
	n	χ^2			AIC	dAIC	weight
		χ^2	df	p			
Modelo 1	26	10,237	3	0,017	-59,579	9,1	0,0069
Modelo2	26	2,649	2	0,266	-65,167	3,5	0,1124
Modelo 3	26	7,044	2	0,030	-64,773	3,9	0,0922
Modelo 4	26	6,650	2	0,036	-65,167	3,5	0,1123
Modelo 5	26	7,212	3	0,065	-62,604	6,1	0,0312
Modelo 6 *	26	3,154	2	0,207	-68,662	0	0,645

CBP=capacidade bactericida plasmática; PHA=resposta inflamatória ao desafio com fitohemaglutinina; *=modelos selecionados ($p>0,05$ e $dAIC<2,0$).

Figura 13. Modelo 6, selecionado para machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva, considerando edema em resposta à injeção de fitohemaglutinina como variável imunológica. COR: níveis plasmáticos de corticosterona; TES: níveis plasmáticos de testosterona; EV: Esforço Vocal; PHA: resposta ao desafio com fitohemaglutinina. $\chi^2=0.464$; $df=2$; $p=0.793$. $*$ = $p<0.05$

Figura 14. Modelo 6, selecionado para machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva, considerando número de nematódeos como variável imunológica. COR: níveis plasmáticos de corticosterona; TES: níveis plasmáticos de testosterona; EV: Esforço Vocal; NEM: número de parasitas nematódeos nos órgãos internos. $\chi^2=3.154$; $df=2$; $p=0.207$; $*$ = $p<0.05$

Figura 15. Modelo 6, selecionado para machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva, considerando CBP como variável imunológica. COR: níveis plasmáticos de corticosterona; TES: níveis plasmáticos de testosterona; EV: Esforço Vocal; CBP: capacidade bactericida plasmática. $\chi^2=5.815$; $df=2$; $p=0.055$. $*=p<0.05$

Figura 16. Modelo 2, selecionado para machos de *Rhinella granulosa* durante a atividade reprodutiva, considerando CBP como variável imunológica. COR: níveis plasmáticos de corticosterona; TES: níveis plasmáticos de testosterona; EV: Esforço Vocal; CBP: capacidade bactericida plasmática. $\chi^2=0.575$; $df=2$; $p=0.750$. $*=p<0.05$

Figura 17. Relação entre esforço vocal e capacidade bactericida plasmática (CBP) considerando a concentração plasmática de corticosterona em machos de *R. granulosa* durante a atividade reprodutiva

Figura 18. Relação entre taxa e duração média de vocalização em machos de *R. granulosa* durante a atividade reprodutiva. $R^2=0,580$

Tabela 4. Estatística descritiva para variáveis fisiológicas e morfológicas de machos de *R. granulosa* submetidos a experimento de manipulação hormonal. Grupo Placebo: aplicação transdérmica de 5µl de óleo de gergelim; Grupo Cort-baixa: aplicação transdérmica de 4,2µg de corticosterona; Grupo Cort-alta: aplicação transdérmica de 7µg corticosterona; Grupo Testo-baixa: aplicação transdérmica de 3µg de testosterona; Grupo Testo-alta: aplicação transdérmica de 12µg de testosterona.

			n	Média	Desvio Padrão	Máximo	Mínimo
Corticosterona (ng/ml)	grupo Placebo	Campo	5	1,02	0,61	1,93	0,36
		1h	8	12,82	17,48	55,46	4,02
		10h	6	5,04	2,52	8,75	1,62
	grupo Cort-baixa	Campo	7	2,45	2,51	6,64	0,52
		1h	6	85,57	124,46	335,28	10,79
		10h	3	8,82	3,39	11,37	4,98
	grupo Cort-alta	Campo	7	2,84	4,08	11,80	0,49
		1h	7	268,11	532,43	1473,52	25,01
		10h	8	4,53	2,80	10,31	1,38
Testosterona (ng/ml)	grupo Placebo	Campo	6	3,91	3,70	10,55	1,14
		1h	6	0,73	0,49	1,56	0,33
		10h	5	1,30	1,18	3,24	0,25
	grupo Testo-baixa	Campo	3	9,64	15,00	26,95	0,57
		1h	5	18,34	18,83	42,77	3,52
		10h	7	8,11	3,96	13,46	3,63
	grupo Testo-alta	Campo	7	18,11	12,65	31,20	0,56
		1h	9	26,06	14,17	45,29	3,89
		10h	9	13,93	9,09	30,80	4,30
CBP (%)	grupo Placebo	Campo	10	9,75	23,85	74,42	0
		1h	9	37,73	46,57	97,67	0
		10h	9	34,30	42,55	89,71	0
	grupo Cort-baixa	Campo	9	6,94	20,83	62,50	0
		1h	8	48,95	34,52	89,71	0
		10h	9	46,92	41,57	94,12	0
	grupo Cort-alta	Campo	7	11,63	30,76	81,40	0
		1h	8	28,47	38,10	95,83	0
		10h	9	9,35	16,18	46,67	0
	grupo Testo-baixa	Campo	9	38,87	44,91	93,75	0
		1h	8	53,29	45,70	98,75	0
		10h	9	45,89	46,83	97,50	0
	grupo Testo-alta	Campo	7	2,77	7,32	19,38	0
		1h	6	44,56	49,13	95,83	0
		10h	9	29,00	36,87	97,50	0
Edema máximo em resposta a PHA (%)	grupo Placebo		10	10,49	6,69	21,84	0,82
	grupo Cort-baixa		10	12,26	9,96	32,74	0
	grupo Cort-alta		10	14,52	10,07	36,54	5,44
	grupo Testo-alta		10	7,87	5,94	17,72	0

Tabela 4. (continuação)

Edema máximo na pata controle (%)	grupo Placebo	10	1,79	2,11	6,00	0,00
	grupo Cort-baixa	10	1,89	2,16	4,90	0,00
	grupo Cort-alta	10	2,55	3,58	11,75	0,00
	grupo Testo-alta	10	1,46	2,56	8,33	0,00
Massa (g)	grupo Placebo	10	6,46	2,22	9,21	2,76
	grupo Cort-baixa	10	7,59	2,34	11,20	4,78
	grupo Cort-alta	10	7,05	1,36	9,40	4,41
	grupo Testo-alta	10	7,04	1,93	10,35	3,88
CRC (mm)	grupo Placebo	10	41,30	5,56	50,78	31,08
	grupo Cort-baixa	10	43,53	3,31	48,61	38,89
	grupo Cort-alta	10	42,53	2,72	46,97	36,94
	grupo Testo-alta	9	41,94	3,53	47,66	37,19
IC	grupo Placebo	10	-0,37	1,70	1,01	-5,05
	grupo Cort-baixa	10	0,19	0,76	1,33	-0,85
	grupo Cort-alta	10	0,07	0,34	0,56	-0,51
	grupo Testo-alta	9	0,12	0,59	0,94	-0,69

Figura 19. Níveis plasmáticos de testosterona 1h após aplicação transdérmica de óleo de gergelim (Placebo), e após 3 μ g (Testo-baixa) ou 12 μ g (Testo-alta) de testosterona, em machos de *Rhinella granulosa*. As barras indicam erro padrão.

Figura 20. Níveis plasmáticos de testosterona 10h após aplicação transdérmica de óleo de gergelim (Placebo), e após 3 μ g (Testo-baixa) ou 12 μ g (Testo-alta) de testosterona, em machos de *Rhinella granulosa*. As barras indicam erro padrão.

Figura 21. Níveis plasmáticos de corticosterona após aplicação transdérmica de 4,2 μ g de corticosterona, em machos de *Rhinella granulosa*. As barras indicam erro padrão.

Figura 22. Níveis plasmáticos de corticosterona após aplicação transdérmica de 7 μ g de corticosterona, em machos de *Rhinella granulosa*. As barras indicam erro padrão.

Figura 23. Níveis plasmáticos de corticosterona 1h após aplicação transdérmica de óleo de gergelim (Placebo), e após 4,2 μ g (Cort-baixa) ou 7 μ g (Cort-alta) de corticosterona, em machos de *Rhinella granulosa*. As barras indicam erro padrão.

Figura 24. Capacidade bactericida plasmática (CBP) de machos de *R. granulosa* em campo e após aplicação transdérmica de 4,2µg de corticosterona

Figura 25. Capacidade bactericida plasmática (CBP) de machos de *R. granulosa* em campo e após aplicação transdérmica de 7µg de corticosterona.

Figura 26. Capacidade bactericida plasmática (CBP) de machos de *R. granulosa* em campo e após aplicação transdérmica de 5µg de óleo de gergelim

Figura 27. Capacidade bactericida plasmática (CBP) de machos de *R. granulosa* em campo e após aplicação transdérmica 12µg de testosterona.

Figura 28 Resposta ao desafio imunológico com fitohemaglutinina em machos de *R. granulosa* após manipulação hormonal. Grupo Placebo: aplicação de 5 μ l de óleo de gergelim; Grupo Testo-alta: 12 μ g de testosterona; Grupo Cort-baixa 4,2 μ g de corticosterona; Grupo Cort-alta: 7 μ g de corticosterona.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, S. A., Dauphinee, M. J., & Talal, N. (1985). Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. *Journal of Immunology*, 134(1), 204–210.
- Angelier, F. & Wingfield, J. C. (2013) Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: Theory, hypotheses and perspectives. *General and Comparative Endocrinology*, 190, 118–128.
- Assis, V. R. De, Titon, S. C. M., Barsotti, A. M. G., Spira, B., & Gomes, F. R. (2013). Antimicrobial Capacity of Plasma from Anurans of the Atlantic Forest. *South American Journal of Herpetology*, 8(3), 155–160.
- Assis, V. R., Navas, C. A., Mendonça, M. T., & Gomes, F. R. (2012). Vocal and territorial behavior in the Smith frog (*Hypsiboas faber*): Relationships with plasma levels of corticosterone and testosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 163(3-4), 265–271.
- Assis, V. R., Titon, S. C. M., Barsotti, A. M. G., Titon Jr., B., & Gomes, F. R. (2015). Effects of Acute Restraint Stress, Prolonged Captivity Stress and Transdermal Corticosterone Application on Immunocompetence and Plasma Levels of Corticosterone on the Cururu Toad (*Rhinella icterica*). *Plos One*, 10(4), e0121005.
- Assis, V. R. Níveis plasmáticos de corticosterona, testosterona e imunocompetência em Bufonídeos. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, 2015.
- Bellavance, M. & Rivest, S. (2014) The HPA – immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. *Frontiers in immunology*, 5, 1-13.
- Bevier, C. R. (1997). Utilization of energy substrates during calling activity in tropical frogs. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(5), 343–352.
- Bilbo, S. D., & Nelson, R. J. (2001). Sex steroid hormones enhance immune function in male and female Siberian hamsters. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(1), R207–R213.
- Bolker, M. (2015). Package “bbmle”: Tools for general maximum likelihood estimation. v. 1.0.17, 30.
- Bortolotti, G. R., Mougeot, F., Martinez-Padilla, J., Webster, L. M. I., & Piernney, S. B. (2009). Physiological stress mediates the honesty of social signals. *PLoS ONE*, 4(3).
- Box, G.E.P. & Cox, D. R. (1964) An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 26 (2), 211–252.
- Braude S.; Tang-Martinez, Z.; Taylor, G.T. (1999) Stress, testosterone, and the immunoredistribution hypothesis. *Behavioral Ecology* (1999) 10 (3):345–350.
- Brown, G.P., Shilton, C.M. & Shine, R. (2011). Measuring amphibian immunocompetence: Validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(4), pp.341–348.
- Brønseth, T., & Folstad, I. (1997). The effect of parasites on courtship dance in threespine sticklebacks: more than meets the eye? *Canadian Journal of Zoology*, 75(4), 589–594.

- Burmeister, S., Somes, C., & Wilczynski, W. (2001). Behavioral and hormonal effects of exogenous vasotocin and corticosterone in the green treefrog. *General and Comparative Endocrinology*, 122(2), 189–197.
- Buttgereit, F., Scheffold, A. (2002) Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*, 67, 529–534.
- Carrillo-Vico, A., Lardone, P., Álvarez-Sánchez, N., Rodríguez-Rodríguez, A., & Guerrero, J. (2013). Melatonin: Buffering the Immune System. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 8638–8683.
- Castellano, S., Zanollo, V., Marconi, V., & Berto, G. (2009). The mechanisms of sexual selection in a lek-breeding anuran, *Hyla intermedia*. *Animal Behaviour*, 77(1), 213–224.
- Cermakian, N., Westfall, S., & Kiessling, S. (2014). Circadian clocks and inflammation: Reciprocal regulation and shared mediators. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(4), 303–318.
- Crossin, G. T., Love, O. P., Cooke, S. J., & Williams, T. D. (2015). Glucocorticoid manipulations in free-living animals: considerations of dose delivery, life-history context, and reproductive state. *Functional Ecology*. <http://doi.org/10.1111/1365-2435.12482>
- Desprat, J. L., Lengagne, T., Dumet, a., Desouhant, E., & Mondy, N. (2015). Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog: trade-off between sexual signals and immunity? *Behavioral Ecology*, 6 (4), 1138-1146.
- Dhabhar, F. S. (2002). Stress-induced augmentation of immune function - The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*, 16(6), 785–798.
- Dhabhar, F. S. (2014). Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*, 58(2-3), 193–210.
- Dhabhar, F. S., & McEwen, B. S. (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1059–1064.
- Duellman, W.E., Trueb, L. *Biology of amphibians*. Ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1994.
- Emerson, S. B., & Hess, D. L. (2001). Glucocorticoids, androgens, testis mass, and the energetics of vocalization in breeding male frogs. *Hormones and Behavior*, 39(1), 59–69.
- Emerson, S.B. & Hess, D.L.(1996). The role of androgens in opportunistic breeding, tropical frogs. *General and Comparative Endocrinology*, 103(2), pp.220–230.
- Emerson, S.B. Male advertisement calls: Behavioral variation and physiological processes. In: Ryan, M.J. *Anuran communication*, Smithsonian Institution Press, 2001, pp. 36–44.
- Epskamp, S. (2015). Package ‘semPlot’: Path diagrams and visual analysis of various SEM packages” output.
- Evans, M. R.; Goldsmith, A. R., Norris, S.R.A. (2000) The effects of testosterone on antibody production and plumage coloration in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behav Ecol Sociobiol*, 47, 156–163.

- Ezenwa, V. O., Stefan Ekernas, L., & Creel, S. (2012). Unravelling complex associations between testosterone and parasite infection in the wild. *Functional Ecology*, 26(1), 123–133.
- Folstad, I., & Karter, A. J. (1992). Parasites , Bright Males , and the Immunocompetence Handicap, 139(3), 603–622.
- Uchoa, E. T., Aguilera, G., Herman, J. P., Fiedler, J. L., Deak, T., & de Sousa, M. B. C. (2014). Novel aspects of glucocorticoid actions. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(9), 557–72. <http://doi.org/10.1111/jne.12157>
- Fox, J., Weisberg, S., Adler, D., Bates, D., Baud-, G., Ellison, S., ... Zeileis, A. (2015). Package “car”: Companion to Applied Regression.
- Geiger, S. S., Fagundes, C. T., & Siegel, R. M. (2015). Chrono-Immunology: Progress and Challenges in Understanding Links between the Circadian and Immune Systems. *Immunology*, 146(3), 349–58.
- Gerhardt, H. C. (1991). Female mate choice in treefrogs: static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behaviour*, 42(4), 615–635.
- Greenfield, M. D. (1994). Synchronous and alternating choruses in insects and anurans: common mechanisms and diverse functions. *American Zoologist*, 34(6), 605–615.
- Hamilton, W. D., & Zuk, M. (1982). Heritable True Fitness and Bright Birds : A Role for Parasites ? *Science*, 218(4570), 384–387.
- Hou, J., & Zheng, W. F. (1988). Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 10(1), 15–22.
- Husak, J. F., & Moore, I. T. (2008). Stress hormones and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution (Personal Edition)*, 23(10), 532–534.
- Jim, J. Distribuição altitudinal e estudo de longa duração de anfíbios da região de Botucatu, estado de São Paulo. Tese. Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, 2002.
- Korkmaz, S., Goksuluk, D., & Zararsiz, G. (2015). Package “ MVN ”: Multivariate Normality Tests.
- Lea, A. M., & Ryan, M. J. (2015). Irrationality in mate choice revealed by tungara frogs. *Science*, 6251, 964–966
- Leary, C. J., & Knapp, R. (2014). The stress of elaborate male traits: Integrating glucocorticoids with androgen-based models of sexual selection. *Animal Behaviour*, 89, 85–92.
- Leary, C. J., Garcia, A. M., Knapp, R., & Hawkins, D. L. (2008). Relationships among steroid hormone levels, vocal effort and body condition in an explosive-breeding toad. *Animal Behaviour*, 76(1), 175–185.
- Leary, C. J., Lippincott, J., Harris, S., & Hawkins, D. L. (2015). A test of the Energetics-Hormone Vocalization model in the green treefrog. *General and Comparative Endocrinology*, 213, 32–39.
- Liebl, A. L., & Martin, L. B. (2009). Simple quantification of blood and plasma antimicrobial capacity using spectrophotometry. *Functional Ecology*, 23(6), 1091–1096.
- Löwenberg, M.; Stahn C.; Hommes, D.W. Buttgerit, F. Novel insights into mechanisms

- of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids*, 73, 1025–1029.
- Madelaire, C. B. Relação sazonal entre reprodução, imunidade e ocorrência de endoparasitas em anfíbios anuros da Caatinga. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia, 2012.
- Martin, L. B. (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. *General and Comparative Endocrinology*, 163(1-2), 70–76.
- Mazerolle, M. (2006). Improving data analysis in herpetology: using Akaike's Information Criterion (AIC) to assess the strength of biological hypotheses. *Amphibia-Reptilia*, 27(2), 169–180.
- McCormick, G. L., & Langkilde, T. (2014). Immune responses of eastern fence lizards (*Sceloporus undulatus*) to repeated acute elevation of corticosterone. *General and Comparative Endocrinology*, 204(May), 135–140.
- McCormick, G. L., Shea, K., & Langkilde, T. (2015). How do duration, frequency, and intensity of exogenous CORT elevation affect immune outcomes of stress? *General and Comparative Endocrinology*.
- McLister, J.D., 2001. Physical Factors Affecting the Cost and Efficiency of Sound Production in the Treefrog *Hyla versicolor*. *Journal of Experimental Biology*, 204(1), p.69-80.
- Mendonça, M. T., Chernetsky, S. D., Nester, K. E., & Gardner, G. L. (1996). Effects of gonadal sex steroids on sexual behavior in the big brown bat, *Eptesicus fuscus*, upon arousal from hibernation. *Hormones and Behavior*, 30(2), 153–161.
- 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. *Evolution*, 64(1), 166–179.
- Mitchell, R. (1992). Testing Evolutionary and Ecological Hypotheses Using Path Analysis and Structural Equation Modelling. *Functional Ecology*, 6(2), 123–129.
- Moore, F. L., & Rose, J. D. (2002). Sensorimotor Processing Model : How Vasotocin and Corticosterone Interact and Control Reproductive Behaviors in an Amphibian.
- Moore, F. L., Boyd, S. K., & Kelley, D. B. (2005). Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Hormones and Behavior*, 48(4), 373–383.
- Moore, I. T., & Jessop, T. S. (2003). Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior*, 43(1), 39–47.
- Mosconi, G., Palermo, F., Carotti, M., Kikuyama, S., Yamamoto, K., & Polzonetti-Magni, A. (2006). Neuroendocrine modulation of stress response in the anuran, *Rana esculenta*. *Amphibia-Reptilia*, 27(3), 401–408.
- Muehlenbein, M. P., & Bribiescas, R. G. (2005). Testosterone-mediated immune functions and male life histories. *American Journal of Human Biology the Official Journal of the Human Biology Council*, 17(5), 527–558.
- Navas, C. a., Gomes, F.R. & Carvalho, J.E.(2008). Thermal relationships and exercise physiology in anuran amphibians: Integration and evolutionary implications. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151(3), pp.344–362.
- Norton, J. M., & Wira, C. R. (1977). Dose-related effects of the sex hormones and cortisol

- on the growth of the bursa of Fabricius in chick embryos. *Journal of Steroid Biochemistry*, 8(9), 985–987.
- Orchinik, M., Licht, P., & Crews, D. (1988). Plasma steroid concentrations change in response to sexual behavior in *Bufo marinus*. *Hormones and Behavior*, 22(3), 338–350.
- Pohanka, M. (2013). Impact of melatonin on immunity: a review. *Central European Journal of Medicine*, 8(4), 369–376.
- Prestwich, K.N. (1994) The Energetics of Acoustic Signaling in Anurans and Insects. *American Zoologist*, 34, 625–643.
- Pugesek, B. H., Tomer, A., & Eye, A. Von. (2003). *Structural Equation Modeling. Applications in Ecological and Evolutionary Biology*. Structural Equation Modeling.
- Rastogi, R. K., Iela, L., Delrio, G., & Bagnara, J. T. (1986). Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. II. The male. *General and Comparative Endocrinology*, 62(1), 23–35.
- Roberts, M. L., Buchanan, K. L., Hasselquist, D., & Evans, M. R. (2007). Effects of testosterone and corticosterone on immunocompetence in the zebra finch. *Hormones and Behavior*, 51(1), 126–134.
- Roberts, M., & Peters, A. (2009). Is testosterone immunosuppressive in a condition-dependent manner? An experimental test in blue tits. *The Journal of Experimental Biology*, 212(Pt 12), 1811–1818.
- Romero, L. M. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 128(1), 1–24.
- Ruiz, M., French, S. S., Demas, G. E., & Martins, E. P. (2010). Food supplementation and testosterone interact to influence reproductive behavior and immune function in *Sceloporus graciosus*. *Hormones and Behavior*, 57(2), 134–139.
- Ryan, M. J. *The tungara frog: A Study in Sexual Selection and Communication*. The University of Chicago Press, USA, 1953.
- Sapolsky, R. M., Romero, M. L., & Munck, a. (2000). How do glucocorticoids influence the stress response? *Endocrine Reviews*, 21(1), 55–89.
- 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. *General and Comparative Endocrinology*, 136(1), 90–100.
- Shipley, B. (2004). *Cause and Correlation in Biology A User ' s Guide to Path Analysis , Structural Equations and Causal Inference*. Cambridge University Press (Vol. 20).
- Solís, R., & Penna, M. (1997). Testosterone levels and evoked vocal responses in a natural population of the frog *Batrachyla taeniata*. *Hormones and Behavior*, 31(2), 101–109.
- Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 6(4), 318–328.
- Sullivan, B. K., & Kwiatkowski, M. a. (2007). Courtship displays in anurans and lizards: theoretical and empirical contributions to our understanding of costs and selection on males due to female choice. *Functional Ecology*, 21(4), 666–675.

- Uchoa, E. T., Aguilera, G., Herman, J. P., Fiedler, J. L., Deak, T., & de Sousa, M. B. C. (2014). Novel aspects of glucocorticoid actions. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(9), 557–72.
- Vitousek, M. N., Zonana, D. M., & Safran, R. J. (2014). An integrative view of the signaling phenotype: Dynamic links between signals, physiology, behavior and social context. *Current Zoology*, 60(6), 739–754.
- Weatherhead, P. J., Metz, K. J., Bennett, G. F., & Irwin, R. E. (1993). Parasite faunas, testosterone and secondary sexual traits in male red-winged blackbirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 33(1), 13–23.
- Weinstein, Y., Ran, S., & Segal, S. (1984). Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 132(2), 656–661.
- Wells, K. D. (1988). The effect os social interactions on anuran vocal behavior. In B. Fritzsch (Ed.), *Offprints from the evolution of the amphibians auditory system*.
- Wells, K. D. *The ecology and behavior of amphibians*. The University of Chicago Press, USA, 2007.
- Wells K. D. & Taigen, T. L. (1989) Calling energetics of a neotropical tree frog, *Hyla microcephala*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 25, 13-22.
- Wieggers, G. J., Labeur, M. S., Stec, I. E., Klinkert, W. E., Holsboer, F., & Reul, J. M. (1995). Glucocorticoids accelerate anti-T cell receptor-induced T cell growth. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(4), 1893–1902.
- Wilczynski, W., Lynch, K. S., & O'Bryant, E. L. (2005). Current research in amphibians: Studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Hormones and Behavior*, 48(4), 440–450.
- Wingfield, J. C., & Sapolsky, R. M. (2003). Reproduction and resistance to stress: when and how. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(8), 711–724.
- Wingfield, J. C., Hegner, R. E., Dufty, Jr., A. M., & Ball, G. F. (1990). The “Challenge Hypothesis”: Theoretical Implications for Patterns of Testosterone Secretion, Mating Systems, and Breeding Strategies. *The American Naturalist*, 136(6), 829.
- Wingfield, J.C., (2013). The comparative biology of environmental stress: Behavioural endocrinology and variation in ability to cope with novel, changing environments. *Animal Behaviour*, 85(5), pp.1127–1133.
- Woodley, S. K. Hormones and Reproductive Behavior in Amphibians. In: Norris, D. O.; Lopez, K. H. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, Volume 2: Amphibians, Academic Press, pp. 143-169, 2011.
- Yves, A., Oberski, D., Byrnes, J., Vanbrabant, L., Savalei, V., Merkle, E., ... Yvesrosseelugentbe, M. Y. R. (2015). Package “lavaan .”
- Zahavi, A. (1975). Mate selection-a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53(1), 205–214.
- Zerani, M., Amabili, F., Mosconi, G., & Gobbetti, A. (1991). Effects of Captivity Stress on Plasma Steroid Levels in the Green Frog , *Rana esculenta*, During the Annual Reproductive Cycle, 98A(3/4), 491–496.

ANEXO A- Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

OF.CEUA/IB/011/2014

São Paulo, 21 de março 2014

Prezado Senhor,

Dirijo-me a V.Sa. para informar que a Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 20 de março de 2014, **APROVOU** o Projeto "Relações entre comportamento vocal, imunidade e níveis plasmáticos de corticosterona e testosterona em bufonídeos da Caatinga", **Protocolo 197/2014**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Bruna de Oliveira Cassettari).

Para utilização de animais silvestres, o pesquisador responsável deve, ainda, ter/portar as autorizações de coleta, transporte e manutenção emitidas pelos órgãos ambientais competentes.

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

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

Atenciosamente,

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

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. FERNANDO RIBEIRO GOMES

Departamento de Fisiologia - IB

ANEXO B – *scripts* utilizados para análises estatísticas no programa R

MODELAGEM DE EQUAÇÕES ESTRUTURAIS:

```
#tabela de dados
dados <-
read.table("dados.csv",header=TRUE,se
p=";", row.names = 1)
summary(dados)
str(dados)

#tirando os NAs
daNA<-na.omit(dados[,1:4])
daNA[,1:4]

#padronizando ("ranging") por valores
mínimos e máximos - 0 a 1
RA <- function(x) {(x-min(x)) /
(max(x)-min(x))}
daRA<-daNA
daRA[,1] <- RA(daNA[,1])
daRA[,2] <- RA(daNA[,2])
daRA[,3] <- RA(daNA[,3])
daRA[,4] <- RA(daNA[,4])

#powertransformation para a
padronização range
powRA<-daRA
mul<-powerTransform(powRA+1)
summary(mul)
novaRA<-
bcPower(powRA+1,lambda=coef(mul))
colnames(novaRA) <- colnames(daRA)

#testes de normalidade e normalidade
multivariada
uniPlot(novaRA,type = "histogram")
uniNorm(novaRA)
mardiaTest(novaRA[,1:4],qqplot = T)

#modelos

modell<- 'EV ~ TESTO
      CORT ~ EV
      CBP ~ CORT
      '
fit.modellnovaRA <- sem(modell, data
= novaRA, fixed.x=TRUE)
summary(fit.modellnovaRA,
fit.measures = TRUE, standardized =
TRUE, rsq = T)
semPaths(fit.modellnovaRA,
what="std", layout="tree2",
intercepts=F, residuals=F,
thresholds=F, edge.color="black",
rotation=2, edge.label.cex=1,
sizeMan=7)

model2<- '
      CORT ~ TESTO
      CBP ~ CORT
      EV ~ CORT
      '
fit.model2novaRA <- sem(model2, data
= novaRA, fixed.x=TRUE)
summary(fit.model2novaRA,
fit.measures = TRUE, standardized =
TRUE, rsq = T)
semPaths(fit.model2novaRA,
what="std", layout="tree2",
intercepts=F, residuals=F,
thresholds=F, edge.color="black",
rotation=2, edge.label.cex=1,
sizeMan=7)

model3<- '
      CBP ~ TESTO + CORT
      EV ~ CBP
      '
fit.model3novaRA <- sem(model3, data
= novaRA, fixed.x=TRUE)
summary(fit.model3novaRA,
fit.measures = TRUE, standardized =
TRUE, rsq = T)
semPaths(fit.model3novaRA,
what="std", layout="tree2",
intercepts=F, residuals=F,
thresholds=F, edge.color="black",
rotation=2, edge.label.cex=1,
sizeMan=7)

model4<- '
      CBP ~ CORT
      EV ~ CBP + TESTO
      '
fit.model4novaRA <- sem(model4, data
= novaRA, fixed.x=TRUE)
summary(fit.model4novaRA,
fit.measures = TRUE, standardized =
TRUE, rsq = T)
semPaths(fit.model4novaRA,
what="std", layout="tree2",
intercepts=F, residuals=F,
thresholds=F, edge.color="black",
rotation=2, edge.label.cex=1,
sizeMan=7)

model5<- '
      CORT ~ TESTO
      CBP ~ CORT
      EV ~ CBP
      '
fit.model5novaRA <- sem(model5, data
= novaRA, fixed.x=TRUE)
summary(fit.model5novaRA,
fit.measures = TRUE, standardized =
TRUE, rsq = T)
semPaths(fit.model5novaRA,
what="std", layout="tree2",
intercepts=F, residuals=F,
thresholds=F, edge.color="black",
rotation=2, edge.label.cex=1,
sizeMan=7)
```

ANEXO B (Continuação)

```

model6<- '
  EV ~ TESTO + CORT
  CBP ~ EV
  '
fit.model6novaRA <- sem(model6, data
= novaRA, fixed.x=TRUE)
summary(fit.model6novaRA,
fit.measures = TRUE, standardized =
TRUE, rsq = T)
semPaths(fit.model6novaRA,
what="std", layout="tree2",
intercepts=F, residuals=F,
thresholds=F, edge.color="black",
rotation=2, edge.label.cex=1,
sizeMan=7)

#Dados gerais das estatísticas da
seleção de modelos
aices<-AICtab(fit.model1novaRA,
fit.model2novaRA, fit.model3novaRA,
fit.model4novaRA, fit.model5novaRA,
fit.model6novaRA, base=T, weights=T)

```

SELEÇÃO DE MODELOS:

```

dados<-read.table("granulosa.txt",header=TRUE)
df.dados<-data.frame(dados[,1:3])
attach(df.dados)
rownames(df.dados)->names(EV)
rownames(df.dados)->names(IC)
rownames(df.dados)->names(CG)
str(dados)

glm(EV~1)->r1
glm(EV~IC)->r2
glm(EV~CG)->r3
glm(EV~IC+CG)->r4
glm(EV~IC*CG)->r5

AICctab(r1,r2,r3,r4,r5, base=T, weights=T, nobs=31)

```

ANEXO C – resultado completo da seleção de modelos para variáveis comportamentais, fisiológicas e ambientais em machos de *Rhinella granulosa* durante atividade reprodutiva.

Variável dependente	Modelo	AICc	dAICc	gl	Weight
Testosterona	Dia	263.8	0.0	3	0.757
	Dia+ Hora	266.5	2.7	4	0.192
	Dia*Hora	269.2	5.4	5	0.051
	Hora	278.0	14.3	3	<0.001
	Nulo	279.3	15.5	2	<0.001
Testosterona	Umidade	205,0	0,0	3	0,51
	UR + Temp.água	207.1	2.2	4	0.1732
	Temp + UR	207.7	2.7	4	0.1315
	Temp * UR	208.2	3.3	5	0.1001
	Temp + UR + Temp.água	210.0	5.1	5	0.0407
	UR * Temp.água	210.2	5.2	5	0.0382
	Nulo	216.8	11.8	2	0.0014
	Temp.água	218.4	13.4	3	<0.001
	Temp. * Temp.água	218.8	13.8	5	<0.001
	Temperatura	219.0	14.1	3	<0.001
	Temp. + Temp.água	221.0	16.0	4	<0.001
	Temp.*Temp. água*UR	221.2	16.2	9	<0.001
Corticosterona	Hora+Dia	206.3	0.0	4	0.473
	Dia	207.2	1.0	3	0.294
	Dia*Hora	209.1	2.8	5	0.118
	Nulo	209.6	3.3	2	0.089
	Hora	212.1	5.8	3	0.026
Corticosterona	Temperatura*UR	143.0	0.0	5	0.7044
	Temperatura+UR	147.3	4.3	4	0.0807
	Temperatura	147.6	4.6	3	0.0693
	UR	148.1	5.1	3	0.0541
	Temp.água * UR	149.3	6.4	5	0.0293
	Temperatura + Temp.água	149.9	6.9	4	0.0222
	Temperatura + Temp.água + UR	151.1	8.1	5	0.0124
	Temp.água + UR	151.1	8.2	4	0.0119
	Nulo	151.7	8.7	2	0.0090
	Temperatura * Temp.água	153.4	10.4	5	0.0039
	Temp.água	154.1	11.1	3	0.0027
	Temperatura * Temp.água * UR				

ANEXO C (continuação)

Densidade do coro	Temp. água	135,5	0,0	3	0,57
	Temp. + Temp.água	138.4	2.9	4	0.1297
	Temp. * Temp.água	138.5	3.0	5	0.1239
	UR + Temp.água	138.6	3.2	4	0.1164
	UR * Temp.água	141.3	5.9	5	0.0299
	Temp + UR + Temp.água	142.0	6.6	5	0.0213
	UR	144.9	9.5	3	0.0050
	Nulo	145.0	9.5	2	0.0048
	Temperatura	147.4	11.9	3	0.0015
	Temp + UR	148.0	12.6	4	0.0011
	Temp * UR	151.1	15.7	5	<0.001
	Temp * UR * Temp.Água	152.7	17.2	9	<0.001
Esforço vocal	Nulo	359.0	0.0	2	0.475
	Dia	360.2	1.2	3	0.262
	Hora	361.4	2.5	3	0.139
	Dia + Hora	362.1	3.1	4	0.101
	Dia * Hora	365.1	6.1	5	0.023
Esforço vocal	Nulo	292,1	0,0	2	0,40
	Temperatura	293,4	1,4	3	0,20
	Temp. Água	294.3	2.3	3	0.1261
	UR	294.6	2.6	3	0.1095
	Temp. + Temp. água	296.0	3.9	4	0.0554
	Temp. + UR	296.4	4.3	4	0.0454
	Temp. água + UR	297.3	5.2	4	0.0287
	Temp. * Temp. água	299.0	7.0	5	0.0121
	Temp. + Temp. água + UR	299.2	7.1	5	0.0113
	Temp. * UR	299.5	7.4	5	0.0097
	Temp. água * UR	299.6	7.5	5	0.0093
	Temp. * Temp. água * UR	314.6	22.6	9	<0.001
Esforço vocal	Nulo	381,3	0,0	2	0,49
	Índice corpóreo	382,4	1,0	3	0,29
	Corpos gordurosos	383.8	2.4	3	0.142
	IC + Corpos gordurosos	385.0	3.7	4	0.076
	IC * Corpos gordurosos	387.9	6.6	5	0.018
CBP	Nulo	197.7	0.0	2	0.567
	IC	199.7	2.0	3	0.205
	CG	200.5	2.8	3	0.136
	IC*CG	202.5	4.8	5	0.050
	IC+CG	202.9	5.2	4	0.042
PHA	Nulo	222.2	0.0	2	0.582
	IC	224.5	2.3	3	0.184
	CG	224.6	2.4	3	0.173
	IC + CG	227.2	5.0	4	0.049
	IC * CG	229.9	7.7	5	0.012
Nematódeos	Nulo	340.8	0.0	2	0.560
	CG	342.8	2.0	3	0.204
	IC	343.2	2.4	3	0.167
	IC + CG	345.5	4.7	4	0.054
	IC * CG	347.9	7.1	5	0.016