

Vania Regina de Assis

Níveis plasmáticos de corticosterona, testosterona
e imunocompetência em Bufonídeos

Plasma levels of corticosterone, testosterone and
immunocompetence in Bufonids

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Fernando Ribeiro Gomes
Co-orientador: Carlos A. N. Iannini

São Paulo

2015

RESUMO GERAL

Glicocorticóides modulam a resposta imune de forma complexa em vertebrados expostos a diferentes estressores. Dado que as populações naturais têm estado expostas a uma multiplicidade de estressores, uma melhor compreensão da associação funcional entre a duração e a intensidade da resposta ao estresse, as mudanças resultantes nos níveis dos hormônios esteróides e seu impacto sobre os diferentes aspectos da imunocompetência emergem como um ponto chave para as estratégias de conservação dos vertebrados. Nós investigamos as relações entre os níveis plasmáticos de hormônios esteróides e a imunocompetência inata em anfíbios anuros, incorporando as metodologias de desafio de contenção, elevação experimental dos níveis de corticosterona por aplicação transdérmica, capacidade bactericida por espectrofotometria e o desafio imunológico com fitohemaglutinina. Nossos resultados demonstram que a capacidade bactericida plasmática (CBP) medida por espectrofotometria é um método confiável e preciso para estimar a imunocompetência de anfíbios anuros, além disso, mostramos a existência de uma grande diversidade interespecífica na CBP de anuros machos. Quando quatro diferentes espécies de Bufonídeos foram submetidas a um desafio de contenção, as respostas gerais incluíram aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) e da relação neutrófilo/linfócito (N:L) e diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona (T). As respostas da CBP à contenção foram muito mais variáveis, com *R. icterica* mostrando diminuição e *R. marina* mostrando aumento dos valores de CBP. Adicionalmente, CORT e N:L tenderam a aumentar mais em resposta à contenção com restrição de movimento do que à contenção sem restrição de movimento, indicando que os sapos demonstraram um aumento da resposta ao estresse quando submetidos ao estressor mais intenso. Todas as variáveis estudadas mostraram variação interespecífica. *Rhinella ornata* apresentou os maiores níveis basais de CORT quando comparado com as outras espécies, enquanto *R. ornata* e *R. icterica* mostraram os maiores

valores basais de CBP. Entretanto, as mudanças na relação N:L, nos níveis de T e na CBP, não foram correlacionadas com o aumento em CORT, dentro ou entre espécies. A aplicação transdérmica de corticosterona eficientemente simulou eventos repetidos de resposta ao estresse agudo em *Rhinella icterica*, sem alterar os parâmetros imunitários, mesmo após treze dias de tratamento. Curiosamente, o cativeiro a longo prazo não atenuou a resposta ao estresse, uma vez que estes sapos mantiveram um aumento de três vezes em CORT mesmo depois de três meses sob estas mesmas condições. Além disso, a manutenção em cativeiro a longo prazo, nas mesmas condições, aumentou a contagem total de leucócitos (TLC) e gerou uma diminuição ainda maior na CBP, sugerindo que as consequências da resposta ao estresse podem ser agravadas pelo tempo em cativeiro. Com base em nossos resultados, consideramos que uma avaliação cuidadosa é necessária para compreender a modulação da resposta imunitária pelo estresse a nível intra e interespecífico. A inclusão de diferentes segmentos da resposta imune é desejável, e a padronização da coleta de dados para todas as espécies sob o mesmo período (em geral, dentro ou fora da época reprodutiva) e mesma atividade (em geral, vocalizando ou forrageando) se faz obrigatória.

GENERAL ABSTRACT

Glucocorticoids modulate the immune response in complex ways in vertebrates exposed to different stressors. Given that natural populations have been exposed to a multitude of stressors, a better understanding of the functional association between duration and intensity of the stress response, the resulting changes in steroid hormone levels and their impact on different aspects of immunocompetence emerges as a cornerstone for vertebrate conservation strategies. We investigated the relationships between steroids levels and innate immunocompetence in anuran amphibians, incorporating the methodology of restraint challenge, experimental elevation of corticosterone levels by transdermal application, bacterial killing ability by spectrophotometry and the immune challenge with phytohemagglutinin. Our results demonstrate that the bacterial killing ability (BKA) measured by spectrophotometry is a reliable and accurate method to estimate the immunocompetence of anuran amphibians, additionally showed the existence of a large interspecific diversity in BKA from male anurans. When four different species of Bufonids were submitted to a restraint challenge, the general responses included increased in corticosterone plasma levels (CORT) and neutrophil/lymphocyte ratio (N:L) and decreased in testosterone plasma levels (T). The responses of BKA to restraint were much more variable, with *R. icterica* showing decreased and *R. marina* showing increased values. Additionally, CORT and N:L tended to increase more in response to restraint with movement restriction than to restraint without movement restriction, indicating that toads showed an increased stress response to the more intense stressor. All variables studied show interspecific variation. *Rhinella ornata* showed higher baseline CORT when compared to other species, while *R. ornata* and *R. icterica* showed the highest baseline BKA values. However, changes in N:L ratio, T levels and BKA, were not correlated to increased CORT within or between species. Transdermal application of corticosterone efficiently mimics repeated acute stress response events in *Rhinella icterica*, without changing the immune parameters even after thirteen days

of treatment. Interestingly, long-term captivity did not mitigate the stress response, since the toads maintained three fold increased CORT even after three months under these conditions. Moreover, long-term captivity in the same condition increased total leukocyte count (TLC) and generated an even greater decrease in BKA, suggesting that consequences of the stress response can be aggravated by time in captivity. Based on our results, we consider that a careful evaluation is necessary in order to understand the modulation of the immune response by stress at intra and interspecific levels. The inclusion of different segments of the immune response is desirable, and a standardized data collection for all the species under the same period (e.g. inside or outside of breeding season) and same activity (e.g. calling or foraging) is mandatory.

INTRODUÇÃO GERAL

Implicações ecológicas e evolutivas da imunocompetência

Organismos eucarióticos devem se defender continuamente da infiltração e colonização por microrganismos. Estas defesas ocorrem através de barreiras mecânicas (pele e mucosas), inibidores químicos e bioquímicos, células e fatores solúveis. As defesas imunitárias ocorrem através de mecanismos complexos e podem ser divididas em dois tipos de respostas distintas, porém inter-relacionadas: a imunidade adquirida e a imunidade inata (Tieleman et al., 2005). A imunidade adquirida requer exposição prévia a antígenos específicos, sendo esta resposta complexa e muitas vezes dependente de vários dias para ser completamente ativada. A resposta inata, por outro lado, compreende uma parcela significativa do sistema imune e atua como um mecanismo de defesa inicial contra a colonização por micro-organismos logo após a infecção, sendo rapidamente ativada e atuando de forma a eliminar ou retardar os estágios iniciais da infecção. A imunidade inata constitui-se de uma mistura de componentes humorais, tais como anticorpos naturais, complementos, proteínas de fase aguda e elementos celulares (macrófagos, neutrófilos/heterófilos e trombócitos) (Tieleman et al., 2005). Como a imunidade inata é não específica, ela não requer exposição prévia a antígenos específicos. Adicionalmente, o sistema imune inato funciona como ativador da imunidade adquirida, gerando fatores quimiotáticos e produzindo citocinas que iniciam o desenvolvimento e a maturação de populações específicas de células T e células B (Merchant et al., 2003).

Várias linhas de evidências têm enfatizado a importância da capacidade de resposta imune como parte da evolução de diversos aspectos da história de vida dos animais. Hamilton e Zuk (1982) propuseram, por exemplo, que a preferência sexual das fêmeas de aves por machos com ornamentos estruturais mais complexos encontra-se associada à correlação entre a capacidade dos machos em resistir à carga parasitária e a condição da ornamentação. Outros estudos têm também demonstrado variação interespecífica na competência do sistema imune inato em aves

de acordo com seu ambiente. Com um exemplo, aves provenientes de ambientes com baixa incidência de parasitas, como o Ártico e ambientes marinhos, exibem defesas imunitárias menos robustas do que aves provenientes de ambientes temperados (Piersma, 1997). Complementarmente, espécies de aves com uma melhor resposta imune apresentam menores taxas metabólicas de repouso (Tieleman et al., 2005), sugerindo uma possível restrição energética para manutenção do sistema imune. Desta forma, espécies que apresentem menor custo energético de manutenção poderiam alocar proporcionalmente mais recursos para a constituição do sistema imune (Tieleman et al., 2005).

Espécies invasoras tendem a ter menor diversidade de parasitas e exibir menor prevalência de infecções do que espécies nativas (Mitchell and Power, 2003; Torchin et al., 2003) o que traz implicações da perspectiva da conservação e potencial invasivo de espécies. Lee et al., (2005) demonstraram que a resposta imune pode representar um fator importante, e geralmente ignorado, do sucesso de espécies invasoras. De acordo com este estudo, o pardal doméstico (*Passer domesticus*), uma espécie invasora altamente bem sucedida, não apresentou nenhuma alteração da eficiência reprodutiva em resposta a um protocolo de infecção experimental, enquanto outra espécie congênica (*Passer montanus*), uma espécie invasora bem menos agressiva, apresentou uma queda na produção de ovos de cerca de 40% em resposta ao mesmo desafio imunológico experimental (Lee et al., 2005).

Implicações ecológicas e evolutivas da imuno-modulação por hormônios esteróides

Imuno-modulação mediada por andrógenos

O hormônio esteróide testosterona vem sendo apontado como candidato para a mediação de diversos compromissos fenotípicos em machos de vertebrados durante a estação reprodutiva (Folstald e Karter, 1992; Ketterson e Nolan, 1992; Verhulst, et al., 1999; Muehlenbein e

Bribiescas, 2005). A testosterona aumenta o sucesso reprodutivo por promover o comportamento sexual, a defesa de território, o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e a produção de espermatozóides, enquanto reduz simultaneamente a aptidão, por suprimir características tais como cuidado parental e função imune (Ketterson and Nolan, 1999; Folstald and Karter, 1992; Owen-Ashley et al., 2004). No que diz respeito aos efeitos imunossupressores, a testosterona promove a involução do timo e redução de outros tecidos linfóides em mamíferos, bem como da bursa de Fabricius em aves (Norton e Wira, 1977; Weinstein et al., 1984). Adicionalmente, aplicações agudas de altas doses de testosterona reduzem tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células (Inman, 1978; Grossman, 1984; Ahmed et al., 1985), enquanto a administração sustentada de baixas doses reduz a atividade das células natural-killer e células dependentes de anticorpos, bem como a citotoxicidade mediada por células (Hou and Zheng, 1988).

De fato, machos de diferentes grupos de vertebrados tipicamente mostram maior susceptibilidade a infecções por parasitas e uma resposta imune mais fraca frente a uma variedade de antígenos do que fêmeas (Cohn, 1979; Grossman, 1985; Alexander e Stimson, 1988). Estudos de seleção artificial realizados com mamíferos e aves vêm demonstrando que a seleção para uma alta imunocompetência diminui a ocorrência de infecções parasitárias, apresentando correlação genética negativa com níveis de testosterona e esforço reprodutivo (Mills et al., 2010), bem como com o nível de ornamentação (Verhulst et al., 1999). Desta forma, diversos estudos vêm propondo que o esforço reprodutivo dos machos poderia comprometer a sobrevivência dado o efeito imunossupressor dos andrógenos, reduzindo a resistência à infecção parasitária (Hamilton e Zuk, 1982; Folstad e Karter, 1992; Mills et al., 2010). Embora evidências de imunossupressão dependente de testosterona em vertebrados silvestres tenham sido fornecidas para um grande número de espécies (Casto *et al.*, 2001), uma meta-análise de estudos com répteis, aves e mamíferos concluiu que o efeito imunossupressor

da testosterona depende do tipo de resposta imunitária e varia consideravelmente dentro e entre grupos filogenéticos (Roberts et al., 2004). Além disso, pardais implantados com testosterona e mantidos sob condições que simulavam dias curtos, não exibiram supressão da resposta imune mediada por células, indicando que a testosterona não é obrigatoriamente imunossupressora durante todo o ano nesta espécie (Greenman et al., 2005; Martin et al., 2008).

É importante ressaltar que pelo menos parte dos efeitos imunossupressores da testosterona pode ser indireta, sendo mediada por corticosteróides (McEwen et al., 1997). Um possível mecanismo responsável pelos efeitos indiretos seria a ligação da testosterona às globulinas de ligação de corticosteróides, gerando um aumento da fração livre e ativa dos corticosteróides (Gala e Westphal, 1965; Kley et al., 1973; Bradley et al., 1980; McDonald et al., 1981; Bradley, 1987). Adicionalmente, a presença de receptores para corticosteróides e esteróides sexuais no tecido imune apoia a possibilidade dos efeitos imunossupressores diretos e indiretos (Nelson et al., 2002). Embora esta hipótese permaneça para ser testada, a existência de efeitos diretos e mediados por corticosteróides poderia adicionar uma considerável plasticidade evolutiva à conexão entre testosterona e características imunológicas (Hau, 2007).

Imuno-modulação mediada por corticosteróides

Os corticosteróides são hormônios liberados em resposta a uma vasta gama de estímulos e condições estressantes, em diversos grupos de vertebrados. Nesta situação, eles funcionam como importantes reguladores do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, além de exercer um papel fundamental na modulação e direcionamento da resposta imune no período de recuperação pós-estresse agudo (Sapolsky et al., 2000). Entretanto, a exposição a picos muito frequentes, ou a níveis cronicamente elevados destes hormônios encontram-se associados a efeitos potencialmente deletérios sobre indivíduos, incluindo diminuição das taxas de crescimento, inibição da reprodução e depressão do sistema imune (Sapolsky et al., 2000). Dado

que o estresse crônico pode prejudicar funções fisiológicas altamente relevantes para a aptidão e até diminuir a viabilidade de uma população, medidas dos níveis plasmáticos dos corticosteróides têm sido usadas como um indicador do estresse ambiental gerado a ponto de comprometer o valor adaptativo (Romero e Wikelski, 2001). Níveis altos destes hormônios no plasma têm sido encontrados em populações de animais presentes nas áreas periféricas da distribuição geográfica (Dunlap e Wingfield, 1995), em populações sujeitas a eventos climáticos cíclicos (Romero e Wikelski, 2001), bem como em populações de ambientes impactados (Wasser et al., 1997; Norris et al., 1997; Hopkins et al., 1997).

Sabe-se que o tratamento com corticosteróides inibe a síntese, liberação e/ou eficiência de várias citocinas e outros mediadores que promovem a resposta imune e as reações inflamatórias (Wiegers e Reul, 1998; Sapolsky et al., 2000). Mecanismos moleculares através dos quais os corticosteróides inibem as citocinas têm sido identificados em nível de transcrição, tradução, secreção e estabilidade do RNA mensageiro, sendo as principais consequências destes eventos moleculares a inibição da ativação das células T auxiliares tipo 1 e 2 da subpopulação CD4, e a inibição das células do sistema monócito/macrófago no sítio inflamatório (Weller et al., 1999). Os corticosteróides também causam atrofia dos tecidos linfóides, particularmente do timo, disparando a apoptose dos precursores imaturos das células T e B e das células T maduras (Sapolsky et al., 2000).

Em contraste com os efeitos imunossupressores bem conhecidos dos corticosteróides, alguns estudos vêm demonstrando que os hormônios corticosteróides têm um efeito imunomodulador (Wilckens e DeRijk, 1997; Dhabhar, 2007; Dhabhar, 2009). De uma forma geral, em concentrações farmacológicas os corticosteróides têm efeitos imunossupressores, enquanto que em concentrações fisiológicas têm efeitos imuno-moduladores (Dhabhar 2009). Dhabhar e McEwen (1999) mostraram que os hormônios adrenais do estresse mediam um melhoramento da imunidade mediada por células na pele de ratos que é induzido por estresse agudo. A

adrenalectomia elimina este efeito de melhoramento induzido por estresse da imunidade mediada por células na pele, enquanto a administração de baixas doses de corticosterona ou adrenalina, significativamente aumentam a imunidade mediada por células na pele e produzem um aumento significativo nos números de células T nos nódulos linfáticos que drenam o local da resposta imune mediada por células (Dhabhar e McEwen, 1999). Além disso, a administração simultânea de ambos os hormônios do estresse produz um aumento maior da resposta imune mediada por células na pele dos ratos. Estes resultados demonstram que os hormônios liberados durante uma resposta de estresse agudo podem ajudar a preparar o sistema imune para potenciais desafios (em geral, ferimentos ou infecções) (Dhabhar e McEwen, 1999).

Outro estudo examinou os efeitos da corticosterona na proliferação de células T *in vitro* e demonstrou um importante mecanismo pelo qual a corticosterona pode mediar o aumento da função imune (Wiergers et al., 1995). Durante os estágios iniciais de ativação das células T, níveis baixos de corticosterona potencialmente aumentam a proliferação de linfócitos. Mais do que isso, eles mostraram que a corticosterona precisa estar presente durante o processo de ativação do receptor para células T para aumentar a resposta proliferativa (Wiergers et al., 1995). Também é importante lembrar que a inter-relação entre os sistemas endócrino e imune não é unidirecional, uma vez que citocinas, particularmente interleucina 1 (IL-1) e IL-6, são estimuladores potentes da produção de corticosteróides pela influência que exercem no hormônio liberador de corticotropina (CRH) (Besedovsky et al., 1986; Sapolsky et al., 2000). Além disso, células hipofisárias e das glândulas adrenais podem sintetizar estas citocinas (Cooke, 1999).

Inter-relações entre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e o eixo hipotálamo-pituitária-gônadas

Diversos estudos, realizados principalmente com mamíferos, têm demonstrado que a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em resposta a diferentes fatores estressores pode inibir diferentes pontos do funcionamento do eixo hipotálamo-pituitária-gônadas (HPG), em ambos os sexos. O aumento dos níveis de β -endorfina e do hormônio liberador de corticotropina (CRH), por exemplo, inibe a secreção do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) e promove uma redução da sensibilidade hipofisária ao GnRH, enquanto o aumento dos níveis de corticosteróides e prolactina promove redução da secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) (Warren, 1983; Sapolsky, 1991). Nos machos, níveis altos de corticosteróides podem também diminuir a sensibilidade testicular ao LH (Sapolsky, 2002).

Embora esta visão clássica de inibição do eixo HPG pela ativação do eixo HPA seja apoiada por diversos estudos experimentais, estudos que acompanharam a variação natural dos níveis de corticosterona e testosterona ao longo do ano em diversos vertebrados, incluindo anfíbios anuros, vem demonstrando que a interação entre estes dois eixos pode ser bem mais complexa. Segundo estes estudos, os níveis de ambos os hormônios se encontram elevados e positivamente correlacionados durante a época reprodutiva em vários vertebrados (Moore e Jessop, 2003 para uma revisão). De acordo com estes estudos, níveis elevados de corticosterona durante a estação reprodutiva provavelmente facilitam o comportamento reprodutivo, através da mobilização de reservas energéticas (Moore e Jessop, 2003; Assis et al., 2012). Segundo Emerson (2001), os níveis de corticosterona e testosterona estariam positivamente correlacionados com esforço vocal em anuros até o momento em que os níveis de corticosterona tornem-se elevados o bastante para disparar uma resposta de estresse, reduzindo os níveis de testosterona e inibindo a manifestação do comportamento vocal. De acordo com este modelo,

mudanças nos níveis de corticosterona poderiam ser responsáveis por determinar interrupções cíclicas da atividade reprodutiva, em que os indivíduos deixariam o coro, passando para uma atividade de forrageamento (Emerson e Hess, 2001).

Adicionalmente, estudos com mamíferos indicam que as gônadas podem também afetar o eixo HPA em todos os níveis (Malendowicz, 1994; Dallman et al., 1992), sendo estes efeitos mediados principalmente pelos esteróides sexuais (Viau, 2002), embora outros fatores gonadais também possam estar envolvidos (Kitay et al., 1966). Além disso, uma vez que as diferenças sexuais na resposta esteroidogênica ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) são evidentes nas células adrenocorticais antes da maturidade sexual (Carsia et al., 1987a,b; Kocsis e Carsia, 1989), um efeito independente das gônadas (Arnold e Burgoyne, 2004) também é plausível. Em lagartos *Sceloporus undulatus*, a sensibilidade das células adrenocorticais ao ACTH não foi afetada pela orquiectomia, mas foi reduzida pelo tratamento de reposição com testosterona (Carsia et al., 2008), e a sensibilidade das células adrenocorticais de lagartos ao ACTH parece variar de acordo com a espécie, sexo e condições ambientais (Carsia et al., 2008). Estudos com células adrenocorticais derivadas de galos orquiectomizados também sugerem que a manutenção de andrógenos suprime a resposta esteroidogênica da adrenal ao ACTH (Carsia et al., 1987a, b).

Todas estas descobertas demonstram a complexidade da relação entre os sistemas endócrino e imune, e que o esforço de investigação adicional é necessária nesta área.

Anfíbios anuros como modelo para estudos das inter-relações entre hormônios esteróides e imunocompetência

Um grande declínio de populações de anfíbios vem sendo documentado em áreas de clima temperado desde o início da década de 1970 e, mais recentemente, também nos trópicos (Carey et al., 1999), mas nem todas, as populações de anfíbios têm estado em declínio em todos os seis

continentes nos quais vivem. Além da destruição do hábitat, a ocorrência de doenças infecciosas em seus hábitats relativamente intocados tem se destacado como uma das principais causas de declínio de anfíbios (Carey et al., 1999). Parte da mortalidade em massa de anfíbios ocorre em áreas geograficamente espalhadas e a pode atingir de 50 a 100% da população, sendo mais pronunciada a maiores altitudes e regiões frias. Diversos agentes infecciosos têm sido associados primariamente e/ou secundariamente ao declínio populacional de anfíbios, incluindo um fungo quitrídio parasita (Chytridiomycota; Chytridiales) (Berger et al., 1998), bactérias patogênicas como *Aeromonas hydrophilla* (Taylor et al., 1999) e iridovírus (Cunningham et al., 1996). Frequentemente, a infecção por iridovírus ocorre em áreas impactadas pelo homem, e especialmente em populações com alta densidade (Cunningham et al., 1996). Há evidências também de que *Aeromonas hydrophilla* aumente sua taxa de crescimento muitas vezes após exposição a glicocorticóides, indicando que a virulência desta bactéria patogênica pode ser modulada pela resposta ao estresse dos anfíbios (Kinney et al., 1999).

É interessante observar que, na maioria dos casos de surtos de mortes causadas por doenças infecciosas, houve relato de outras espécies de anfíbios que ocupam o mesmo hábitat, mas que não foram afetadas pela doença (Bradford et al., 1994; Carey, 1993). Estas observações levaram à uma série de questões, tais como: Existe variação interespecífica na tolerância e/ou resistência aos patógenos? Se sim, quais são os aspectos da imunidade que diferem entre as espécies? Existe uma relação causal entre sensibilidade a impactos ambientais, intensidade de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenais em resposta a estressores e imunocompetência? Estariam as diferenças interespecíficas na resposta imune associadas a diferenças nos níveis circulantes de esteróides em condições basais e pós-estresse?

Em relação a estas questões, Gomes et al., (2012) compararam a resposta imune inata e os níveis de corticosterona basais e pós-estresse de contenção, de três espécies de sapos Bufonídeos (*Rhinella icterica*, *R. ornata* e *R. schneideri*), caracterizadas por diferentes graus

de dependência de ambientes florestados. Segundo este estudo, *R. ornata*, a espécie com maior grau de dependência de ambientes florestados, apresenta os maiores níveis basais e pós-estresse de contenção de corticosterona, enquanto *R. schneideri*, a espécie com distribuição geográfica mais associada a áreas naturalmente abertas ou desmatadas, apresenta a maior capacidade bactericida plasmática (CBP). Os autores também encontraram uma associação negativa interespecífica entre CBP e os níveis basais de corticosterona nestes sapos, sugerindo que a menor imunocompetência das espécies de ambientes florestados poderia estar associada ao efeito imunossupressor da corticosterona, reduzindo suas chances de ocupar áreas naturalmente abertas ou desmatadas. Também é interessante notar que os níveis basais de corticosterona em *R. ornata* são equivalentes aos encontrados em *R. schneideri* após estresse experimental de contenção (Gomes et al., 2012). Estes resultados preliminares motivaram a ampliação do estudo da relação entre níveis de esteróides e imunocompetência inata no gênero *Rhinella*, incorporando a metodologia de CBP por espectrofotometria, a elevação experimental dos níveis hormonais de corticosterona via administração transdérmica, e o desafio imunológico com PHA.

CONCLUSÕES GERAIS

Em relação a capacidade bactericida plasmática (CBP) medida por espectrofotometria, podemos afirmar que este é um método confiável e preciso para estimar este aspecto da imunocompetência inata de anfíbios anuros, e pode ser usado em estudos comparativos e ecofisiológicos. Testes adicionais, incluindo outras cepas de microrganismos, o uso de amostras de sangue, bem como peptídeos antimicrobianos sintetizados pelas glândulas granulares na derme podem fornecer uma avaliação mais completa da atividade antimicrobiana desses animais.

Quando quatro diferentes espécies de Bufonídeos foram submetidos às 24 horas do desafio de contenção sem e/ou com restrição de movimento, o padrão geral de resposta incluiu um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) e da relação neutrófilo/linfócito (N:L) e uma diminuição nos níveis plasmáticos de testosterona (T). Com relação à CBP, a resposta à contenção foi bem mais variável, com *Rhinella icterica* mostrando uma diminuição e *R. marina* mostrando um aumento nos valores em relação aos níveis basais. Adicionalmente, na comparação intraespecífica, os níveis de CORT tenderam a aumentar mais em resposta à cotenção com restrição de movimentos do que em relação à contenção sem restrição de movimentos, quando comparados com os valores basais, sugerindo que os animais são capazes de responder de forma diferente, de acordo com a intensidade do estressor aplicado. Além disso, as mudanças na N:L, nos níveis de T e em CBP, não foram correlacionadas com o aumento em CORT.

Rhinella ornata, apresentou maiores níveis basais de CORT quando comparada com outras espécies. Esta diferença interespecífica pode estar associada à variação no comportamento vocal ou a uma resposta de estresse a condições climáticas prevalentes no momento da coleta. Com relação à CBP, *R. ornata* e *R. icterica* mostraram os valores basais mais altos de CBP, contrariando as nossas previsões. Esperávamos que *R. schneideri* e *R. marina*, as espécies mais generalistas em termos de ocupação, exibiriam maior CBP. Entretanto, os níveis plasmáticos de glicocorticóides e a resposta imune variam grandemente mesmo em nível intra-específico, dependendo das condições ambientais e da fase ciclo de vida em que os animais se encontram, e estas fontes de variação podem se sobrepor às diferenças interespecíficas nas mesmas condições.

Para tentar entender melhor a resposta imune e a resposta ao estresse, submetemos machos adultos de *R. icterica* a três tratamentos distintos: desafio de contenção, manutenção em cativeiro a longo prazo e aplicação transdérmica de corticosterona. O desafio de contenção

sem restrição de movimento foi um estressor, aumentando CORT sem alterações imunológicas consistentes. Entretanto, a aplicação de um protocolo de estresse mais invasivo (contenção com restrição de movimentos) pelo mesmo período potencializou essa resposta, resultando no aumento de CORT e N:L e diminuição da CBP. A aplicação transdérmica de corticosterona eficientemente simulou eventos repetidos de resposta ao estresse agudo, sem alterar os parâmetros imunológicos, mesmo após treze dias de tratamento. Curiosamente, o cativeiro a longo prazo não atenuou a resposta ao estresse, uma vez que estes sapos mantiveram um aumento de três vezes em CORT mesmo depois de três meses sob estas mesmas condições. Mais do que isso, a manutenção em cativeiro a longo prazo gerou uma diminuição ainda maior na CBP, sugerindo que as consequências da resposta ao estresse podem ser agravadas pelo tempo em cativeiro. Tais fortes consequências na resposta imune promovidas pela resposta ao estresse crônico em sapos, se generalizada para outros estressores, tais como a poluição ambiental e a perda de hábitat por fragmentação, podem representar um impacto importante na aptidão de populações naturais.

Com base em nossos resultados, consideramos que, para melhor avaliar e entender as inter-relações entre o sistema imunológico e sua modulação pelo estresse e pelos níveis de CORT, se faz necessário analisar diferentes segmentos da resposta imune (em geral, anticorpos naturais e componentes humorais; repostas mediadas por células e respostas inflamatórias), pois o investimento em cada segmento da resposta imune pode ser diferente dentro e/ou entre espécies. Devemos também priorizar a coleta de dados de todas as espécies sob o mesmo período de atividade (em geral, dentro ou fora da período reprodutivo) e exercendo o mesmo tipo de atividade (em geral, vocalizando ou forrageamento), pois a atividade vocal é uma fonte de grande variabilidade nos níveis hormonais e, provavelmente, na resposta imune.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S.A., Dauphinée, M.J. & Talal, N. 1985. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. *J. Immunol.* 134, 204-210.
- Alexander, J. & Stimson, W.H. 1988. Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitol. Today.* 4, 189-193.
- Angelier, F. & Wingfield, J.C. 2013. Importance of the glucocorticoid stress response in a changing world: theory, hypotheses and perspectives. *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 118-128.
- Arnold, A.P. & Burgoyne, P.S. 2004. Are XX and XY brain cells intrinsically different? *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 6-11.
- Assis, V.R., Navas, C.A., Mendonça, M.T. & Gomes, F.R. 2012. Vocal and territorial behavior in the Smith frog (*Hypsiboas faber*): Relationships with plasma levels of corticosterone and testosterone. *Comp. Biochem. Physiol.* 163, 265-271.
- Assis, V.R., 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 Amer. J. Herpetol.* 8, 155-160.
- 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, 1-21.
- Baldissera Jr., F.A., Caramaschi, U. & Haddad, C.F.B. 2004. Review of the *Bufo* crucifer species group, with descriptions of two new related species (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Arquivos do Museu Nacional.* 62, 255-282.
- Barriga, C., Martín, M.I., Ortega E., Rodriguez, A.B. 2002 Physiological concentrations of melatonin and corticosterone in stress and their relationship with phagocytic activity. *J. Neuroendocrinol.* 14, 691-695.
- Beechler, B. R., H. Broughton, A. Bell, V. O. Ezenwa, and A. E. Jolles. 2012. Innate immunity in free-ranging African Buffalo (*Syncerus caffer*): Associations with parasite infection and white blood cell counts. *Physiological and Biochemical Zoology.* 85: 255-264.
- Bennett, A.F. 1987 Interindividual variability. New directions in ecological physiology. (Eds M. E. Feder, A. F. Bennett, W. W. Burggren & R. B. Huey), pp. 147-169. Cambridge University Press, New York.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., et al. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9031-9036.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K.R., Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9031-9036.
- Bernardo, J., Ossola, R.J., Spotila, J. & Crandall, K.A. 2007. Interspecies physiological variation as a tool for cross-species assessments of global warming-induced endangerment: validation of an intrinsic determinant of macroecological and phylogeographic structure. *Biol. Letters.* 3, 695-699.
- Berzins, L.L., Tilman-Schindel, E. & Burnes, G. 2008. Sex-specific effects of handling time on an index of immune activity in zebra finches. *Physiol. Bioch. Zool.* 81, 383-387.
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E. & Dinarello, C.A. 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 238, 522-524.

- Bevier, C.R., Gomes, F.R. & Navas, C.A. 2008. Variation in call structure and calling behavior in treefrogs of the genus *Scinax*. *South Amer. J. Herpetol.* 3, 196-206.
- Bishop, C.R., Athens, J.W., Boggs, D.R., Warner, H.R., Cartwright, G.E., et al. 1968. Leukokinetic Studies 13. A non-steady-state kinetic evaluation of mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *J. Clin. Investig.* 47, 249-260.
- Blomberg, S. P., T. Garland, and A. R. Ives. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution.* 57: 717-745.
- Bradford, D.F., Graber, D.M. & Tabatabai, F. 1994. Population declines of the native frog, *Rana muscosa*, in Sequoia and Kings Canyon National Parks, California. *Southwestern Nat.* 39, 323-327.
- Bradley, A.J. 1987. Stress and mortality in the red-tailed phascogale, *Phascogale calura* (Marsupialia: Dasyuridae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 67, 85-100.
- Bradley, A.J., McDonald, L.R. & Lee, A.K. 1980. Stress and mortality in a small marsupial (*Antechinus stuartii*, Macleay). *Gen. Comp. Endocrinol.* 40, 188-200.
- Brown, G.P. & Shine, R. 2014. Immune response varies with rate of dispersal in invasive Cane Toads (*Rhinella marina*). *PLoS ONE* 9(6): e99734.
- Brown, G.P., Kelehear, C. & Shine, R. 2011a. Effects of seasonal aridity on the ecology and behaviour of invasive cane toads (*Rhinella marina*) in the Australian wet-dry tropics. *Funct. Ecol.* 25, 1339-1347.
- Brown, G.P., Phillips, B.L., Dubey, S. & Shine, R. 2014. Invader immunology: invasion history alters immune system function in cane toads (*Rhinella marina*) in tropical Australia. *Ecol. Letters.* 18, 57-65.
- Brown, G.P., Shilton, C., Phillips, B.L. & Shine, R. 2007. Invasion, stress, and spinal arthritis in cane toads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 17698-17700.
- Brown, G.P., Shilton, C.M. & Shine, R. 2011b. Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. *Meth. Ecol. Evol.* 2, 341-348
- Buehler, D.M., Piersma, T. & Tieleman, B.I. 2008. Captive and free-living red knots *Calidris canutus* exhibit differences in non-induced immunity that suggest different immune strategies in different environments. *J. Avian. Biol.* 39, 560-566.
- Calder III, W.A. 1996. Size, function, and life history, 2nd ed. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Campbell, T.W. 2006. Hematologia de Anfíbios. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, eds. Trall, M.A., Backer, D.C., Campbell, T.C., DeNicola, D.B., Fettman, M.J., Lasse, E.D., Rebar, A. & Weiser, G. Ed. Roca. Pp. 291-300.
- Canosa, L.F. & Ceballos, N.R. 2002. Seasonal changes in testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum* H. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, 426-434.
- Carey, C. 1993. Hypothesis concerning the causes of the disappearance of boreal toads from the mountains of Colorado. *Cons. Biol.* 7, 355-362.
- Carey, C., Cohen, N. & Rollins-Smith, L. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Develop. Comp. Immunol.* 23, 459-472.
- Carnaval, A.C.O.Q. 2002. Phylogeography of four frog species in forest fragments of northeastern Brazil – a preliminary study. *Integr. Comp. Biol.* 42, 913-921.
- Carr, J.A., 2011. Stress and reproduction in amphibians. In: Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds.), Hormones and reproduction of vertebrates. Amphibians, Volume 2. Academic Press, Burlington and San Diego, pp. 99-116.
- Carsia, R.V., McIlroy, P.J., Cox, R.M., Barret, M. & John-Alder, H.B. 2008. Gonadal modulation of in vitro steroidogenic properties of dispersed adrenocortical cells from *Sceloporus* lizards. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 202-210.

- Carsia, R.V., Morin, M.E., Rosen, H.D. & Weber, H. 1987a. Ontogenic corticosteroidogenesis of the domestic fowl: response of isolated adrenocortical cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 184, 436-445.
- Carsia, R.V., Reisch, N.M., Fennel, M.J. & Weber, H. 1987b. Adrenocortical function of the domestic fowl: effects of orchietomy and androgen replacement. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185, 223-232.
- Casto, J.M., Nolan, V.Jr. & Ketterson, E.D. 2001. Steroid hormones and immune function: Experimental studies in wild and captive dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *Am. Nat.* 157, 408-420.
- Cohen, J.J. 1972. Thymus-derived lymphocytes sequestered in bone marrow of hydrocortisone-treated mice. *J. Immunol.* 108, 841-844.
- Cohn, D.A. 1979. Sensitivity to androgen: a possible factor in sex differences in the immune response. *Clin. Exper. Immunol.* 38, 218-227.
- Cooke, A. 1999. Regulação da resposta imune. In: *Imunologia*. Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. (eds), pp. 171-185.
- Cree, A., Tyrrell, C.L., Preest, M.R., Thorburn, D. & Guillette, L.J. 2003. Protecting embryos from stress: corticosterone effects and the corticosterone response to capture and confinement during pregnancy in a livebearing lizard (*Hoplodactylus maculatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 316-329.
- Crommenacker, J., N. P. C. Horrocks, M. A. Versteegh, J. Komdeur, B. I. Tieleman, and K. D. Matson. 2010. Effects of immune supplementation and immune challenge on oxidative status and physiology in a model bird: implications for ecologists. *Journal of Experimental Biology.* 213: 3527-3535.
- Cunningham, A.A., Langton, T.E.S., Bennett, P.M., Lewin, J.F., Drury, S.E.N., Gough, R.E. & MacGregor, S.K. 1996. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 351, 1539-1557.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Scribner, K.A., Bradbury, M.J., Walker, C.D., Strack, A.M. & Cascio, C.S. 1992. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J. Neuroendocrinol.* 4, 517-526.
- Daszak, P., Scott, D.E., Kilpatrick, A.M., Faggioni, C., Gibbons, J.W. & Porter, D. 2005. Amphibian population declines at savannah river site are linked to climate, not chytridiomycosis. *Ecol.* 86, 3232-3237.
- Davis, A.K. & Maerz, J.C. 2008. Comparison of Hematological Stress Indicators in Recently Captured and Captive Paedomorphic Mole Salamanders, *Ambystoma talpoideum*. *Copeia.* 3, 613-617.
- Davis, A.K. & Maerz, J.C. 2010. Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. *Int. J. Zool.* 2010, 1-9.
- Davis, A.K., Maney, D.L. & Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760-772.
- Demas, G. E., D. A. Zysling, B. R. Beechler, M. P. Muehlenbein, and S. S. French. 2011. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *The Journal of animal ecology.* 80: 710-30.
- Deviche, P., Beouche-Helias, B., Davies, S., Gao, S., Lane, S. & Valle, S. 2014. Regulation of plasma testosterone, corticosterone, and metabolites in response to stress, reproductive stage, and social challenges in a desert male songbird. *Gen. Comp. Endocrinol.* 203, 120-131.
- Deviche, P., Breuner, C. & Orchinik, M. 2001. Testosterone, corticosterone, and photoperiod interact to regulate plasma levels of binding globulin and free steroid hormone in dark-eyed juncos, *Junco hyemalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 67-77.

- Deviche, P., Gao, S., Davies, S., Sharp, P. J. & Dawson, A. 2012. Rapid stress-induced inhibition of plasma testosterone in free-ranging male rufous-winged sparrows, *Peucaea carpalis*: characterization, time course, and recovery. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177, 1-8.
- Deviche, P., Hurley, L., Fokidis, H., Lebour, B., Silverin, B., Silverin B, et al. 2010. Acute stress rapidly decreases plasma testosterone in a free- ranging male songbird: potential site of action and mechanism. *Gen. Comp. Endocrinol.* 169, 82–90.
- Dhabhar FS & McEwen BS. 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 1059–1064.
- Dhabhar FS & McEwen BS. 2007. Bidirectional effects of stress on immune function: possible explanations for salubrious as well as harmful effects; in Ader R (ed): *Psychoneuroimmunology*, ed 4. San Diego, Elsevier, pp 723–760.
- Dhabhar, F.S. 2002. Stress-induced augmentation of immune function - the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav. Immun.* 16, 785–798.
- Dhabhar, F.S. 2009. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation.* 16, 300–317.
- Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S. & Spencer, R.L. 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution – role of adrenal steroid hormones. *J. Immunol.* 157, 1638–1644.
- Dickens, M.J. & Romero, L.M. 2013. A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191, 177–189.
- Dohm, M.R. 2002. Repeatability estimates do not always set an upper limit to heritability. *Funct. Ecol.* 16, 273–280.
- Dong, Q., Salva, A., Sottas, C.M., Niu, E., Holmes, M. & Hardy, M.P. 2004. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *J. Androl.* 25, 973-981.
- Duellman, W.E. 1999. Global distribution of amphibians: patterns, conservation, and future challenges, pp. 1-30. In: W.E. Duellman (Ed.), *Patterns of Distribution of Amphibians: a Global Perspective*. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Dunlap, K.D. & Wingfield, J.C. 1995. External and internal influences on indices of physiological stress. I. Seasonal and population variation in adrenocortical secretion of free-living lizards, *Sceloporus occidentalis*. *J. Exp. Zool.* 271, 36-46.
- DuRant, S.E., Romero, L.M., Talent, L.G. & Hopkins, W.A. 2008. Effect of exogenous corticosterone on respiration in a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 126–133.
- Emerson, S.B. & Hess, D.L. 2001. Glucocorticoids, androgens, testis mass, and the energetics of vocalization in breeding male frogs. *Horm. Behav.* 39, 59-69.
- Emerson, S.B. 2001. Male advertisement calls: behavioral variation and physiological processes. In: Ryan, M.J. (Ed.), *Anuran Communication*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 36–44.
- Fauci, A.S. 1975. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations 1. Redistribution of circulating T-lymphocytes and B- lymphocytes to bone marrow. *Immunol.* 28, 669–680.
- Fernandes, P.A.C.M. 2009. Regulação da produção hormonal da glândula pineal de ratos por moduladores do processo inflamatório. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- Ferreira, Z.S., Fernandes, P.A.C.M., Duma, D., Assreuy, J., Avellar. M.C.W., et al. 2005. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa. *J. Pineal. Res.* 38, 182–188.
- Fisher, J.W. 1958. Increase in circulating red cell volume of normal rats after treatment with hydrocortisone or corticosterone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97, 502–505.

- Fisher, J.W. 1998. A quest for erythropoietin over nine decades. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 1–20
- Folstad, I. & Karter, A.J. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *Am. Nat.* 139, 603-622.
- Gadek-Michalska, A., & Bugajski, J. 2003. Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. *J. Physiol. Pharmacol.* 54, 449-460.
- Gala, R.R. & Westphal, U. 1965. Corticosteroid binding globulin in the rat: studies on the sex difference. *Endocrinology.* 77, 841-851.
- Gervasi, S.S. & Foufopoulos, J. 2008. Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Func. Ecol.* 22, 100–108.
- Gilbertson, M.K., Haffner, G.D., Drouillard, K.G., Albert, A. & Dixon, B. 2003. Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 101–110.
- Gomes, F.R., Oliveira, R.V., Assis, V.R., Titon Jr., B., Moretti, E.H., & Mendonça, M.T. 2012. Interspecific Variation in Innate Immune Defenses and Stress Response of Toads from Botucatu (São Paulo, Brazil). *South Amer. J. Herpet.* 7, 1-8.
- Graham, S.P, Kelehear, C., Brown, G.P. & Shine, R. 2012. Corticosterone-immune interactions during captive stress in invading Australian cane toads (*Rhinella marina*). *Horm. Behav.* 62, 146–53
- Greenberg, N. & Wingfield, J.C. 1987. Stress and reproduction: reciprocal relationships. In: Norris DO, Jones RE, editors. Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles. New York: Plenum Press. Pp. 461–502.
- Greenman, C. G., Martin, L. B. & Hau, M. 2005 Reproductive state, but not testosterone, reduces immune function in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiol. Biochem. Zool.* 78, 60–68.
- Grossman, C.J. 1984. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr. Rev.* 5, 435-455.
- Grossman, C.J. 1985. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science.* 227, 257-261.
- Hamilton, W.D. & Zuk, M. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science.* 218, 384-387.
- Hammond, T.T., Palme, R. & Lacey, E.A. 2015. Contrasting stress responses of two co-occurring chipmunk species (*Tamias alpinus* and *T. speciosus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 211, 114–122.
- Hardy, M.P., Gao, H.B., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Chai, W.R. et al. 2005. Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res.* 322, 147-153.
- Hasselquist, D. and J. A. Nilsson. 2012. Physiological mechanisms mediating costs of immune responses: what can we learn from studies of birds? *Animal Behavior.* 83: 1303-1312.
- Hau, M. 2007. Regulation of male traits by testosterone: implications for the evolution of vertebrate life histories. *BioEssays.* 29, 133-144.
- Hau, M., Ricklefs, R.E., Wikelski, M., Lee, K.A. & Brawn, J.D. 2010. Corticosterone, testosterone and life-history strategies of birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 277, 3203-3212.
- Hayes, T.B., Falso, P., Gallipeau, S. & Stice, M. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Experim. Biol.* 213, 921-933.
- Hopkins, W.A. & DuRant, S.E. 2011. Innate immunity and stress physiology of eastern hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis*) from two stream reaches with differing habitat quality. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 107–115.

- Hopkins, W.A., Mendonça, M.T. & Congdon, J.D. 1997. Increased circulating levels of testosterone and corticosterone in southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion wastes. *Comp. Biochem. Physiol.* 122C, 191-196.
- Horrocks, N.P.C., Matson, K.D. & Tieleman, B.I. 2011. Pathogen pressure puts immune defense into perspective. *Integr. Comp. Biol.* 51, 563–576.
- Hou, J. & Zheng, W.F. 1988. Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice. *Int. J. Immunopharm.* 10, 15-22.
- Houck, L.D. & Woodley, S.K. 1995. Field studies of steroid hormones and male reproductive behavior in amphibians. In: Heatwole, H. (Ed.), *Amphibian biology. Social Behaviour*, 2. Surrey Beatty & Sons Pty Ltd., Australia, pp. 677–703
- Hu, G.X., Lian, Q.Q., Lin, H., Latif, S.A., Morris, D.J., Hardy, M.P. & Ge, R.S. 2008. Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids.* 73, 1018-1024.
- Huey, R.B. & Dunham, A.E. 1987. Repeatability of locomotor performance in natural populations of the lizard, *Sceloporus merriami*. *Evol.* 41, 1116–1120.
- Inman, R.D. 1978. Immunologic sex differences and the female predominance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 21, 849-852.
- INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais): <http://sinda.crn2.inpe.br/PCD/SITE/novo/site/index.php>
- Jain, N.C. 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA.
- Janin, A., J.P. Léna, & Joly, P. 2011. Beyond occurrence: body condition and stress hormone as integrative indicators of habitat availability and fragmentation in the common toad. *Biol. Conserv.* 144, 1008-1016.
- Janin, A., Léna, J.P., Deblois, S. & Joly, P. 2012. Use of stress-hormone levels and habitat selection to assess functional connectivity of a landscape for an amphibian. *Conserv. Biol.* 26, 923–931.
- Jessop, T.S., Woodford, R. & Symonds, M.R. 2013. Macrostress: do large-scale ecological patterns exist in the glucocorticoid stress response of vertebrates? *Funct. Ecol.* 27, 120-130.
- Jones, S. & Bell, K. 2004. Plasma corticosterone concentrations in males of the skink *Egernia whitii* during acute and chronic confinement, and over a diel period. *Comp. Biochem. Physiol.* 137, 105–113.
- Ketterson, E.D. & Nolan, V.Jr. 1992. Hormones and life histories: an integrative approach. *Am. Nat.* 140, S33-S62.
- Ketterson, E.D. & Nolan, V.Jr. 1999. Adaptation, exaptation, and constraint: A hormonal perspective. *Am. Nat.* 154, S4-S25.
- Kindermann, C., Narayan, E.J. & Hero, J.M. 2012. Urinary corticosterone metabolites and chytridiomycosis disease prevalence in a free-living population of male Stony Creek frogs (*Litoria wilcoxii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 162, 171–176.
- Kinney, K.S., Austin, C.E., Morton, D.S. & Sonnenfield, G. 1999. Catecholamine enhancement of *Aeromonas hydrophila* growth. *Microb. Pathog.* 26, 85-91.
- Kitay, J.I., Coyne, M.D., Nelson, R. & Newsom, W. 1966. Relation of the testis to adrenal enzyme activity and adrenal corticosterone production in the rat. *Endocrinol.* 78, 1061-1066.
- Kley, H.K., Herrmann, J., Morgner, K.D. & Kruskemper, H.I. 1973. Effects of testosterone oenanthate on plasma concentrations of thyroxine, cortisol, testosterone and hormone binding proteins in patients with hypogonadism. *Horm. Metab. Res.* 5, 271-274.
- Klukowski, M. 2011. Effects of breeding season, testosterone and ACTH on the corticosterone response of free-ranging male fence lizards (*Sceloporus undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 295–302.
- Kocsis, J.F. & Carsia, R.V. 1989. Steroidogenic properties of isolated Turkey adrenocortical cells. *Dom. Anim. Endocrinol.* 6, 121-131.

- Landys, M.M., Ramenofsky, M. & Wingfield, J.C., 2006. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 132–149
- Lattin, C.R. & Romero, L.M. 2013. Seasonal variation in corticosterone receptor binding in brain, hippocampus, and gonads in House Sparrows (*Passer domesticus*). *The Auk.* 130, 591–598.
- Lee, K. A., M. Wikelski, W. D. Robinson, T. R. Robinson, & K. C. Klasing. 2008. Constitutive immune defenses correlate with life-history variables in tropical birds. *Journal of Animal Ecology.* 77: 356–363.
- Lee, K.A. & Klasing, K.C. 2004. A role for immunology in invasion biology. *Trends Ecol. Evol.* 19, 523–529.
- Lee, K.A. 2006. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr. Comp. Biol.* 46, 1000–1015.
- Lee, K.A., Martin II, L.B. & Wikelski, M.C. 2005. Responding to inflammatory challenges is less costly for a successful avian invader, the house sparrow (*Passer domesticus*), than its less-invader congener. *Oecologia.* 145, 244–251.
- Liebl, A. L. and L. B. Martin. 2009. Simple quantification of blood and plasma antimicrobial capacity using spectrophotometry. *Functional Ecology.* 23: 1091–1096.
- Llewellyn, D., Thompson, M.B., Brown, G.P., Phillips, B.L. & Shine, R. 2012. Reduced investment in immune function in invasion-front populations of the cane toad (*Rhinella marina*) in Australia. *Biol. Inv.* 14, 999–1008.
- Love, O.P., Shutt, L.J., Silfies, J.S. & Bird, D.M. 2003. Repeated restraint and sampling results in reduced corticosterone levels in developing and adult captive American kestrels (*Falco sparverius*). *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 753–761.
- Maciel, N.M., Collevatti, R.G., Colli, G.R. & Schwartz, E.F. 2010. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (Anura: Bufonidae). *Mol. Phylog. Evol.* 57, 787–797.
- Malendowicz, L.K., 1994. Cytophysiology of the mammalian adrenal cortex as related to sex, gonadectomy and gonadal hormones. Wydawnictwo Poznanskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauk, Poznan, Poland.
- Markham, J.A., Beckel-Mitchener, A.C., Estrada, C.M. & Greenough, W.T. 2006. Corticosterone response to acute stress in a mouse model of Fragile X syndrome. *Psychoneuroendocrinol.* 31, 781–785.
- Martin, L. B., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. 2008. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 363, 321–339.
- Martin, L.B. 2009. Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163, 70–76.
- Martin, L.B., Hopkins, W.A., Mydlarz, L.D. & Rohr, J.R. 2010. The effects of anthropogenic global changes on immune functions and disease resistance. *Ann. NY Acad. Sci.* 1195, 129–148.
- Martin, L.J. & Tremblay, J.J. 2008. Glucocorticoids antagonize cAMP-induced Star transcription in Leydig cells through the orphan nuclear receptor NR4A1. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 165–175.
- Matson, K.D., Tieleman, B.I. & Klasing, K.C. 2006. Capture stress and the bactericidal competence of blood and plasma in five species of tropical birds. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 556–564.
- McCormick, G.L. & Langkilde, T. 2014. Immune responses of eastern fence lizards (*Sceloporus undulatus*) to repeated acute elevation of Corticosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 204, 135–140.

- McDonald, I.R., Lee, A.K., Bradley, A.J. & Than, K.A. 1981. Endocrine changes in dasyurid marsupials with differing mortality patterns. *Gen. Comp. Endocrinol.* 11, 292-301.
- McEwen, B.S., Biron, C.A., Brunson, K.W., Bulloch, K. & Chambers, W.H. 1997. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: Neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Rev.* 23, 79-133.
- McEwen, S. & Wingfield, J.C. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43, 2–15.
- McMahon, T.A., Sears, B.F., Venesky, M.D., Bessler, S.M., Brown, J.M. et al. 2014. Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature.* 511, 224–227.
- Meints, R.H. & Carver, F.J. 1973. Triiodothyronine and hydrocortisone effects on *Rana pipiens* erythropoiesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21, 9–15.
- Mendes, L., Piersma, T., Hasselquist, D., Matson, K.D. & Ricklefs, R.E. 2006. Variation in the innate and acquired arms of the immune system among five shorebird species. *J Exp. Biol.* 209, 284–291.
- Mendonça, M.T., Chernetsby, S.D., Nester, K.E. & Gardner, G.L. 1996. Effects of sex steroids on sexual behavior in the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *Horm. Behav.* 30, 153-161.
- Merchant, M. E., K. Mills, N. Leger, E. Jerkins, K. A. Vliet, and N. McDaniel. 2006. Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. *Comparative Biochemistry and Physiology B.* 143: 133-137.
- Merchant, M.E., Roche, C., Elsey, R.M. & Prudhomme, J. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 136, 505-513.
- Meylan, S., Dufty, A.M. & Clobert, J. 2003. The effect of transdermal corticosterone application on plasma corticosterone levels in pregnant *Lacerta vivipara*. *Comp. Biochem. Physiol.* 134, 497–503.
- Millet, S., Bennett, J., Lee, K.A., Hau, M. & Klassing, K.C. 2007. Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. *Develop. Comp. Immun.* 31, 188-201.
- Mills, S.C., Grapputo, A., Jokinen, I., Koskela, E., Mappes, T. & Poikonen, T. 2010. Fitness trade-offs mediated by immunosuppression costs in a small mammal. *Evol.* 64, 166-179.
- Mitchell, C.E. & Power, A.G. 2003. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nat.* 421, 625-627.
- Moore, F.L., Boyd, S.K. & Kelley, D.B. 2005. Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Horm. Behav.* 48,373-383.
- Moore, I.T. & Jessop, T.S. 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm. Behav.* 43, 39-47.
- Moore, M. S., J. D. Reichard, T. D. Murtha, B. Zahedi, R. M. Fallier, and T. H. Kunz. 2011. Specific alterations in complement protein activity of Little Brown Myotis (*Myotis lucifugus*) hibernating in white-nose syndrome affected sites. *PLoS ONE.* 6: e27430.
- Moore, M.C., Thompson, C.W. & Marler, C.A. 1991. Reciprocal changes in corticosterone and testosterone levels following acute and chronic handling stress in the tree lizard, *Urosaurus ornatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81, 217–226.
- Morrow-Tesch, J.L., McGlone, J.J. & Norman, R.L. 1993. Consequences of restraint stress on natural killer cell activity, behavior, and hormone levels in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Psychoneuroendocrinol.* 18, 383–395.
- Muehlenbein, M.P. & Bribiescas, R.G. 2005. Testosterone-mediated immune functions and male life histories. *Am. J. Human. Biol.* 17, 527-558.
- Muller, C., Jenni-Eiermann, S. & Jenni, L. 2011. Heterophils/lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. *Funct. Ecol.* 25, 566–576.

- Muller, C., Jenni-Eiermann, S., Blondel, J., Perret, P., Caro, S.P. et al. 2006. Effect of human presence and handling on circulating corticosterone levels in breeding blue tits (*Parus caeruleus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 163–171.
- Narayan E., Hero J.M. & Cockrem, J.F. 2012. Inverse urinary corticosterone and testosterone responses to different durations of restraint in the cane toad (*Rhinella marina*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 179, 345–349.
- Narayan, E. & Hero, J.M. 2011. Urinary corticosterone responses and haematological stress indices in endangered Fijian ground frog (*Platymantis vitiana*) during transportation and captivity. *Australian. J. Zool.* 59, 79–85.
- Narayan, E. & Hero, J.M. 2014. Repeated thermal stressor causes chronic elevation of baseline corticosterone and suppresses the physiological endocrine sensitivity to acute stressor in the cane toad (*Rhinella marina*). *J. Thermal. Biol.* 41, 72–76.
- Narayan, E.J. 2013. Non-invasive reproductive and stress endocrinology in amphibian conservation physiology. *Conserv. Physiol.* 1, 1–16.
- Narayan, E.J., Christi, K. & Morley, C. 2009. Captive propagation of the endangered native Fijian frog *Platymantis Vitiana*: Implications for ex situ conservation and management. *Pac. Conserv. Biol.* 15, 47–55.
- Narayan, E.J., Cockrem, J.F. & Hero, J.M. 2011. Urinary corticosterone metabolite responses to capture and captivity in the cane toad (*Rhinella marina*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 371–377.
- Narayan, E.J., Cockrem, J.F. & Hero, J.M. 2011a. Urinary corticosterone metabolite responses to capture and captivity in the cane toad (*Rhinella marina*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 173, 371–377
- Narayan, E.J., Molinia, F.C., Kindermann, C., Cockrem, J.F. & Hero, J.M. 2011b. Urinary corticosterone responses to capture and toe-clipping in the cane toad (*Rhinella marina*) indicate that toe-clipping is a stressor for amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 238–245.
- Navas, C.A. & Otani, L. 2007. Physiology, environmental change, and anuran conservation. *Phyllomedusa.* 6, 83–103.
- Nelson, R.J., Demas, G.E., Klein, S.K. & Kriegsfeld, L.J. 2002. *Seasonal patterns of stress, immune function and disease*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Norris, D.O., Felt, S.B., Woodling, J.D. & Dores, R.M. 1997. Immunocytochemical and histological differences in the interregional axis of feral brown trout, *Salmo trutta*, in metal-contaminated waters. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 343–351.
- Norris, K. & Evans, M.R. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* 11, 19–26.
- Norton, J. & Wira, C.R. 1977. Dose-related effects of the sex hormones and cortisol on the growth of the bursa of fabricius in chick embryos. *J. Ster. Biochem.* 8, 985–987.
- Otis, I., Murumagi, A. & Horak, P. 1998. Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation. *Func. Ecol.* 12, 700–707.
- Owen-Ashley, N.T., Hasselquist, D. & Wingfield, J.C. 2004. Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis: Unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows. *Am. Nat.* 164, 490–505.
- Patchev, V.K. & Patchev, A.V. 2006. Experimental models of stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8, 417–432.
- Phillips, B.L., Brown, G.P., Travis, J.M. & Shine, R. 2008. Reid's paradox revisited: the evolution of dispersal kernels during range expansion. *Am. Nat.* 172, S34–S48
- Piersma, T. 1997. Do global patterns of habitat use and migration co-evolve with relative investments in immunocompetence due to spatial variation in parasite pressure? *Oikos* 80, 623–631.

- Preest, M.R. & Cree, A. 2008. Corticosterone treatment has subtle effects on thermoregulatory behavior and raises metabolic rate in the New Zealand common gecko, *Hoplodactylus maculatus*. *Physiol. Biochem. Zool.* 81, 641–650.
- Reynolds, S. & Christian, K.A. 2009. Environmental moisture availability and body fluid osmolality in introduced toads, *Rhinella marina*, in Monsoonal Northern Australia. *J. Herpetol.* 43, 326–331.
- Rich, E.L. & Romero, L.M. 2005. Exposure to chronic stress down regulates corticosterone responses to acute stressors. *Amer. J. Physiol.* 288, R1628-R1636.
- Ricklefs, R. E. and M. Wikelski. 2002. The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution.* 17: 462-8.
- Roberts, M.L., Buchanan, K.L. & Evans, M.R. 2004. Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Anim. Behav.* 68, 227-239.
- Rollins-Smith, L. A. 2009. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1788: 1593-1599.
- Romero, L.M. & Reed, J.M. 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comp. Biochem. Physiol.* 140, 73-79.
- Romero, L.M. & Wikelski, M. 2001. Corticosterone level predict survival probabilities of Galápagos marine iguanas during El Niño events. *PNAS* 98, 7366-7370.
- Romero, L.M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen.Comp. Endocrinol.* 128, 1–24.
- Sapolsky, R.M. 1991. Testicular function, social rank and personality of wild baboons. *Psychoneuroendocrinology.* 16, 281-293.
- Sapolsky, R.M. 1992. Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death. Cambridge, MA: MIT Press.
- Sapolsky, R.M. 2002. Endocrinology of the stress-response. Pp. 409-450. *In: Behavioral Endocrinology*, 2^o edition. Becker, J.B., Breedlove, S.M., Crews, D. e M.M. McCarthy (eds.). The MIT Press.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M. & Muck, A.U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrinol. Rev.* 21, 55-89.
- Seddon, R. J., & Klukowski, M. 2012. Influence of Stressor Duration on Leukocyte and Hormonal Responses in Male Southeastern Five-Lined Skinks (*Plestiodon inexpectatus*). *J. Experim. Zool.* 317, 499–510.
- Taylor, S.K., Williams, E.S., Thorne, E.T., Mills, K.W. & Withers, D.I. 1999. Causes of mortality of the Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *J. Wildlife Diseases.* 35, 49-57.
- The IUCN red list of threatened species: <http://maps.iucnredlist.org/>
- Tieleman, B. I., E. Croese, B. Helm, and M. A. Versteegh. 2010. Repeatability and individual correlates of microbicidal capacity of bird blood. *Comparative and Biochemistry Physiology* A. 156: 537-540.
- Tieleman, B.I., Williams, J.B., Ricklefs, R.E. & Klasing, K.C. 2005. Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proc. R. Soc. B.* 272, 1715-1720.
- Tingley, M.W., Monahan, W.B., Beissinger, S.R. & Moritz, C. 2009. Birds track their grinnellian niche through a century of climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19637–19643.
- Titon Jr., B., Navas, C.A., Jim, J. & Gomes, F.R. 2010. Water balance and locomotor performance in three species of neotropical toads that differ in geographical distribution. *Comp. Biochem. Physiol.* 156, 129–135.

- Tokarz, R.R. & Summers, C.H. 2011. Stress and reproduction in reptiles. In: Norris, D.O., Lopez, K.H. editors. *Hormones and reproduction in vertebrates*. Vol. 3: reptiles. New York: Academic Press. Pp. 169–213.
- Tomanek, L. 2012. Environmental proteomics of the mussel *Mytilus*: implications for tolerance to stress and change in limits of biogeographic ranges in response to climate change. *Integr. Comp. Biol.* ics114.
- Tompkins, D.M., White, A.R. & Boots, M. 2003. Ecological replacement of native red squirrels by invasive greys driven by disease. *Ecol. Lett.* 6, 189–196.
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Mckenzie, V.J. & Kuris, A.M. 2003. Introduced species and their missing parasites. *Nat.* 421, 628–630.
- Verhulst, S., Dieleman, S.J. & Parmentier, H.K. 1999. A tradeoff between immunocompetence and sexual ornamentation in domestic fowl. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4478–4481.
- Verhulst, S., Riedstra, B. & Wiersma, P. 2005. Brood size and immunity costs in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *J. Avian Biol.* 36, 22–30.
- Viau, V. 2002. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and adrenal axes. *J. Neuroendocrinol.* 14, 506–513.
- Vleck, C.M., Vertalino, N., Vleck, D. & Bucher, T.L. 2000. Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living adelic penguins. *The Condor.* 102, 392–400.
- Wack, C.L., DuRant, S.E., Hopkins, W.A., Lovern, M.B., Feldhoff, R.C. & Woodley, S. K. 2012. Elevated plasma corticosterone increases metabolic rate in a terrestrial salamander. *Comp. Biochem. Physiol.* 161, 153–158.
- Wack, C.L., Lovern, M.B. & Woodley, S.K. 2010. Transdermal delivery of corticosterone in terrestrial amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 169, 269–275.
- Warren, M. 1983. Effects of undernutrition on reproductive function in the human. *Endocrinol. Rev.* 4, 363–377.
- Wasser, S.K., Bevis, K., King, G. & Hanson, E. 1997. Noninvasive physiological measures of disturbance in the Northern Spotted Owl. *Cons. Biol.* 11, 1019–1022.
- Weinstein, Y., Ran, S. & Segal, S. 1984. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J. Immunol.* 132, 656–661.
- Weller, I., Lockwood, C.M. & Chandra, R.K. 1999. Imunodeficiências secundárias. In: *Imunologia*. Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. (eds), pp. 285–292.
- Wieggers, G.J. & Reul, J.M.H.M. 1998. Induction of cytokine receptors by glucocorticoids; functional and pathological significance. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 317–321.
- Wieggers, G.J., Croiset, G., Reul, J.M.H.M., Holsboer, F. & De Kloet, E.R. 1993. Differential effects of corticosteroids on rat peripheral blood T-lymphocyte mitogenesis in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.* 265, E825–E830.
- Wieggers, G.J., Labeur, M.S., Stec, I.E., Klinkert, W.E., Holsboer, R.F. & Reul, J.M. 1995. Glucocorticoids accelerate anti-T-cell receptor-induced T-cell growth. *J. Immunol.* 155, 1893–1902.
- Wieggers, G.J., Reul, J.M.H.M., Holsboer, F. & De Kloet, E.R. 1994. Enhancement of rat splenic lymphocyte mitogenesis after short term pre-exposure to corticosteroids in vitro. *Endocrinol.* 135, 2351–2357.
- Wikelski, M. & Cooke, S.J. 2006. Conservation physiology. *Trends Ecol. Evol.* 21, 38–46.
- Wilckens, T. & DeRijk, R. 1997. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today.* 18: 418–424.
- Wingfield, J.C. & Romero, L.M. 2001. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates,” in *Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms*, B. S. McEwen and H. M. Goodman, Eds., vol. 4 of *Handbook of Physiology*, Section 7: The Endocrine System, pp. 211–234, Oxford University Press, New York, NY, USA.

- Wingfield, J.C. 2013. The comparative biology of environmental stress: Behavioural endocrinology and variation in ability to cope with novel, changing environments. *Anim. Behav.* 85, 1127–1133.
- Wingfield, J.C., Hunt, K., Breuner, C., Dunlop, K., Fowler, G.S., Freed, L. & Lepson, J. 1997. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In Behavioral approaches to conservation in the wild: 95–131. Clemmons, J. R. & Buchholz, R. (Eds). Cambridge: Cambridge University Press.
- Zamudio, S.R., Quevedo-Corona, L., Garcés, L. & De La Cruz, F. 2009. The effects of acute stress and acute corticosterone administration on the immobility response in rats. *Brain. Res. Bull.* 80, 331–336.
- Zerani, M. & Gobbetti, A. 1993. Corticosterone during the annual reproductive cycle and in sexual behavior in the crested newt, *Triturus cristatus*. *Horm. Behav.* 27, 29–39.
- Zerani, M., Vellano, C., Amabili, F., Carnevali, O., Andreoletti, G.E. & Polzonetti-Magni, A. 1991. Sex steroid profile and plasma vitellogenin during the annual reproductive cycle of the crested newt (*Triturus cristatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 337–344.